




Escola Universitària d'Enginyeria  
Tècnica Industrial de Barcelona  
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

## Volumen I

Memoria

PROYECTO FINAL DE CARRERA



# “Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales”

PFC presentado para optar al título de Ingeniería  
Técnica Industrial especialidad Química  
por **Silvia Calle Aznar**

Barcelona, 12 de Junio de 2011

Tutor proyecto: Eva María Carral Mahía  
Departamento de Química Industrial  
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

# ÍNDICE DE MEMORIA

Índice de memoria.....	1
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUM.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>11</b>
<b>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 2: EL CAFÉ .....</b>	<b>15</b>
2.1. EL CAFÉ .....	15
2.1.1. Composición .....	16
2.1.2. Tipos de café .....	17
2.1.3. Características del café.....	17
2.1.4. Países consumidores de café .....	18
2.1.5. Países productores de café arábica y robusta.....	19
2.1.6. Tipos de café según su Origen .....	20
2.1.7. Países exportadores e importadores de café .....	21
2.2. ELABORACIÓN DEL CAFÉ .....	22
2.2.1. Cosecha y preparación de los granos .....	22
2.2.2. Tipos de café según su procesado .....	28
<b>Capítulo 3: LA CAFEÍNA EN EL CAFÉ .....</b>	<b>29</b>
3.1. EL PAPEL DE LA CAFEÍNA EN EL CAFÉ.....	29
3.1.1. Propiedades químicas de la cafeína .....	29
3.1.2. Vida media y eliminación de la cafeína.....	31
3.1.3. Propiedades fisiológicas de la cafeína en el café .....	31
<b>Capítulo 4: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CAFEÍNA.....</b>	<b>33</b>
4.1. MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	35
4.1.1. Introducción a la cromatografía .....	35
4.1.2. Tipos de cromatografía.....	36
4.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) .....	38
4.1.4. Cromatografía de partición o reparto .....	40
4.1.5. Cromatografía de fase normal y fase inversa .....	42

4.1.6.	Instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución	43
4.1.7.	Parámetros cromatográficos	52
4.2.	MÉTODO ESPECTROSCÓPICO	55
4.2.1.	Métodos espectroscópicos	55
4.2.2.	Radiación electromagnética	55
4.2.3.	Interacción de la radiación electromagnética con la materia	57
4.2.4.	Espectroscopía UV	59
4.2.5.	Instrumentación para espectroscopía UV	63
<b>Capítulo 5:</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>65</b>
5.1.	MATERIAL DE LABORATORIO UTILIZADO	65
5.1.1.	Preparación del material de vidrio	67
5.2.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PATRÓN PARA ELABORAR LA RECTA DE CALIBRADO	67
5.2.1.	Instrumentación	67
5.2.2.	Preparación de las muestras patrón	67
5.3.	MUESTRAS DE CAFEÍNA DE CAFÉ	68
5.3.1.	Instrumentación	69
5.3.2.	Preparación de las muestras de café	69
5.4.	PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN DE LA CAFEÍNA DEL CAFÉ	70
5.4.1.	Método de extracción de cafeína utilizado (I)	70
5.4.2.	Método de extracción de cafeína utilizado (II)	71
5.4.3.	Método de extracción de cafeína utilizado (III)	72
5.5.	PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC)	80
5.5.1.	Instrumentación	80
5.5.2.	Puesta a punto del Sistema Cromatográfico	80
5.6.	PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV	91
5.6.1.	Instrumentación	91
5.6.2.	Puesta a punto del Sistema Espectrofotométrico	91
<b>Capítulo 6:</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>95</b>
6.1.	RESULTADOS OBTENIDOS POR (HPLC)	96
6.1.1.	Determinación de la cafeína por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	98
6.2.	RESULTADOS OBTENIDOS POR ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS	118
6.2.1.	Determinación de la cafeína por Espectrofotometría UV	118
<b>Capítulo 7:</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>139</b>
<b>Capítulo 8:</b>	<b>EVALUACIÓN ECONÓMICA</b>	<b>141</b>

8.1.	Costes energéticos.....	142
8.2.	Costes de material y reactivos .....	143
8.3.	Amortizaciones.....	146
8.4.	Costes de personal.....	147
8.5.	Coste Total .....	148
<b>Capítulo 9: SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE .....</b>		<b>149</b>
<b>Capítulo 10: BIBLIOGRAFÍA .....</b>		<b>153</b>
10.1.	Bibliografía de Consulta .....	153
10.2.	Páginas web de consulta .....	155



# OBJETIVO

En este proyecto se realiza el estudio de la cafeína analítico, tanto cualitativo como cuantitativo de la cafeína en diferentes tipos de café comerciales. Los objetivos del estudio son:

- Ensayar métodos de extracción y purificación de la cafeína en los diferentes cafés.
- Desarrollar una metodología analítica que permita la determinación y cuantificación de la cafeína en el café utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la espectroscopía UV-VIS.
- Realizar una puesta a punto de los métodos analíticos elegidos y encontrados en bibliografía hasta lograr las condiciones óptimas que permitan la identificación y la cuantificación de la cafeína en los diferentes cafés.
- Preparar diferentes soluciones patrón con cafeína pura para realizar la curva de calibrado para cada método ensayado que nos permita determinar la cantidad de cafeína en cada café.
- Efectuar los cálculos pertinentes para determinar la cantidad de cafeína contenida en cada café utilizando la curva de calibrado.
- Estudiar e intentar establecer una comparación entre la cantidad de cafeína y las diferentes características del café; tales como la variedad del café, el país de origen, procesado...



# RESUM

Aquest projecte consta d'una part teòrica on s'explica tant els diferents tipus de cafè, composició i característiques, així com el paper que desenvolupa la cafeïna del cafè i com influeix sobre el cos humà.

També es fa una recopilació d'un resum teòric sobre els dos mètodes analítics utilitzats en els experiments per la determinació quantitativa de la cafeïna del cafè. La cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) i l'espectroscopia UV-VIS.

A la part experimental, es van realitzar diferents assajos fins a obtenir les condicions òptimes en cadascuna de les tècniques per a la determinació tant qualitativa com quantitativa de la cafeïna, ajudant-nos de la interpolació en una recta de calibratge confeccionada amb les solucions patró de cafeïna de concentració coneguda. També es van assajar diferents mètodes d'extracció de la cafeïna dels diferents cafès. Després de posar a punt tant el mètode de separació de la cafeïna del cafè com els mètodes analítics utilitzats: HPLC i espectrofotomètric, es va procedir a la determinació quantitativa de la cafeïna en diferents cafès comercials de divers origen i característiques.

Un cop efectuades totes les determinacions de cafeïna en els diferents cafès, treballant sempre amb varies repeticions per poder realitzar un petit estudi estadístic dels valors obtinguts i assegurar la fiabilitat d'ells, es va intentar treure conclusions analitzant els valors de cafeïna obtinguts i una d'elles és la demostració, tal i com prevèiem, de que la quantitat de cafeïna depèn tant del tipus de cafè, com del seu país d'origen i del seu processat.

En aquest projecte s'han tingut en compte les normes de bones pràctiques al laboratori (GLP) i criteris de sostenibilitat i el respecte pel medi ambient realitzant una bona gestió del residus generats.





# RESUMEN

Este proyecto consta de una parte teórica en donde se explica tanto los diferentes tipos de café, composición y características, así como el papel que tiene la cafeína del café y cómo influye sobre el organismo humano.

También se recopila un resumen teórico sobre los dos métodos analíticos utilizados en los experimentos para la determinación cuantitativa de la cafeína del café. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectroscopía UV-VIS.

En la parte experimental, se realizaron diferentes ensayos hasta obtener las condiciones óptimas en cada una de las técnicas para la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de la cafeína, ayudándonos de la interpolación en una recta de calibrado confeccionada con soluciones patrón de cafeína de concentración conocida. También se ensayaron distintos métodos de extracción de la cafeína de los diferentes cafés. Después de poner a punto tanto el método de separación de la cafeína del café como los dos métodos analíticos utilizados: HPLC y espectrofotométrico, se procedió a la determinación cuantitativa de la cafeína en distintos cafés comerciales de distinto origen y características.

Una vez efectuadas todas las determinaciones de cafeína en los distintos cafés, trabajando siempre con varias repeticiones para poder realizar un pequeño estudio estadístico de los valores obtenidos y asegurar la fiabilidad de ellos, se intenta sacar conclusiones analizando los valores de cafeína obtenidos y una de ellas es la demostración, tal y como preveíamos, de que la cantidad de cafeína depende tanto del tipo de café, como del país de origen y de su procesado.

En este proyecto se han tenido en cuenta las normas de buenas prácticas en el laboratorio (GLP) y criterios de sostenibilidad y respeto por el medio ambiente realizando una correcta gestión de los residuos generados.



# **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero dar las gracias a Eva Carral, por su ayuda y consejos que han hecho posible el desarrollo de este proyecto. Gracias por tu amabilidad y paciencia con nosotras incluso en los momentos difíciles.

En segundo lugar quiero agradecer a Nuria Borràs por su ayuda en el laboratorio y al Dr. Ramón Oliver por sus ánimos diarios. A Margarita Sanchez y Enric Boada por prestarnos su colaboración en el laboratorio.

Agradecer a mi compañera de proyecto Anabel por todo el trabajo realizado. Gracias por su apoyo, comprensión y ayuda. Las horas en las que hemos podido compartir experiencias y trabajar en equipo nos han hecho aprender de nuestros errores.

Por último, quiero dar las gracias a Andrea y Marga por su colaboración y compañerismo y por hacer que las muchas horas en el laboratorio se hicieran más cortas.

Por último, dar las gracias a mis padres, mi familia y mis amigos por estar siempre a mi lado y en especial a Ana, Eva y Marcos por su apoyo durante todo este tiempo.



# **CAPÍTULO 1:**

## **INTRODUCCIÓN**

La cafeína es un polvo inodoro, incoloro y amargo. Friedrich Ferdinand Runge la aisló del café en 1819 y del té en 1827, pero su estructura química no se describió hasta 1875 por E. Fischer. La cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) y otros alcaloides metilxantínicos, son derivados del grupo de las xantinas, que a su vez se derivan de las purinas. También es conocida por el nombre teína, guaranína o mateína.

La cafeína ha sido consumida durante siglos a pesar de los intentos repetidos de prohibir su uso por motivos morales, económicos, médicos o políticos. El descubrimiento del café tuvo lugar en el siglo IX en Arabia y se cultivó por primera vez en Etiopía. En el siglo XV se desarrolló la técnica de tostar y moler los granos de café y el consumo de los productos con cafeína se expandió rápidamente por todo el mundo.

La cafeína es una sustancia que se encuentra en ciertas plantas naturales y puede producirse sintéticamente en laboratorio. Se localiza en cantidades variables en las semillas, las hojas y los frutos de algunas plantas, donde actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertos insectos que se alimentan de las plantas. Se encuentra en el café, té, chocolate, yoco, cacao y, en bebidas de cola y energéticas. También se encuentran en bebidas que contienen guaraná y a menudo como ingrediente en los suplementos de pérdida de peso y energizantes, las bebidas deportivas, preparaciones herbales y analgésicos.

El café es una de las fuentes de cafeína consumidas con mayor frecuencia aunque los expertos recomiendan generalmente limitar la ingesta en torno a 300 mg al día.



# CAPÍTULO 2: EL CAFÉ

## 2.1. EL CAFÉ

El café es una bebida que se obtiene de las semillas tostadas de las plantas del café o cafetos (*Coffea spp*). Los cafetos son arbustos de hoja perenne de la familia de las Rubiáceas.



**Figura 1.** Planta de café o cafetos (*coffea spp*).



Estos producen flores de color blanco que producen frutos de color rojizo. La parte interior del fruto contienen dos semillas o granos de café. Hay algunas especies de cafetos que solo producen una única semilla por fruto, se conocen como "café perlado".

Los granos de café o semillas son la parte del fruto que contiene más cafeína.

### *2.1.1. Composición*

Los granos de café poseen más de 2.000 sustancias diferentes (cafeína, minerales, lípidos, trigonelinas, aminoácidos – proteínas, ácidos alifáticos, glicósidos y carbohidratos) de tal manera que el café no es «solo cafeína» (1, 3, 7-trimetilxantina), sin embargo es el ingrediente farmacológicamente más activo. Las dimetilxantinas derivadas (teofilina y teobramina) también se encuentran en una variedad de especies de plantas.

El café tiene múltiples componentes. Los granos de **café crudos** tienen una composición diferente entre la variedad Arábica y la Robusta.



*Figura 2. Granos de café verde*

En la variedad Arábica, la cafeína comprende el 1,2% de la materia seca, 4,2% minerales, de los cuales 1,7% es potasio; 16% lípidos, 1,0% trigonelinas, 11,5% proteínas y aminoácidos, 1,4% ácidos alifáticos, 6,5% despidos (ácidos clorogénicos), 0,2% glucósidos y 58% carbohidratos. En la variedad Robusta, la cafeína comprende el 2,2% de la materia seca, 4,4% minerales, de los cuales 1,8% corresponden al potasio; 10% lípidos, 0,7% trigonelinas, 11,8% proteínas y aminoácidos, 1,4% ácidos alifáticos, 10% ácidos clorogénicos y 59,5% glucósidos trazas y carbohidratos. El contenido de agua de los granos de café crudo comercial varía entre 8% y 12%.

La composición de los **granos de café** se altera de forma dramática por el proceso de **tostado**, y pierde gran cantidad de agua (posee apenas 1% a 5%), proteínas, ácidos clorogénicos y carbohidratos (Tabla 1).



*Figura 3. Granos de café tostados*

**Tabla 1.** Composición de los granos de café tostado medio (porcentaje en base seca)

Componente	Variedad Arábica	Variedad Robusta
Cafeína	1,3	2,4

### 2.1.2. Tipos de café

Existen aproximadamente unas 40 especies de cafetos, pero la bebida del café se obtiene fundamentalmente de tres plantas: El cafeto de Arabia, el cafeto robusta y el cafeto liberica.

- **El cafeto de arabia** (*Coffea arabica*) Es un arbusto que crece unos 12 metros de altura en estado natural. Procede de las montañas de Etiopía. Constituye la especie más importante en la actualidad y la que produce un café de mayor calidad.
- **El cafeto robusta** (*Coffea canephora*) Es un árbol o arbusto de unos 10 metros de altura. Procede de África occidental, aunque se cultiva en muchas zonas tropicales. Es una especie más fácil de cultivar que la arabica ya que resiste mejor las enfermedades.
- **El cafeto liberica** (*Coffea liberica*) Es un árbol que puede alcanzarlos 18 m de altura. Procede de Liberia, en el oeste de África, aunque se cultiva principalmente en Indonesia. Produce semillas más grandes que proporcionan poco sabor.

### 2.1.3. Características del café

En este apartado, se intenta describir cuales son las características del café y lo que se percibe con los sentidos.

Los granos de café, según su procedencia, tienen generalmente características distintivas como:

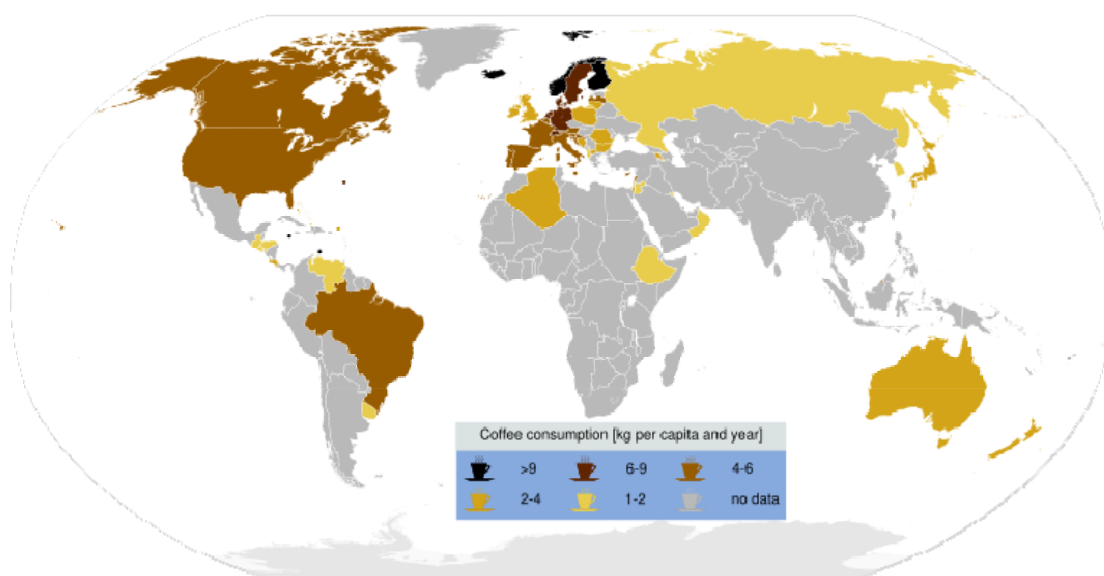
- **Sabor:** los criterios sobre el sabor incluyen términos como cítrico o terroso, caramelizado, afrutado, acidez, amargor, sabor aterciopelado...
- **Aroma:** los criterios sobre los olores incluyen términos como suave, delicado, único, exclusivo, intenso...
- **Intensidad:** ligero, suave, medio, intenso, equilibrado...
- **Cuerpo:** Hace referencia al tacto en el paladar según sea su espesor, densidad, viscosidad o cremosidad.
- **Persistencia:** Hace referencia al tiempo que dura en el paladar y se detectan las notas de aroma.

Éstos dependen del ambiente local donde crecen las plantas de café, su método de proceso, y la subespecie genética o varietal. Así, los cafés presentan un gran abanico de sabores, y las variedades más valoradas y más raras alcanzan precios muy elevados.

En el café tostado se identifican más de 700 sustancias volátiles, las cuales corresponden a cerca del 0,1% del total de la materia. Las características químicas y el aroma de los constituyentes volátiles del café han sido motivo de importantes estudios; hoy en día se conocen cientos de aromas, que según los expertos superan las del vino.

#### 2.1.4. Países consumidores de café

Los países que consumen una mayor cantidad de café en kilogramos por persona y año son: Finlandia (12 Kilogramos/persona/año), Noruega (9,9), Islandia (9), Dinamarca (8,7), Países bajos (8,4), Suecia (8,2), Suiza (7,9), Alemania (6,9), Aruba (6,8), Luxemburgo (6,8), Canadá (6,5), Austria (6,1), Bosnia-Herzegovina (6,1), Italia (5,9), Eslovenia (5,8), Brasil (5,6), Grecia (5,5) y Croacia (5,1).



**Figura 4.** Países consumidores de café en kilogramos por persona y año

Para el consumo hay dos variedades importantes:

- **Arábica:** da el café de mejor calidad, posee un sabor mucho más suave y rico que el Robusta, un aroma complejo, poca acidez y poca cafeína (entre 0,7 y 1,5%). Por todo esto suele ser más caro.
- **Robusta:** da un café de peor calidad, posee un sabor menos sabroso y más ácido, es menos aromático y contiene el doble de cafeína que el Arábica (entre un 2 y un 3,5%). Por esto suele ser muy utilizado en la elaboración de café instantáneo y otros cafés más baratos.

### *2.1.5. Países productores de café arábica y robusta*

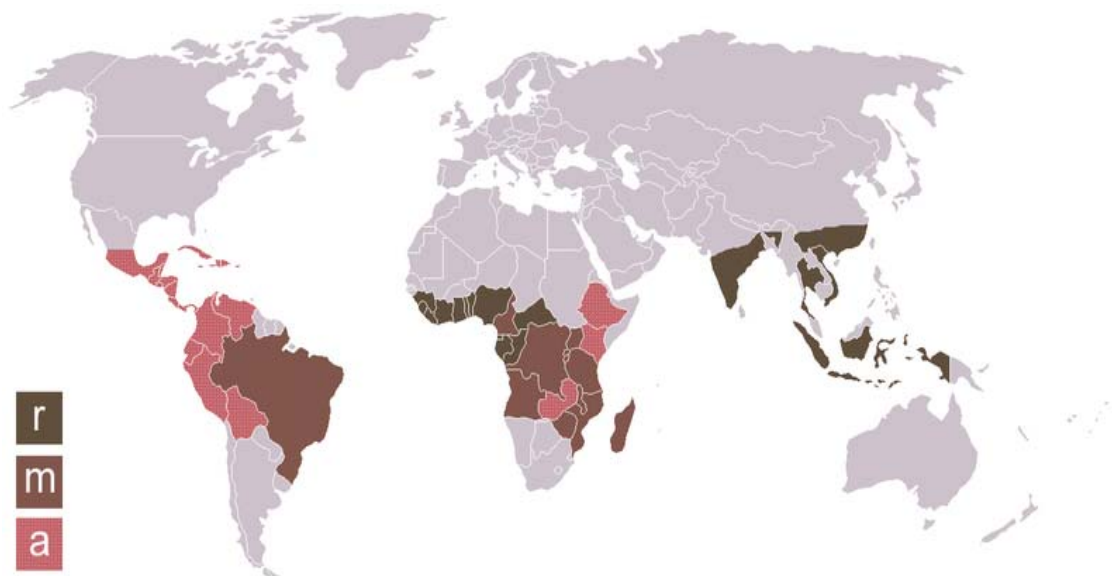
Aunque la imagen de las plantaciones de café se asocie a menudo con la de inmensos terrenos que se pueden encontrar en diversos países, la producción mundial de café proviene, alrededor de un 70%, de explotaciones principalmente familiares de superficie inferior a 10 hectáreas, incluso generalmente por debajo de cinco hectáreas.<sup>[1]</sup>

Al tratarse de pequeños agricultores, el cultivo del café da trabajo a un enorme número de personas, ya que la recolección, muy raramente mecanizada, requiere un tiempo de mano de obra importante que constituye la parte fundamental del coste de producción. Así pues, sólo en Brasil, se estima entre 230.000 y 300.000 el número de agricultores que viven del café y 3 millones el número de personas empleadas.

De todas las especies de café, sólo se cultivan diez, y de dos de ellas se obtiene el 90% de la producción mundial de café: *Coffea arábica* y *Coffea canephora* (Robusta).

Existen dos variedades principales de cultivo en estas plantaciones:

- **Arábica:** Sus plantas, sin embargo, son delicadas de cultivar pero, a pesar de ello, su cultivo asciende a más de un 60% en el comercio mundial. Aunque es originario de Etiopía y se cultiva principalmente en Brasil, Colombia y Centroamérica, también se produce en países como Brasil, Camerún, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Guatemala, Nicaragua, Haití, Jamaica, Java, Kenia, México, Perú, Bolivia, Puerto Rico, República Dominicana, El Salvador, Tanzania, Honduras y Venezuela.
- **Robusta:** Es más resistente que el arábico (de ahí su nombre de «robusta»). Aparece en Uganda y pronto se descubre su alta resistencia contra el calor, las enfermedades y los parásitos. Su cultivo llega casi al 40% y suele utilizarse para la fabricación de café soluble o instantáneo y mezclas que es donde se aprecia su carácter fuerte. Se cultiva principalmente en África Central y Oriental, Sudeste de Asia y Brasil.



**Figura 5.** Distribución geográfica de producción de los diferentes cultivos (r: robusta, a: arabica, m: robusta y arabica).

Las plantaciones pueden hacerse completamente al descubierto, lo que facilita la organización de las operaciones de cultivo y aumenta la producción frutal al aprovechar al máximo la radiación solar, siempre y cuando no hayan otros factores limitantes como la fertilidad del suelo, la disponibilidad de agua, entre otros; pero disminuye la longevidad y la resistencia a las enfermedades de los cafetos ya que obliga a la planta a incrementar sus actividades fisiológicas, como fotosíntesis y transpiración.

Por otra parte, las plantaciones pueden hacerse a semisombra (se habla de café de sombra), lo que mejor se corresponde con la autoecología de la especie, pero reduce la productividad y complica la gestión. Hay numerosos métodos de cultivo de sombra, desde la plantación directa en bosque hasta sabias combinaciones de árboles de refugio cortados en función de la fase de fructificación de los cafetos o hasta sistemas de policultivo. Las plantaciones de sombra inducen generalmente una mejor biodiversidad, aunque muy variable en calidad según los sistemas empleados y en relación al estado inicial natural.

#### *2.1.6. Tipos de café según su Origen*

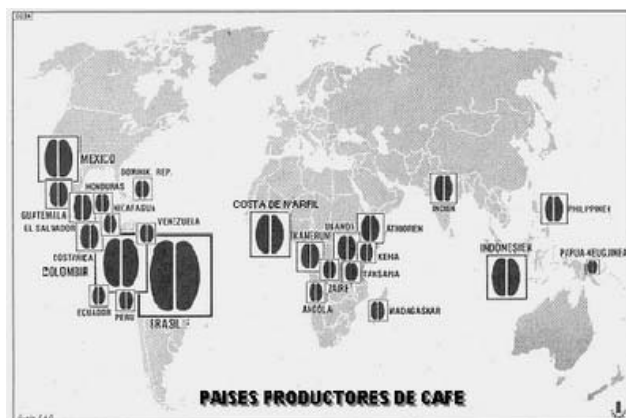
Según el lugar donde se producen tenemos los siguientes tipos de café:

- Cafés americanos:
  - Café de Colombia
  - Café del Brasil
  - Café de Costa Rica
  - Café de Guatemala
  - Café de Jamaica
  - Café de Nicaragua
  - Café del Perú
  - Café de México
- Cafés árabes:
  - Café moka
- Cafés africanos:
  - Café de Tanzania
  - Café de Kenia
  - Café de Etiopia
- Cafés de Asia:
  - Café de la India
  - Café de Java
  - Café de Sumatra
  - Café de Célebes
- Café de Hawai.

### 2.1.7. Países exportadores e importadores de café

El café es la segunda mercancía comercializada en el mundo, tras el petróleo. Se estima en 125 millones el número de personas que vive del cultivo del café, incluyendo 25 millones de pequeños productores. Cada año se beben 400.000 millones de tazas de café. Por tanto, en juego hay muchos intereses económicos y sociales extremadamente importantes.

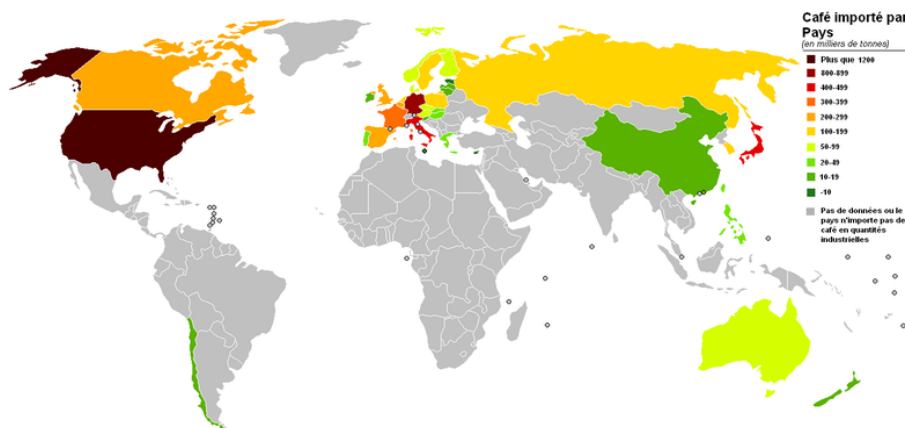
Los mayores exportadores del café son los sudamericanos. Colombia y Brasil han exportado desde hace décadas millones de toneladas de éste producto a todo el mundo. Los principales exportadores de café son Colombia, Brasil, Vietnam, Indonesia, Etiopía, México, India, Perú, Guatemala y Honduras.



**Figura 6.** Países productores de café

Los países importadores que forman parte de la Organización Internacional del Café son: Colombia, Alemania, Austria, Bélgica, Chipre, Dinamarca, España, Estonia, Eslovaquia, Eslovenia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Japón, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Polonia, Portugal, República Checa, Reino Unido, Suecia, Suiza, Estados Unidos de América y la Comunidad Europea.<sup>[1]</sup>

Seis empresas adquieren casi la mitad de la producción mundial: Kraft, Nestlé, Procter & Gamble, Sara Lee, y la Federación Nacional De Cafeteros, cuyas ventas anuales generan beneficios del orden de mil millones de dólares.



**Figura 7.** Países importadores de café

## 2.2. ELABORACIÓN DEL CAFÉ

### 2.2.1. Cosecha y preparación de los granos

#### Cosecha

Cuando los frutos llegan a la madurez, de 6 a 8 meses después de la floración para el arábica y de 9 a 11 meses para el robusta, puede comenzar la cosecha del café. Se emplean dos métodos: la recolección o el despallado.

- **La recolección** consiste en recoger manualmente sólo los granos de café maduros en su punto. Es la técnica más costosa, que obliga a pasar durante días varias veces sin interrupción por el mismo arbusto pero que obtiene las mejores calidades de café.
- **El despallado** consiste en raspar la rama de las cerezas. Este método puede ser mecanizado. Se recoge por esta técnica expeditiva una mezcla heterogénea de cerezas más o menos maduras, y es el origen de cafés más ácidos (debido a los frutos aún verdes).

En el Departamento de Caldas (Colombia), la cosecha de café se realiza en los meses de septiembre, octubre y noviembre. El café maduro, de color rojo se recolecta prontamente para evitar su caída; los pequeños productores, dan inicio al proceso de transformación del café mediante el despulpado de los frutos, labor que se ejecuta generalmente con la utilización de máquinas conocidas comúnmente como "despulpadoras", las cuales retiran la pulpa de los granos para posteriormente realizar el lavado y preseleccionamiento de los mismos. Posteriormente los granos se secan ya sea con ayuda del sol o por medio de secadoras industriales. Para obtener café calidad "federación" se deben seleccionar los granos de acuerdo con los estándares señalados por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

#### Procesamiento

Inicialmente los granos de café recién cogidos se procesan, ya sea mediante el método seco, o el húmedo.

- **Método mojado**

Se emplea el proceso seco para el café Robusta y gran parte del café Arábica de Perú, Brasil y Etiopía. Se secan los granos al sol y luego se muelen para eliminar la capa exterior, el mucílago seco, la vitela y la cáscara plateada. El proceso de molienda se realiza en las instalaciones grandes. Los desperdicios pueden servir como combustible, o también, como alimento para los animales.

El secado se practica sobre superficies de secado, donde se rastrillan las cerezas de café y se extienden regularmente. Después de algunos días, la parte carnosa ya deshidratada se separa.

- **Método húmedo**

Por otra parte, el proceso húmedo, que se emplea para obtener el café Arábigo de más alta calidad, puede provocar seria contaminación. Los granos maduros se lavan primero para eliminar los más livianos y la basura, luego se reducen a pulpa para quitar la capa exterior y parte del mucílago que se encuentra debajo de ésta. En seguida, es necesario fermentar los granos, recién reducidos a pulpa, en los tanques respectivos. Este proceso enzimático descompone las otras capas de mucílago, formando un afluente que puede causar serios problemas de contaminación, al descargarlo directamente a los arroyos o ríos. Luego de un lavado final, el café ahora llamado «vitela», se seca al sol o artificialmente. Luego, el café se descascara para quitar la capa plateada y la de vitela, produciendo el café en grano «limpio» o «verde» que se comercializa internacionalmente.

La mayor parte del café verde del mundo pasa por algún tipo de proceso de lavado, entre ellos la mayoría del café de calidad superior.

El lavado se aplica a frutos bien maduros. Después de ser recogido, el café verde es clasificado por inmersión en agua. Los frutos malos o inmaduros flotarán y los frutos buenos y maduros se hundirán. La piel de la cereza y parte de la pulpa es eliminada presionando el grano mediante una máquina sumergida a través de una rejilla. El grano todavía tendrá una cantidad significativa de pulpa adherida que necesita ser quitada. Así se obtienen *café lavados*, descritos como «propios y brillantes», generalmente menos ácidos y de mejor sabor. La técnica, a menudo mecanizada, necesita disponer de cubas y de un suministro de agua suficiente.

El proceso húmedo requiere una gran cantidad de agua y puede provocar serios problemas de contaminación. Se puede reciclar la mayoría de caudal para economizar agua, y, al hacer esto, se concentra el contenido de enzimas en el agua, para el proceso de producción de pulpa, y esto facilita la fermentación. El agua utilizada para el lavado final puede verterse directamente a los ríos, pero el otro afluente debe pasar por los pozos de filtración.

Después del secado o el lavado, el grano de café se encuentra aún encerrado en el núcleo del fruto (el endocarpio): es el *café coque* (después de secado) o el *café parche* o *vitela* (después de lavado). Es necesario clasificarlo, con el fin de eliminar cualquier haba descompuesta, descolorada o dañada. La selección puede mecanizarse, en las instalaciones industriales, con ayuda de cámaras con CCD, pero esta operación se hace a menudo manualmente, en los países en desarrollo.

El café puede conservarse protegido por su propia cáscara durante un cierto tiempo. Algunas cosechas incluso se envejecen para mejorar el sabor del café.

La última operación de preparación, que permite obtener el *café verde*, consiste en descascarillar mecánicamente los granos. Luego, el café se descascara para quitar la fina capa plateada (el *tegumento*) y la de vitela,



produciendo el café en grano «limpio» o «verde» que se comercializa internacionalmente. Las cáscaras se recuperan y se utilizan como combustible.

Son los granos secos o lavados, luego descascarillados, los que se comercializan en los mercados internacionales.

- **Semi-húmedo**

El semi-húmedo es un proceso híbrido con un uso muy limitado en Brasil y Sumatara/Célebes. Se pasa la cereza a través de un rastrillo para eliminar la piel y parte de la pulpa como en el proceso húmedo pero el producto resultante es secado al Sol y no fermentado ni cepillado.

## **Pasos adicionales**

- **Clasificación**

Una vez que el café se ha secado y pasa a ser café verde, se clasifica a mano o máquina para quitar las impurezas y los granos malos o deformes. Además, el café también es clasificado por tamaño.

- **Pulido**

Algunos granos de café se pulen para quitar la piel de plata. Esto se hace para mejorar el aspecto de los granos de café verde y para eliminar los desperdicios que se hayan producido en el tueste.

- **Almacenamiento**

El café verde es bastante estable si se almacena de forma correcta. Debe guardarse en contenedores que transpiren —a menudo algún tipo de saco de fibra— y lo mantengan seco y limpio.

- **Envejecimiento**

Todo el café, cuando fue introducido en Europa, venía del puerto de Moca, en lo que se conoce actualmente como Yemen. Para importar los granos a Europa, el café iba en barcos en un trayecto muy largo rodeando el continente africano. Estos largos viajes y la exposición al aire del mar cambiaba el sabor del café. Una vez que el Canal de Suez fue abierto, el tiempo del trayecto hacia Europa se redujo enormemente y comenzó a llegar café cuyo sabor no había sido alterado. En cierta medida, este café más fresco fue rechazado porque los europeos se habían acostumbrado al sabor anterior.

Para intentar lograr un sabor parecido al anterior, parte del café se envejecía en grandes almacenes al aire libre en los puertos durante seis o más meses en un intento de simular los efectos de los largos viajes en mar.

Aunque todavía se debate ampliamente, se cree que ciertos tipos de café verde mejoran con los años; especialmente aquellos valorados por su baja acidez, como los cafés de Indonesia o India. Varios de los productores de estos cafés venden granos de café que han sido envejecidos unos 3 años, y algunos llegan incluso a 8 años. Sin embargo, la mayor parte de los expertos

en café están de acuerdo en que el punto más alto de sabor y frescura del café se logra un año después de la cosecha, ya que los granos de café envejecidos en exceso pierden gran parte de su contenido en aceites esenciales.

- **Descafeinamiento**

La semilla de cafeto contiene un 2% de cafeína. Ya en 1943 se comprobó que un gramo diario de cafeína (equivalente a 10 tazas de café express o a 5 de café filtrado por goteo), absorbido durante una semana basta para inducir un cuadro carencial o síndrome de abstinencia.

El descafeinamiento es un procedimiento cuyo objetivo consiste en proporcionar el sabor del café, pero sin los efectos excitantes de la cafeína.

El primero en llevar a cabo el procedimiento fue el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge en 1820 después de que su amigo, el poeta Goethe, le sugiriera que analizara los componentes del café para descubrir la causa de su insomnio. Runge también fue el descubridor de la cafeína.

Sin embargo, el verdadero progreso técnico trascendental no se produjo hasta la vuelta del siglo, en 1903, cuando Ludwig Roselius, un importador alemán, decidió pretratar los granos de café con vapor antes de ponerlos en contacto con el solvente extractor de la cafeína. De esta forma, al aumentar la superficie de los granos húmedos e hinchados se facilitaba la eliminación de la cafeína, haciendo posible producir café descafeinado a escala comercial por primera vez. El café descafeinado se introduce en Estados Unidos bajo la reconocida marca Sanca (derivado de sans caffeine, o sea, «sin cafeína» en francés). Posteriormente la marca fue adquirida por la compañía de alimentos General Foods.

La disminución del contenido en cafeína se hace a costa de las cualidades gustativas. Se utilizan varios métodos. El principio general, basado en el de Roselius, consiste en empapar los granos en agua, extraer la cafeína del líquido así obtenido por adición de solvente orgánico o por adsorción sobre carbón activo, y finalmente volver a empapar los granos en el líquido empobrecido en cafeína para que reabsorban los otros compuestos siempre presentes. El solvente, principalmente el acetato de etilo que se encuentra en los frutos, nunca está en contacto con los granos, sólo con el agua con la cual se empapa el grano. Existe también un método de descafeinamiento que utiliza un chorro de dióxido de carbono bajo presión.

## **Tueste y torrefacción**

- **Tueste del café**

Llegados a su destino, los granos son **tostados**, lo que desarrolla su aroma y les da su color oscuro. En algunos países, el tueste se hace añadiendo hasta un 15% de azúcar a los granos de café, en cuyo caso el proceso se denomina torrefacción y el café resultante, con un sabor algo más vigoroso y granos de brillo aceitoso a consecuencia del caramelo depositado, **café torrefacto**. A continuación los granos se muelen.

Con el tueste, los granos duplican su tamaño. Al principio de la aplicación del calor, el color de los granos verdes pasa a amarillo, luego a marrón canela. Es en ese momento cuando el grano pierde su humedad. Cuando la temperatura en el interior alcanza alrededor de 200 °C, salen los aceites de los granos. En general, cuanto más aceite hay, más sabor tiene el café.

Durante el tueste, los granos se agrietan de una forma similar a la de las palomitas de maíz que explotan bajo calor. Hay dos momentos de «explosión» que se utilizan como indicadores del nivel de tueste alcanzado.



**Figura 8.** Niveles de tueste: rubio, canela, medio, ropa de monje, marrón, marrón oscuro, italiano (o seminegro), francés (negro).

Los granos se vuelven más oscuros y liberan aún más aceite hasta que finaliza el tueste, y son retirados de la fuente de calor.

Hasta el siglo XIX se compraban los granos verdes y su tostado se hacía con estufa. En 1900 la empresa Hill Brothers inventa el envasado en vacío de café tostado, que conservaba el sabor y aroma por más tiempo. Esto cambiaría la forma de consumir café y sentenció la vida de las tostadoras locales.

## Preparación de la bebida

### • La molienda

El grado de espesor de la molienda tiene un impacto importante en el proceso de elaboración de la bebida, y es crítico saber combinar la consistencia del grado de fineza del café con el método de elaboración para poder extraer un sabor óptimo de los granos tostados. Los métodos de la elaboración del café que exponen la molienda de café a agua calentada durante mucho tiempo necesita que las partículas tengan un mayor grosor que si, en cambio, se utilizan métodos más rápidos. Los granos que se muelen demasiado para un determinado método de elaboración expondrán demasiada área superficial al agua caliente y producirán un gusto amargo y áspero. En el otro extremo, si se muele poco y se dejan partículas excesivamente gruesas, se producirá un café débil, acuoso y falto de sabor.

El índice de deterioro aumenta cuando el café está molido, como resultado de la mayor área superficial expuesta al oxígeno. Con el aumento del café como bebida de *gourmet* se ha hecho muy popular moler los granos en casa justo antes de elaborar la bebida, y hay disponibles muchos aparatos electrodomésticos que permiten realizar este proceso.

Hay varios métodos para producir la molienda de café para elaborar la bebida:

- Molienda: basada en dos elementos giratorios que machacan o que «rasgan» el grano con menos riesgo de quemarse. Las cuchillas pueden tener forma redonda o cónica; los últimos son más silenciosos y se atascan menos. Las cuchillas «muelen» el café a un tamaño razonablemente constante, lo que produce una extracción más uniforme cuando se elabora la bebida. Los expertos en café consideran que el molinillo es el único método aceptable de moler el café.
- Picado: La mayoría de molinillos modernos realmente pican el grano en pedazos (y algunos bebedores de café utilizan simplemente una licuadora casera para realizar el proceso). Aunque gozan de una vida mucho más larga antes de que se desgasten las cuchillas, los resultados son peores, produciendo una molienda poco homogénea y, en consecuencia, darán lugar a una extracción inconsistente y a un producto degradado en la taza.
- Machacado: El café turco es producido por infusión con una molienda de una fineza casi impalpable. En ausencia de un molinillo con una calidad suficiente, la única forma fiable de alcanzarlo es golpear los granos en un mortero.

### **Café instantáneo.**

El café instantáneo y soluble es café seco en polvo o granulado, que se puede disolver rápidamente en agua caliente para ser consumido.

En 1881, un químico estadounidense llamado Satori Kato presentó el primer café instantáneo durante la Feria del Mundo Panamericano. Sin embargo se debe a Federico Lehnhoff (inventor) y George Washington el primer esfuerzo que llevó a la fabricación comercial. Hay sugerencias de que se inspiró viendo polvo seco en el borde de una taza de café de plata.<sup>[11]</sup> Federico Lehnhoff Wyld, un guatemalteco-alemán, también creó un proceso de café instantáneo en aquella época,<sup>[12]</sup> el cual vendió más tarde en Europa; ya que Lehnhoff era el médico de cabecera de Washington, se ha sugerido que el descubrimiento no fue independiente.

Para obtener el café soluble se utilizan dos procesos distintos: el secado por aspersión y la liofilización. En los dos casos, el tueste del café se hace a menor temperatura (entre 190 y 210 °C) y a continuación es molido y solubilizado en agua caliente. El líquido obtenido se centrifuga y luego se seca. El secado por aspersión se realiza por aire caliente, mientras que en la liofilización se realiza por congelación brusca a bajas temperaturas.

El café obtenido equivale aproximadamente a una tercera parte del peso del café verde.

Gracias a Nestlé, que desarrolló su café soluble *Nescafé* en 1938, los soldados estadounidenses pudieron tomar café en sus puestos de combate durante la II Guerra Mundial.

### 2.2.2. Tipos de café según su procesado

- Café natural (100% tueste natural)
- Café torrefacto (100% tueste con azúcar)
- Café mezcla (50% tueste natural y 50% tueste torrefacto)
- Café mezcla (70% tueste natural y 30% tueste torrefacto)
- Café mezcla (30% tueste natural y 70% tueste torrefacto)
- Café tueste natural descafeinado (100% tueste natural)
- Café tueste mezcla descafeinado (50% tueste natural y 50% tueste torrefacto)
- Café tueste mezcla descafeinado (70% tueste natural y 30% tueste torrefacto)
- Café tueste mezcla descafeinado (80% tueste natural y 20% tueste torrefacto)
- Café expresso natural
- Café expresso mezcla
- Café expresso descafeinado
- Café soluble natural
- Café soluble mezcla
- Café soluble descafeinado

Dependiendo del procesado al que es sometido el café, se obtiene una mayor o menor cantidad de cafeína. Por lo general los cafés con tostado natural o mezcla son los que tienen una mayor cantidad de cafeína, seguidos de los cafés instantáneos. Los que menos cantidad tienen son los cafés naturales o mezclas descafeinados, seguidos de los cafés instantáneos descafeinados que son los que menos tienen de todos.

**Tabla 2.** Contenido de cafeína en diferentes productos

	Volumen/peso	Rango de cafeína (mg)	Promedio de cafeína (mg)
<b>Café</b>			
Tostado	100 ml	41-83	60
Instantáneo	100 ml	27-72	50
Tostado descafeinado	100 ml	0,4-7	2,4
Instantáneo descafeinado	100 ml	5-1	3

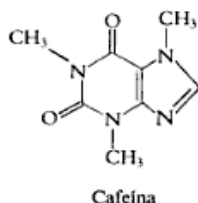
# CAPÍTULO 3: LA CAFEÍNA EN EL CAFÉ

## 3.1. EL PAPEL DE LA CAFEÍNA EN EL CAFÉ

### 3.1.1. *Propiedades químicas de la cafeína*

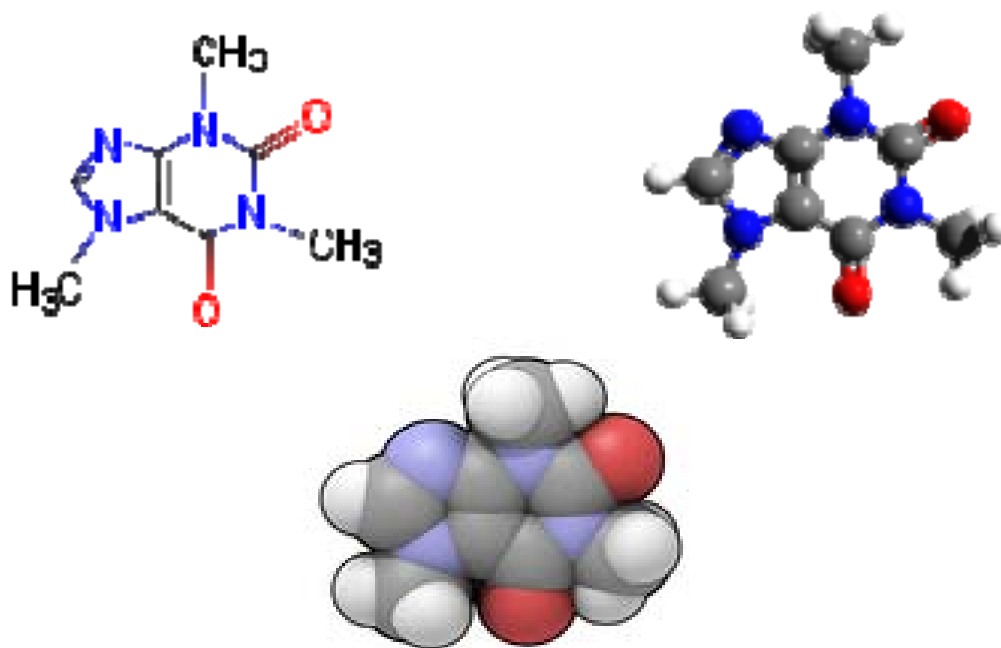
La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, concretamente pertenece a la familia de las metilxantinas. Las bases xánticas o púricas son alcaloides derivados de la purina. Concretamente, provienen del anillo de la purina que se forma a través de la condensación de una pirimidina con un imidazol. Poseen una estructura cristalina y su fórmula molecular es  $C_8H_{10}N_4O_2$ .

Las más importantes son las metilxantinas: cafeína, teofilina y teobromina, conocidas respectivamente como 1,3,7-trimetilxantina, 1,3-dimetilxantina y 3,7-dimetilxantina.



**Figura 9.** Estructura molecular de la cafeína

La fórmula química de la cafeína es  $C_8H_{10}N_4O_2$ , con una masa molecular de 194,19 g/mol. Es una molécula química aquiral, y por lo tanto, no tiene enantiómeros ni tiene estereoisómeros. Presenta la siguiente fórmula molecular:



**Figura 10.** Estructura molecular de la cafeína

Su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina, 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona. También es conocida como trimetilxantina, teína, mateína, guaranína, metilteobromina o metilteofilina, ya que se obtiene por extracción de materiales vegetales como el café, té, guaraná, chocolate, yerba mate o la nuez de cola.

En estado puro es un sólido cristalino blanco inodoro en forma de agujas blancas o polvo, con un gusto muy amargo, que tiene una densidad de 1,23 g/ml, un punto de fusión de 237 °C y es eflorescente en contacto con aire. A presión atmosférica sublima a 176 °C, sin descomposición. También, puede cristalizar en forma de prismas hexagonales.

Esta sustancia es soluble en agua y es función directa de la temperatura. A 25 °C se disuelven 22 mg de cafeína en 1 ml de agua, mientras que a 80 °C se diluyen 180 mg/ml y a 100 °C lo hacen 670 mg/ml. Es muy soluble en agua hirviendo en la que cristaliza como monohidrato, ya que va perdiendo progresivamente la molécula de agua, hasta que lo hace totalmente a los 100 °C.

Sin embargo tiene más afinidad por algunos disolventes orgánicos, como el cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y el diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), que a su vez son casi inmiscibles en agua.

La cafeína puede formar combinaciones estables con sales alcalinas de ácidos débiles, como el benzoato y silicato de sodio, pero su reacción con ácidos da lugar a compuestos muy inestables. Se descompone fácilmente por la acción de álcalis calientes y por cloro.

### *3.1.2. Vida media y eliminación de la cafeína*

Casi el 100% de la cafeína ingerida, es rápidamente absorbida a partir del tracto gastrointestinal, aumentando su concentración en el plasma sanguíneo a un nivel máximo ( $M_{\text{áx.}}$ ) en unos 30-45 minutos. Una vez integrada en el torrente circulatorio, la cafeína se introduce rápidamente en todos los tejidos corporales. Para su excreción, dada su gran capacidad de permear las membranas, la cafeína debe transformarse en sus metabolitos.

El periodo de semieliminación de la cafeína (el tiempo requerido para que el cuerpo elimine la mitad de la presente en el plasma sanguíneo, es decir, la vida media) oscila entre horas y días, dependiendo de la edad, el sexo, la mediación y las condiciones de salud. Los recién nacidos carecen de los enzimas precisos para metabolizar la cafeína; en ellos, el tiempo de semieliminación es de 3-4 días. En los fumadores es más breve (3 horas) que en los no fumadores (3-7 horas). En las mujeres gestantes es de 18 horas y en los pacientes con insuficiencia hepática (deterioro severo de la función hepática; del hígado) es también más prolongado que en los que no tienen trastornos de esta naturaleza.

### *3.1.3. Propiedades fisiológicas de la cafeína en el café*

La cafeína es el estimulante leve psicoactivo más consumido en el mundo y se encuentra en bebidas no alcohólicas como el café.

El café es un estimulante del sistema nervioso central por su elevado contenido en cafeína. Las preparaciones con las semillas de café se utilizan como remedio habitual para estimular el organismo. De esta manera, se usa para mantenerse despierto evitando la somnolencia, para estimular la mente y aumentar la energía del organismo.

Aunque más débil que otros estimulantes, la cafeína puede producir síntomas de intoxicación, tolerancia y abstinencia causados por esta sustancia en algunos individuos.

Tiene efecto diurético y estimulante del miocardio. Relaja los músculos lisos, favorece la vasodilatación, contrae las arterias cerebrales, aumenta la secreción ácida del estómago y potencia la contracción del músculo esquelético.

Pero en grandes dosis pueden elevar el humor, causar insomnio, aumentar la irritabilidad, inducir ansiedad y disminuir el cansancio. La ingesta crónica o intensa, causa intoxicación que se manifiesta con nerviosismo, insomnio, hiperacidez gástrica, contracciones musculares, confusión, taquicardia o arritmia cardíaca y agitación psicomotriz.





# **CAPÍTULO 4: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CAFEÍNA**

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, que actúa como droga estimulante y psicoactiva. Se encuentra en muchas especies de plantas. La fuente habitual de cafeína es el café, pero también se encuentra en el té (teína), guaraná (guaranina), mate (mateína), cacao y refrescos de cola, entre otros. El contenido de cafeína varía enormemente de unas plantas a otras. Dentro de una misma especie también existe gran variabilidad. Así, el contenido en cafeína del café varía dependiendo de la variedad, del tipo de grano y del método de preparación. Las plantas producen cafeína como pesticida natural, a modo de protección mecánica a través de la cual logran paralizar y matar ciertos insectos que se alimentan de la planta.

La determinación de cafeína ha adquirido mucha importancia, debido a su uso en la industria farmacéutica y en la industria de alimentos; ya sea como ingrediente en la elaboración de refrescos y bebidas energéticas o por su presencia en productos como el té, el mate, el cacao y el café. En todos estos casos, el control de calidad del parámetro cafeína es necesario en los productos que la contienen. Por esta razón, se han desarrollado nuevos métodos instrumentales para su determinación en diversas matrices, especialmente en alimentos.

Para elegir una técnica de separación de la cafeína, además de tener en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad, hay que atender a dos tipos de consideraciones: unas tienen que ver con las propiedades físicas y estructurales de las moléculas que se pretende separar, o de las características de la matriz en que se encuentran; otras se derivan de los objetivos del análisis (sensibilidad, resolución, tiempo de análisis, necesidad de una detección específica).

El método de selección incluye los pasos necesarios para la obtención, preparación y posible fraccionamiento de la muestra, la aplicación de la técnica analítica adecuada y el tratamiento de los datos obtenidos.

Las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad pueden englobarse en dos grandes grupos: **técnicas de separación y técnicas espectroscópicas**. Las técnicas espectroscópicas proporcionan, para cada compuesto analizado, una información compleja, relacionada con sus características estructurales específicas, por otro lado las técnicas de separación se utilizan para resolver los componentes de una mezcla y la señal obtenida puede utilizarse con fines analíticos cuantitativos o cualitativos. En la actualidad, las separaciones analíticas se efectúan fundamentalmente por cromatografía y electroforesis.

La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación. El análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración. La columna cromatográfica y la forma con la que se diseña, constituye el corazón de la separación. El detector, situado al final de la columna es el que garantiza la respuesta de los componentes que se separan.

La determinación de la cafeína se suele llevar a cabo mediante técnicas de separación como HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), CE (Electroforesis capilar), TLC (Cromatografía de capa fina) o GC (Cromatografía de gases). Estos métodos realizan la detección mediante técnicas electroquímicas (potenciométricas, conductimétricas, amperométricas, etc.), ópticas (espectrofotométricas, fluorimétricas, etc.) y otras (termoquímicas). La elección de una u otra técnica depende del problema a resolver, del volumen de muestra y de su concentración.

## 4.1. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

### 4.1.1. Introducción a la cromatografía

En 1906, el botánico Ruso M. Tswett realizó un experimento que condujo al descubrimiento de lo que hoy conocemos como cromatografía. Colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades.

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (**fase estacionaria**), la otra se desplaza a lo largo de él (**fase móvil**). La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (**equilibrio de distribución**).

En el experimento de Tswett, la separación de los pigmentos vegetales se logró gracias a que cada uno de ellos tenía una afinidad diferente por las fases. En general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. Por consecuencia, el medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación y mediante el uso de un detector, su caracterización química. Aunque los principios fundamentales son los mismos, se acostumbra clasificar los métodos cromatográficos según el estado físico de la fase móvil.

En una primera etapa la cromatografía de líquidos se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. En este tipo de columnas realizó Tswett sus trabajos originales. Para asegurar unos caudales razonables, el diámetro de las partículas de la fase estacionaria sólida por lo general era de 150 a 200  $\mu\text{m}$ . Incluso así, los caudales eran bajos, llegando a unas pocas décimas de mililitro por minuto. En consecuencia, los tiempos de separación eran largos (varias horas).

Los intentos para acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío, o por bombeo no resultaron efectivos, puesto que el aumento de caudal originaba un aumento de la altura de plato por encima del mínimo característico que se observa en las gráficas de la altura de plato frente al caudal y el resultado era una menor eficacia.

En las primeras etapas del desarrollo de la cromatografía de líquidos, los científicos se dieron cuenta de que se podían conseguir grandes aumentos en la eficacia de la columna disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos. Sin embargo, no fue sino hasta finales de los años sesenta cuando se desarrolló la tecnología adecuada para producir y utilizar rellenos de tamaño de partícula del orden de los 3 o 10  $\mu\text{m}$ . Esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada, que contrasta con las simples columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, que todavía se utilizan con fines preparativos, se emplea la denominación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

#### 4.1.2. Tipos de cromatografía

La cromatografía es un método de separación y análisis basado en el uso de una fase estacionaria y una móvil. Los componentes de una muestra se hacen pasar por una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil de manera que las sustancias se distribuyen entre las dos fases; aquellos solutos cuya relación de distribución sea favorable a la fase estacionaria quedan retenidos por ésta, mientras que los solutos que se encuentran preferentemente en la fase móvil serán los primeros en arrastrar. De esta forma los solutos serán separados en orden creciente a sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria. El conjunto de técnicas que se valen de una fase móvil que se desplaza a lo largo del sistema y una fase estacionaria que permanece fija reciben el nombre de cromatografía.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados:

1. Según el dispositivo utilizado para conseguir poner en contacto la fase estacionaria y fase móvil:
  - **Cromatografía en columna:** consiste en columnas huecas de longitud y diámetro variable en cuyo interior hallamos la fase estacionaria. La fase móvil se hace pasar por ellas ya sea por gravedad o aplicación de presión.
  - **Cromatografía plana:** la fase estacionaria se encuentra sujeta por una placa plana o en papel (cromatografía en capa fina y en papel, respectivamente) y la fase móvil se desplaza por ella mediante capilaridad o influenciada por la gravedad.
2. Según los estados de las fases implicadas, en especial de la fase móvil:
  - **Cromatografía de gases:** En este caso la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) y la fase estacionaria es un sólido (**cromatografía gas-sólido**) o un líquido "sostenido" por un sólido inerte (**cromatografía gas-líquido**). Este tipo de cromatografía siempre es en columna, ya que es la única manera de que la fase móvil gaseosa se mantenga fluyendo, confinada dentro del sistema. La columna puede estar rellena con la fase estacionaria, en forma semejante a la cromatografía líquida, o bien la fase estacionaria puede depositarse sobre las paredes de un tubo muy delgado (0.25mm de diámetro) y largo (hasta 100m). Este tipo de columnas se conocen como columnas capilares y proporcionan la mayor capacidad de separación.
  - **Cromatografía de líquidos:** La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes y la fase estacionaria un sólido que interactúa con las sustancias que se desea separar (**cromatografía líquido-sólido**), o bien un líquido inmiscible con la fase móvil, depositado en la superficie de un sólido (**cromatografía líquido-líquido**).

La cromatografía de líquidos (siempre la fase móvil es un líquido) puede realizarse con diferentes arreglos experimentales:

- **en columna**
- **en papel**
- **en capa fina**

En la cromatografía en columna, la fase estacionaria se encuentra relleno de un tubo; en la cromatografía en papel, la fase estacionaria es la solución acuosa contenida en el interior de las celdas formadas por las fibras de la celulosa, y es por tanto una forma de cromatografía líquido-líquido; en la cromatografía en capa fina, se dispersa sobre una lámina de vidrio o aluminio formando un lecho de espesor uniforme.

- **Cromatografía de fluidos supercríticos** (cualquier sustancia que se halle en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico).
3. Si nos centramos en la cromatografía líquida podemos clasificarla, también, según el mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria:
- **Cromatografía de reparto o partición:** se vale de una fase estacionaria líquida que forma una película sobre un soporte sólido. La distribución del soluto viene dada por el equilibrio entre la fase estacionaria y móvil. Se utiliza para especies poco polares pero no iónicas de masa molecular menor de 104 g/mol.
  - **Cromatografía de adsorción o cromatografía líquido-sólido:** el soluto presente en una fase móvil líquida o gaseosa se adsorbe a las partículas sólidas de la fase estacionaria. La separación de los diferentes solutos se debe al equilibrio entre las fases estacionaria y móvil. Se utiliza para especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos de masa molecular menor de 104 g/mol.
  - **Cromatografía de intercambio iónico:** consiste en hacer pasar una fase móvil líquida sobre una fase estacionaria que presenta grupos iónicos en su superficie de modo que los iones de signo opuesto quedarán retenidos por fuerzas electrostáticas. Se utiliza para especies iónicas de masa molecular menor de 104 g/mol.
  - **Cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía en gel:** Se basa en la habilidad de materiales de porosidad controlada para separar los componentes de una mezcla de acuerdo al tamaño y forma de las moléculas. Se utiliza para solutos con masa molecular mayor de 104 g/mol.
  - **Cromatografía de afinidad:** emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente a la fase estacionaria.

**Tabla 3.** Clasificación de las separaciones cromatográficas

<b>Tipo</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Fase estacionaria</b>	<b>Método de fijación de la fase estacionaria</b>
Reparto o partición	Líquido	Líquido	Adsorbida en un sólido poroso sostenido en una columna tubular
Absorción	Líquido	Sólido	Sostenida en una columna tubular
Papel	Líquido	Líquido	Sostenida en poros de un papel grueso
Capa fina	Líquido	Líquido o sólido	Sólido finamente dividido sostenido sobre una placa de vidrio: el líquido puede absorberse sobre las partículas
Gel o de exclusión por tamaño	Líquido	Líquido	Sostenido en los intersticios de un polímero sólido
Cambio iónico	Líquido	Resina	Resina de intercambio iónico finamente dividida en una columna tubular

Las únicas sustancias que no pueden ser tratadas por cromatografía son las insolubles y aquellas que se descomponen con el solvente o con la fase estacionaria.

Dentro de las técnicas cromatográficas no se incluyen los métodos que utilizan campos eléctricos para separar moléculas cargadas, métodos que se denominan electroseparaciones, electromigraciones o electroforesis.

#### *4.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)*

La instrumentación desarrollada debido al gran avance tecnológico posibilitó la técnica de separación y ésta a su vez obliga a un perfeccionamiento de la instrumentación existente y como consecuencia de este empuje se crea una tecnología de alta calidad, que puede aplicarse ya a la cromatografía en fase líquida.

La mejor forma de comprender lo que es actualmente la cromatografía líquida de alta resolución, denominada por las siglas de su nombre en castellano "CLAR" o bien en inglés "HPLC" (High performance liquid chromatography), será compararla con la cromatografía de columna clásica (CC) que es su predecesora y enumerar las ventajas que tiene sobre ella, como son:

- Posibilidad de volver a utilizar la columna multitud de veces.
- Columnas más eficaces con menos longitud.
- Continuidad de flujo.
- Resultado continuo (detector en continuo).
- El tiempo necesario para efectuar una separación se reduce a una centésima parte.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, es la técnica de separación más ampliamente utilizada actualmente. Las razones de su popularidad las encontramos en su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de gran interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y gran variedad de sustancias inorgánicas.

En cromatografía líquido-líquido, la fase móvil es un líquido que fluye a través de la columna que contiene la fase estacionaria. La fase estacionaria es un líquido que recubre el interior de un tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. La cromatografía líquida se lleva a cabo en la columna. Se coloca la muestra y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad.

El fluido que entra por la columna se llama eluyente. El fluido que sale por el extremo de la columna se llama eluato:



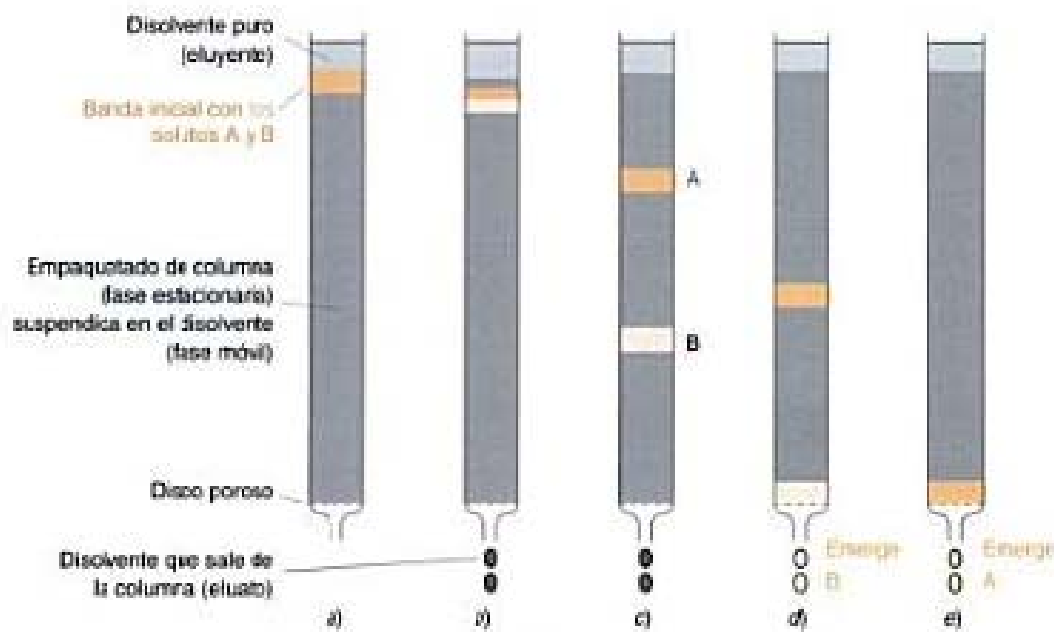
**Figura 11.** Dibujo de la entrada y salida de la columna

El proceso de paso de un líquido o un gas a través de una columna cromatográfica se llama elución.

Las separaciones están basadas en las diferencias de la velocidad de migración entre los componentes de la muestra, que vienen condicionadas por la naturaleza de los analitos y su interacción con las fases.

Como se muestra en la figura 12 el reparto de solutos entre las fases móvil y estacionaria dan lugar a la separación.





**Figura 12.** Representación esquemática de una separación cromatográfica. El soluto A, que tiene una mayor afinidad que el soluto B por la fase estacionaria, permanece en la columna más tiempo.

Para aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de la fase fija se disminuye hasta micras, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir.

#### 4.1.4. Cromatografía de partición o reparto

La cromatografía de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado. En el pasado, la mayoría de las aplicaciones se han referido a compuestos polares no iónicos de baja a moderada masa molecular < 3000. Sin embargo, recientemente se han desarrollado algunos métodos que han extendido las separaciones de reparto a los compuestos iónicos.

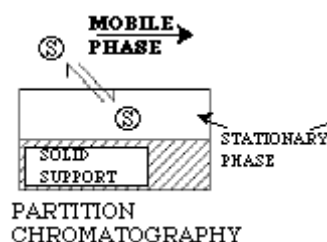
La cromatografía de reparto se puede subdividir en **cromatografía líquido-líquido** y **cromatografía con fases ligadas químicamente (enlazadas)**. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma como se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno. En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física. En fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.

La cromatografía de reparto, al principio era del tipo líquido-líquido; sin embargo, en la actualidad los métodos de fase enlazada son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquido. Una de esas desventajas es la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que hace necesario un periódico recubrimiento de las partículas del soporte. Por otra parte,

el problema de la solubilidad de la fase estacionaria impide el uso de los rellenos de fase líquida en la elución con gradiente. La discusión se centrará exclusivamente en la cromatografía de reparto con fases unidas químicamente.

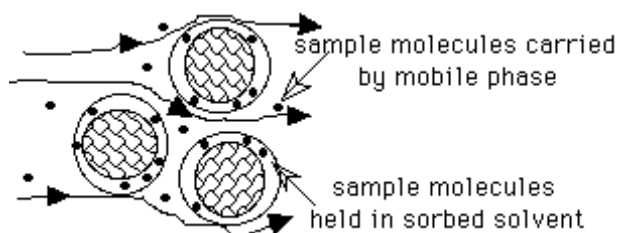
Ésta es una técnica de análisis cromatográfico, en la que la retención del analito en la columna depende de la naturaleza de su interacción con la fase estacionaria.

En la figura 13, se observa la forma en que interacciona el soluto, el analito, con la fase estacionaria. En la de partición de columna, el analito se disuelve dentro de la fase estacionaria.



**Figura 13.** Interacción del analito con la fase estacionaria

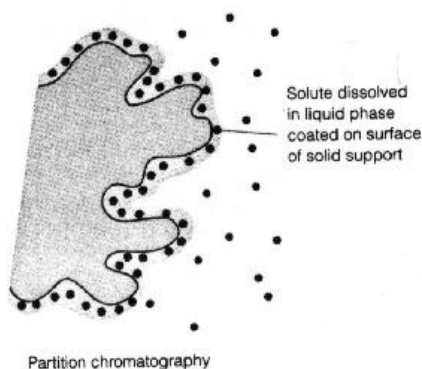
La técnica de cromatografía de partición de columna se basa en la retención del analito en una columna sólida como granos de fibra o cualquier otro material inerte químicamente, sobre la cual hay distribuida una capa fina de un disolvente afín al analito; y una fase móvil líquida o gaseosa; cuando la fase móvil pasa a través de la columna, el equilibrio entre esta y la estacionaria está mediado por el analito, que se reparte entre ambas y queda al final disuelto en la fase estacionaria. En la figura 14, las flechas, que son el flujo de la fase móvil y que llevan el analito, pasan por la fase estacionaria, los círculos, alrededor de los cuales hay una capa donde se quedan retenidos los analitos, esta capa es de un material que interacciona con el analito, donde este se disuelve.



**Figura 14.** Flujo de fase móvil llevando el analito a través de la fase estacionaria

Las moléculas del analito se equilibran entre la fase estacionaria y la móvil, a esto se le llama partición puesto que se distribuyen, o sea se reparten dependiendo de la fisicoquímica del sistema, entre las dos fases. La retención depende de la solubilidad del analito con la capa de sorbente adherida a la matriz sólida, y de que tanto la fase móvil pueda arrastrarlo al fluir.

En la figura 15 el analito que son los puntos negros, se quedan disueltos en la superficie de la fase estacionaria, dentro de la capa de solvente adherida a la matriz sólida. El analito también se distribuye entre la capa de solvente de la fase estacionaria y otra entre la fase estacionaria, a esto se le llama reparto, y como está sobre una columna se le llaman partición de columna.



**Figura 15.** Distribución del analito entre la capa solvente de la fase estacionaria

Eso se debe a que el analito tiene diferentes afinidades para las dos diferentes fases, o sea tiene diferentes preferencias por estar en una u otra fase, de esta forma, la separación del analito de la mezcla se logra por migración diferencial de este, y dada la afinidad que tiene el analito por el disolvente de la columna, el reparto en esta será mayor que en la fase móvil. Esta técnica se usa para separar sustancias en la misma fase, o líquidos inmiscibles.

En HPLC se puede llevar a cabo una cromatografía líquida en **fase normal** cuando la fase estacionaria es relativamente polar y la fase móvil es relativamente apolar. Pero, se efectúa una cromatografía en **fase inversa (o reversa)** cuando la fase estacionaria es relativamente apolar y la fase móvil es relativamente polar.

#### 4.1.5. Cromatografía de fase normal y fase inversa

Inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol colocadas sobre partículas de sílice o alúmina. Por razones históricas, a este tipo de cromatografía se le conoce ahora como cromatografía en fase normal.

La cromatografía de fase normal utiliza una fase estacionaria polar (frecuentemente hidrofílica) y una fase móvil menos polar. Para seleccionar una fase óptima, es mejor empezar con una fase móvil de un hidrocarburo puro como el heptano. Si la muestra se retiene fuertemente, la polaridad de la fase móvil debe aumentarse, quizá añadiendo pequeñas cantidades de metanol o de dioxano.

En cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución. Por contraste, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.

La técnica de fase inversa es el modo más ampliamente utilizado en HPLC e incluye cerca de la mitad de los métodos de cromatografía líquida. Esta técnica es la que probablemente proporcionará retención y selectividad óptimas cuando los compuestos no tienen grupos para enlaces de hidrógeno o no tienen un carácter predominantemente alifático o aromático.

En la cromatografía en fase inversa (o reversa), la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol o el acetonitrilo).

La cromatografía de fase inversa utiliza un empaque enlazado hidrofóbico, usualmente con un grupo funcional octadecilo (C-18) u octilo (C-8) y una fase móvil polar, frecuentemente una fase móvil parcial o totalmente acuosa. Conforme aumenta el carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. El agua es el eluyente más débil. El metanol y el acetonitrilo son disolventes populares porque tienen baja viscosidad y son fáciles de conseguir con excelente pureza. En cromatografía de fase inversa la fuerza de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino el efecto del disolvente de la fase móvil para forzar al soluto hacia dentro de la capa hidrocarbonada enlazada.

Los rellenos de fase enlazada se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido químicamente tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares.

#### *4.1.6. Instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución*

Este es un esquema del conjunto de componentes fundamentales necesarios para la cromatografía líquida:

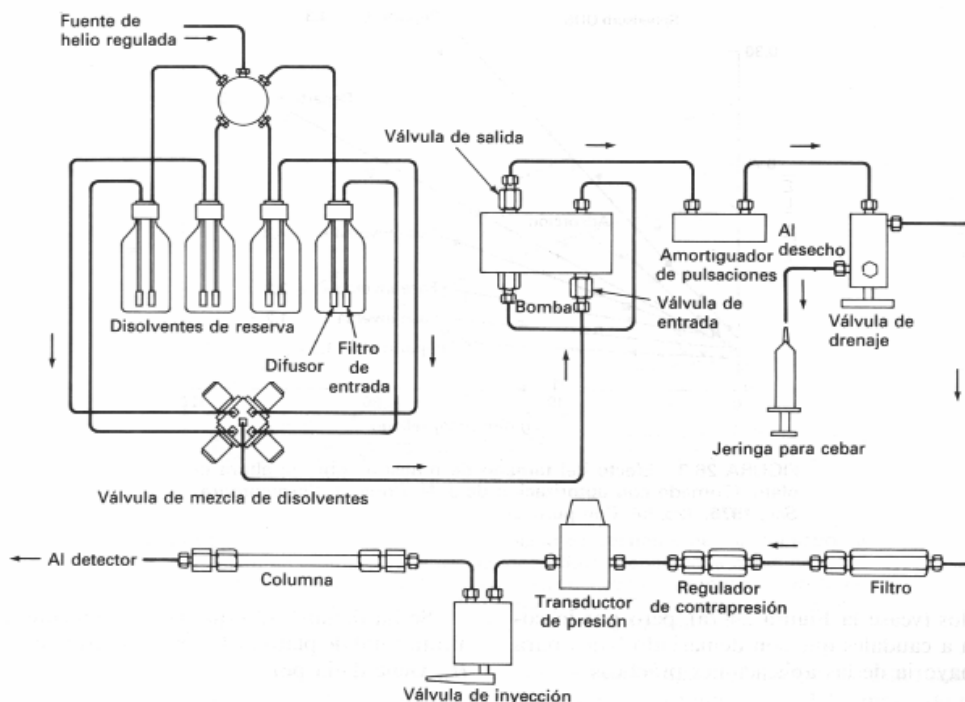


**Figura 16.** Esquema de un HPLC



**Figura 17.** Componentes del HPLC utilizado

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , que son comunes en cromatografía de líquidos, se requieren presiones altas. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. La figura 18 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico.



**Figura 18.** Esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de HPLC.

Cada uno de los componentes se trata en los párrafos que siguen a continuación:

## **RECIPIENTES PARA LA FASE MÓVIL Y SISTEMAS PARA EL TRATAMIENTO DE LOS DISOLVENTES**

Un aparato de HPLC se equipa con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene unos 500 mL de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos (en general oxígeno y nitrógeno) que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o sistemas de *difusión* que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad.

Estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes. Si el equipo no consta de desgasificadores y los filtros, una forma de tratar los disolventes antes de

introducirlas en el recipiente, consiste en filtrarlos mediante el vacío a través de un filtro de poro muy pequeño (ver equipo de filtrado para HPLC en Anexo 5). Este tratamiento elimina los gases además de la materia en suspensión.

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importantes es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o mas de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por eso es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna.

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol o el acetonitrilo. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y degasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio. En el caso de no poder utilizar helio se pueden degasificar mediante la utilización del equipo de ultrasonidos (ver Anexo 2).

Dependiendo del equipo, cuando se trata de una mezcla de disolventes; se puede o no programar la bomba para que tome las cantidades adecuadas de cada disolvente o bien, algunas otras bombas (las más antiguas) no tienen la capacidad de realizar esta mezcla y por lo tanto esta se tiene que preparar por nosotros.

## **SISTEMAS DE BOMBEO**

Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen:

- La generación de presiones superiores a 6000 psi
- Un flujo libre de pulsaciones
- Capacidad de cubrir un intervalo de caudales de 0.1 a 10 mL/min,
- El control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo
- Componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón).
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados

Las altas presiones que generan las bombas de HPLC no constituyen un riesgo de explosión, debido a que los líquidos no son muy compresibles. De este modo, la rotura de un componente del sistema sólo supone una pérdida de disolvente. Es evidente que esta pérdida puede suponer un riesgo de incendio.

Entre los sistemas de bombeo se utilizan tres tipos de bombas:

- **bombas recíprocas o de vaivén**
- **bombas neumáticas o de presión constante**
- **bombas de jeringa o de desplazamiento**

Las Bombas recíprocas o de vaivén, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno.

Las Bombas neumáticas o de presión constante, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.

Las Bombas de desplazamiento o tipo jeringa, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml.

### **Amortiguadores de pulsos**

Muchos de los detectores utilizados en HPLC son sensibles a variaciones de flujo. Un método sencillo de amortiguación contiene un fuelle flexible o un gas compresible en la porción superior cerrada de un tubo en T para absorber parte de la energía de pulsación. Cuando la bomba se rellena esta energía se libera para ayudar a suavizar la pulsación de presión. Los amortiguadores electrónicos de pulsos proporcionan una carrera hacia delante corta y rápida del pistón, y enseguida la carrera rápida de recarga de la bomba. El pequeño impulso hacia delante amortigua el pulso de flujo llevando disolvente a la presión del sistema.

### **Control del caudal y sistemas de programación**

Como una parte de sus sistemas de bombeo, muchos instrumentos comerciales se equipan con dispositivos controlados por ordenador que permiten medir el caudal mediante la determinación de la caída de presión a través de un restrictor colocado en la salida de la bomba. Cualquier diferencia entre la señal y un valor preestablecido se utiliza para aumentar o disminuir la velocidad del motor de la bomba.

La bomba envía el disolvente hacia la válvula inyectora que es una válvula de varias vías que permite introducir al disolvente, la muestra contenida en el loop de volumen calibrado.

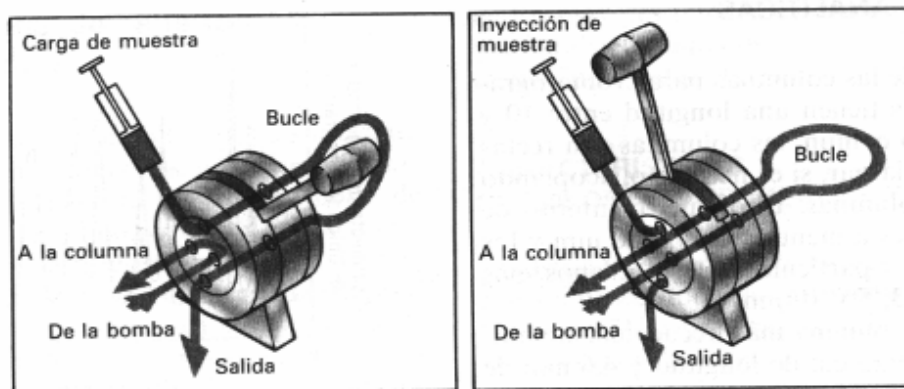
## **SISTEMAS DE INYECCIÓN DE MUESTRA**

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 500  $\mu\text{L}$ . Además, se ha de poder introducir la muestra sin despresurizar el sistema.

El método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* con un diafragma ("septum") a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi.

Las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado, como el que se muestra en la figura 19. Estos dispositivos están

normalmente integrados en el equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500  $\mu\text{L}$ . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 500  $\text{kg}/\text{cm}^2$  con una precisión relativa de unas décimas por ciento. También existen válvulas de inyección de micromuestras, con bucles con volúmenes de 0,5 a 5  $\mu\text{L}$ .



**Figura 19.** Bucle de muestra para cromatografía de líquidos.

## **COLUMNAS**

En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación.

Las columnas pueden ser empaquetadas o de tubo abierto. Una columna empaquetada se llena con partículas que contienen la fase estacionaria y los materiales más usados para los tubos de las columnas son de acero inoxidable y de vidrio, siendo el primero preferido por la manipulación más fácil. Para el caso de la columna de tubo abierto, se trata de un capilar hueco estrecho con la fase estacionaria cubriendo las paredes interiores. Cientos de columnas empaquetadas que difieren en tamaño y relleno se comercializan por distintos fabricantes.

### **Columnas analíticas**

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 5 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ .

La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, para eliminar contaminantes y partículas de polvo. Como cierre de las columnas se utilizan placas filtrantes de acero que no dejan escapar las micropartículas de la columna.



Tal vez la columna más frecuentemente utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partículas de 5  $\mu\text{m}$ . Estas columnas tienen de 40 000 a 60 000 platos/metro.

También, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5  $\mu\text{m}$ . A menudo su longitud es de 3 a 7.5 cm. Estas columnas tienen hasta 100 000 platos/metro y presentan la ventaja de la rapidez y del mínimo consumo de disolvente. La última propiedad es de considerable importancia, puesto que los disolventes de alta pureza que se requieren en cromatografía de líquidos son muy caros.

### **Termostatos**

En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura, y las columnas trabajan a temperatura ambiente. Sin embargo, muchas veces si se controla la temperatura de la columna en unas pocas décimas de grado centígrado, se obtienen mejores cromatogramas. La mayoría de los instrumentos comerciales llevan actualmente hornos para las columnas que controlan la temperatura de la columna a las décimas de grado, desde la temperatura ambiente hasta 150 °C. Para poder controlar con precisión la temperatura, las columnas también se pueden colocar en camisas con agua que provenga de un baño a temperatura constante.

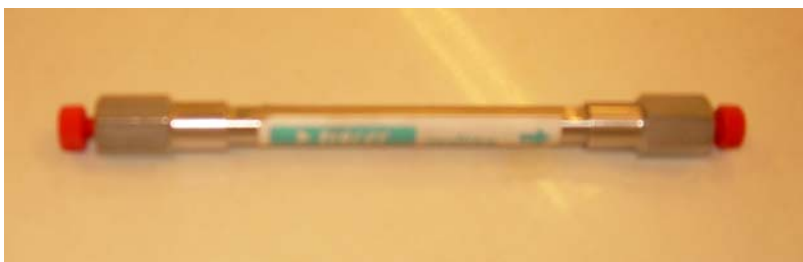
### **Tipos de rellenos de la columna**

En cromatografía de reparto líquido-líquido los empaques de columna más utilizados, son aquellos con fases estacionarias orgánicas enlazadas. Reemplazan a los empaques clásicos en los que el líquido estacionario recubre un material de soporte. El reparto ocurre entre la fase enlazada y una fase móvil líquida.

Los soportes con fase enlazada se preparan uniéndose covalentemente a la superficie de la sílice una especie orgánica de hidrocarburo. Los soportes incluyen geles de sílice de poro grandes, cuentas con lechos porosos y micropartículas. El siloxano se ha convertido en el estándar de las fases enlazadas comerciales. Es poco probable que la porción hidrocarbonada de octilo u octadecilo se extienda totalmente dentro de la fase móvil.

Las fases monoméricas responden rápidamente a los cambios en la composición de la fase móvil, cuando son mojadas por ellas. La falta de mojado causa una eficiencia pobre, presentándose adsorción en la interfase o entrecara adsorbente-disolvente en adición al equilibrio de reparto líquido – líquido esperado.

Una fase enlazada popular es un hidrocarburo de cadena lineal. El grupo alquilo puede ser de diversas longitudes, normalmente es un grupo etilo (C-2), octilo (C-8) u octadecilo (C-18). Este último puede utilizarse para las aplicaciones donde se requiere un máximo de retención.



**Figura 20.** Columna cromatográfica C18 utilizada

### **Introducción de la muestra**

Una vez que la columna se encuentra correctamente empaquetada, se procede a la aplicación de la disolución de la muestra. Cuando se introduce en la columna cierta cantidad de muestra, ésta se queda en una zona de cierta altura en la columna. Si entonces se introduce el disolvente, comienza el desplazamiento de la zona a lo largo de la columna. La parte superior de la zona se disuelve poco a poco y, empujado por la disolución que se forma, el frente de la zona avanza hacia la base de la columna.

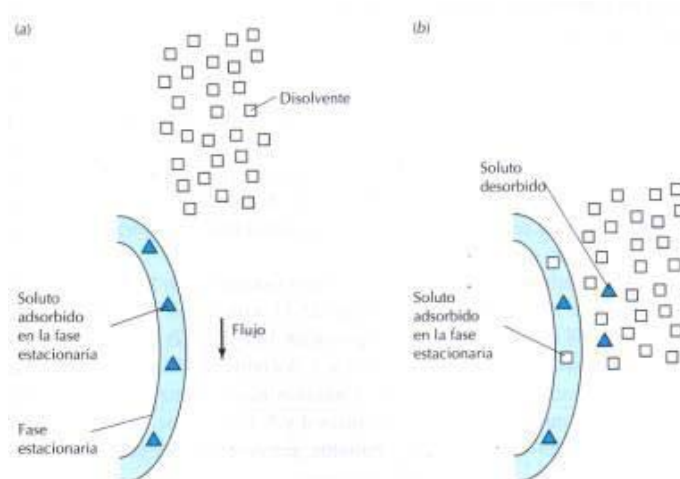
### **Procedimientos de elución**

La diferente capacidad de los distintos disolventes para eluir un determinado soluto es prácticamente independiente de la naturaleza del soluto. Se puede describir la elución como el desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

La cromatografía de fase normal se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar. Un disolvente más polar tiene fuerza eluyente mayor. La cromatografía de fase inversa, que es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y el disolvente es más polar. Un disolvente menos polar tiene mayor fuerza eluyente. La cromatografía de fase inversa elimina las colas de los picos porque la fase estacionaria tiene pocos puntos que adsorban con fuerza a ningún soluto originando colas. La cromatografía de fase inversa también es menos sensible a impurezas polares (como el agua), que pueda haber en el eluyente.

### **Elución isocrática y gradiente**

Cuando se usa el mismo disolvente durante toda la separación, se denomina elución isocrática. La elución isocrática se lleva a cabo con un único disolvente (o una mezcla de disolventes fija). Si un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de todos los componentes, se puede usar una elución gradiente. En este caso, se van añadiendo cantidades crecientes del disolvente B al disolvente A, produciendo un gradiente continuo.



**Figura 21.** Las moléculas del disolvente y las moléculas del soluto compiten entre sí en su reacción con los puntos activos de la fase estacionaria. Cuanto mayor es la fuerza del eluyente, más fácilmente se desplaza el soluto.

## **DETECTORES**

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura.

Los tipos de detectores en cromatografía de líquidos se clasifican en:

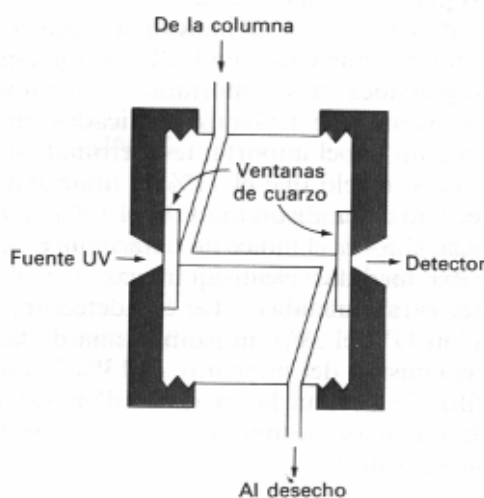
- Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles:
  - **Detectores de absorción ultravioleta**, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorción se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.
  - **Detectores de fluorescencia**, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste.
  - **Detectores electroquímicos**, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

- Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:
  - **Detectores de índice de refracción**, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula. El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.
  - **Detectores de conductividad**, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.

Los detectores más utilizados en cromatografía de líquidos son:

- **Detector UV.** Hay básicamente tres tipos:
  - Detector de Longitud de Onda Fija
  - Detector de Longitud de Onda Variable
  - Detector de Arreglo de Diodos

El detector más común en HPLC es el detector de ultravioleta, que utiliza una celda de flujo como la que se muestra en la figura 22, porque muchos solutos absorben luz ultravioleta. Los sistemas más simples utilizan la intensa raya de emisión a 254 nm de una lámpara de mercurio. Los instrumentos más versátiles tienen lámparas de deuterio, xenón o wolframio, y un monocromador, con el que se puede elegir la longitud de onda óptima, de ultravioleta o visible, para detectar los analitos estudiados.

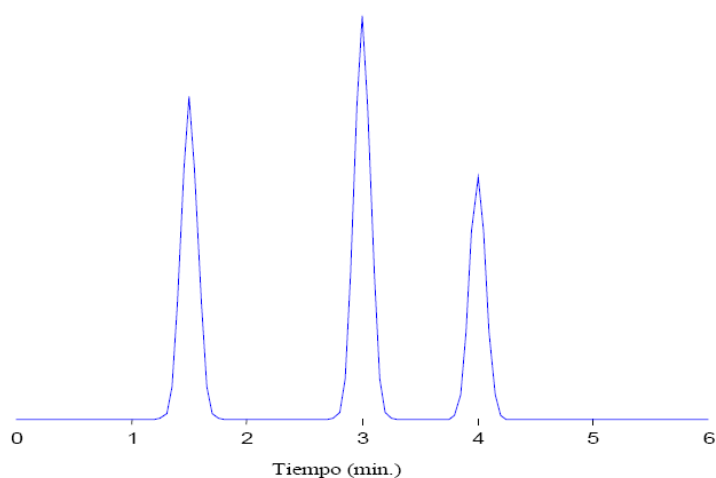


**Figura 22.** Celda de detector ultravioleta en HPLC. Una celda ordinaria contiene un camino óptico de 0,5 cm y contiene sólo 8µl de líquido.

## **REGISTRADOR INTEGRADOR**

Después de que se haya producido la separación en la columna y los componentes de la mezcla hayan pasado al detector, éste da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma de intensidad en función del tiempo (figura 23); en el cual, lo ideal es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra.

El integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede relacionar con la concentración del componente si se tiene una curva patrón; si no se cuenta con ella, sólo sería cualitativa.



**Figura 23.** Cromatograma típico obtenido por un HPLC

Debido a que los detectores que se usan en estos equipos no son destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él, y de esta manera realizar otro tipo de separaciones (por ejemplo) analíticas (también depende del tamaño del loop, de la columna y del tipo de bomba).

### **4.1.7. Parámetros cromatográficos**

#### **Volumen y tiempo de retención**

El volumen de fase móvil (o tiempo para  $T_r$ ) necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector, en el punto máximo del pico del soluto se define como volumen de retención ( $V_r$ ). El volumen muerto ( $V_0$ ) representa lo que se conoce como espacio muerto o volumen de retraso de la columna, incluye las contribuciones efectivas del volumen del inyector, tubería, conexión, columna y detector.

## **Factor de capacidad (K)**

Actualmente, se conoce como factor de retención ( $k$ ). El factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto A, el factor de retención,  $K_A$  se define como:

$$K_A = \frac{K_A \bullet V_s}{V_M} \quad (1)$$

donde  $K_A$  es la constante de distribución del soluto A,  $V_s$  es el volumen del soluto en la fase estacionaria y  $V_M$  el volumen del soluto en la fase móvil.

## **Selectividad**

El factor de selectividad  $\alpha$  de una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2)$$

donde  $K_B$  es la constante de distribución de la especie retenida con más fuerza, especie B, y  $K_A$  es la constante de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido. De acuerdo con esta definición,  $\alpha$  siempre es mayor que la unidad.

## **Eficiencia**

La eficiencia de una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. Para las mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) altura del plato  $H$  y (2) cantidad de platos o número de platos teóricos  $N$ . Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H} \quad (3)$$

donde  $L$  es la longitud del empaque de la columna (en cm). La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos  $N$  y la altura  $H$  es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles; la altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso mas pequeñas.

## Resolución cromatográfica

Es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos A y B. la resolución de cada columna queda definida como:

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2((t_{rA}) - (t_{rB}))}{W_A + W_B} \quad (4)$$

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes.

## Número de platos teóricos

Expresada como una cantidad adimensional, refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna.



Figura 24. Platos teóricos de una columna

## Asimetría (AF)

El factor de asimetría del pico (AF, de asymetry factor) se define como la razón de las mitades del ancho del pico a una altura dada. Conforme se mida más abajo la asimetría del pico AF es mayor, debido al ruido del detector, un compromiso aceptable es medir AF en 10% de la altura del pico.

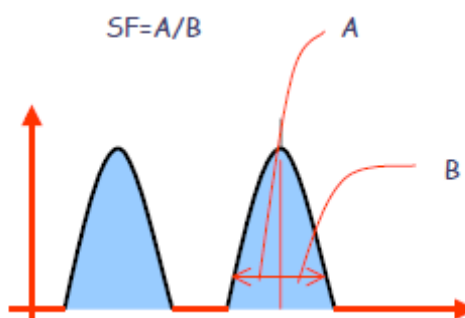


Figura 25. Representación esquemática del factor de asimetría.

## 4.2. MÉTODO ESPECTROSCÓPICO

### 4.2.1. Métodos espectroscópicos

Los métodos espectroscópicos de análisis están basados en medidas de radiación electromagnética absorbida o emitida por las sustancias. En función de ello se clasifican fundamentalmente en:

- **Métodos de absorción:** Se basan en la disminución de la potencia de un haz de radiación electromagnética al interaccionar sobre una sustancia.
- **Métodos de emisión:** Se basan en la radiación que emite una sustancia cuando es excitada previamente por medio de otro tipo de energía.
- **Métodos de fluorescencia:** Se basan en la radiación que emite la sustancia cuando es excitada previamente por un haz de radiación electromagnética.

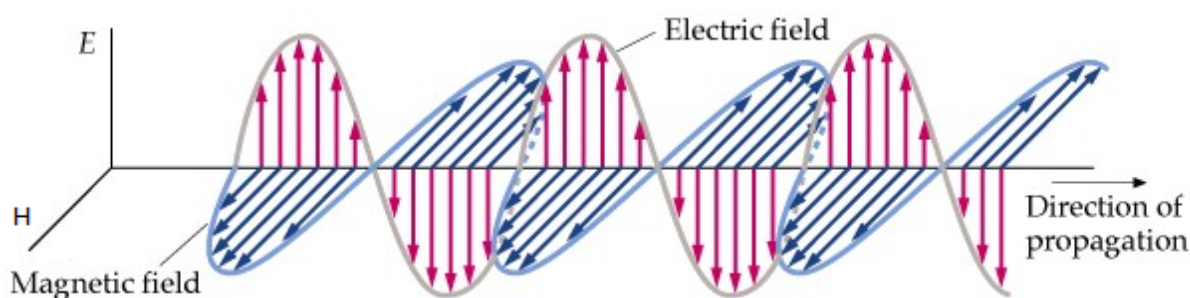
Otras clasificaciones de los métodos espectroscópicos se establecen en función de la región del espectro electromagnético que interviene en la técnica. Así, pueden usarse regiones como rayos X, UV, visible, infrarrojo, microondas, etc.

Aunque existen muchos tipos de espectroscopía, las más utilizadas en química orgánica se agrupan en cuatro categorías:

- **espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**
- **espectroscopía de infrarrojo**
- **espectroscopía de ultravioleta**
- **espectrometría de masas**

### 4.2.2. Radiación electromagnética

La radiación electromagnética normalmente descrita por el modelo de onda se representa por los campos eléctrico y magnético que oscilan en dos planos perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación. En el vacío se propaga a la **velocidad de la luz (300.000 Km/s)**.



**Figura 26.** Representación de la onda electromagnética que se desplaza en el espacio siguiendo la trayectoria del eje X.



Los vectores campo eléctrico (E) y magnético (H) son perpendiculares y su módulo, dirección y sentido varían según un movimiento oscilatorio. Ambos vectores cambian en función del tiempo debido a la propagación de onda.

Se considerará sólo el vector eléctrico para explicar sus propiedades y simplificar el tratamiento de datos. Los parámetros que caracterizan una onda son:

- **Longitud de onda ( $\lambda$ )** que representa la distancia entre dos puntos con idéntico valor de campo eléctrico en módulo y dirección.
- **La frecuencia ( $\nu$ )** que designa el número de oscilaciones por unidad de tiempo. Esta unidad depende de la longitud de onda.

$$\nu = c / \lambda \quad (c=\text{velocidad de la luz}) \quad (5)$$

- **La radiación electromagnética** está cuantizada, es decir, está formada por unidades discretas de energía llamadas fotones. La energía, E, de un fotón viene dada por la expresión:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{Constante de Planck, } h = 6,6252 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}) \quad (6)$$

- **Intensidad (I)** que se define como el número de fotones que por unidad de tiempo atraviesa la unidad de área, perpendicular a su dirección de propagación. Esta magnitud está relacionada con el módulo del vector campo eléctrico.

El espectro de la radiación electromagnética en función de la longitud de onda o de la energía está convenientemente dividido en secciones y cada una, abarca unos valores de energía que utilizan las distintas técnicas electromagnéticas. La radiación electromagnética ultravioleta-visible, en el intervalo de 200-750 nm, constituye la zona del espectro en la que operan las espectroscopías UV-Visible y de fluorescencia.

**Tabla 4.** Clasificación de los métodos cromatográficos.

Radiación	Longitud de onda (nm)	Transición molecular	Técnica espectroscópica
Radio	$10^{12}$	Espín nuclear	RMN
Microondas	$10^8$	Espín eléctrico	EPR
Infrarrojo	$10^6$	Vibracional	IR
UV-Visible	$2 \times 10^2 - 7,5 \times 10^2$	Electrónica	UV-Visible
Rayos X	$10 - 10^3$	Electrónica (capas internas)	Espectroscopía de rayos X (no difracción)

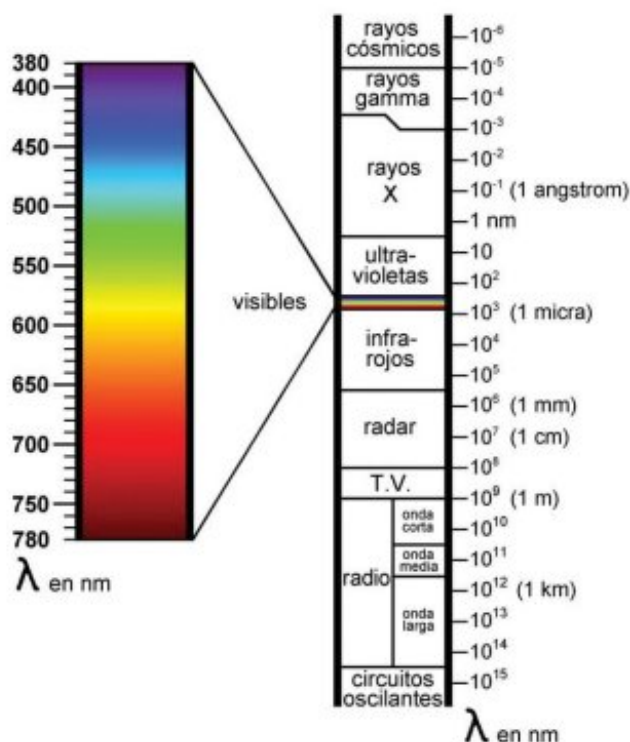


Figura 27. Espectro de ondas electromagnéticas

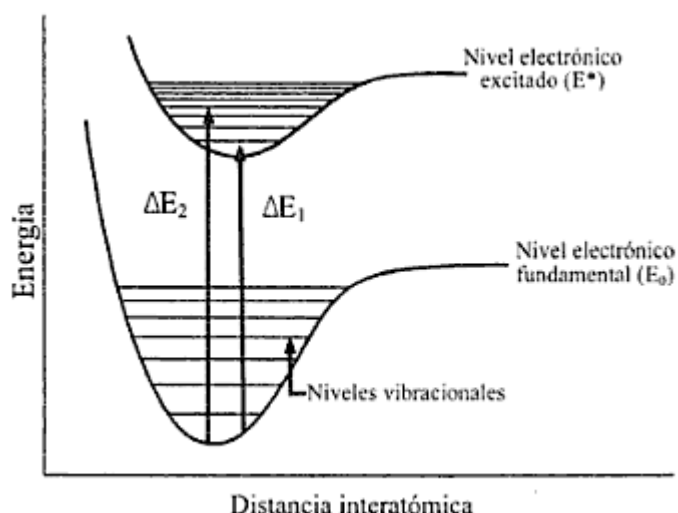
#### 4.2.3. Interacción de la radiación electromagnética con la materia

Cuando la radiación electromagnética atraviesa una capa de materia, se produce absorción y se eliminan selectivamente ciertas frecuencias de la radiación incidente. El estudio de las frecuencias de radiación absorbidas por una muestra constituye el espectro de absorción de la misma y ofrece un medio para caracterizarla.

Toda molécula posee una serie de cantidades discretas o cuantos de energía, denominados niveles de energía. Su energía total corresponde a la suma de toda una serie de componentes energéticos que están cuantizados:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{traslación}} + E_{\text{rotación}} + E_{\text{vibración}} + E_{\text{electrónica}} + \\ + E_{\text{espín electrónico}} + E_{\text{espín nuclear}}$$

En una molécula, los niveles de energía determinados por las distribuciones espaciales posibles de los electrones se denominan niveles de energía electrónicos.



**Figura 28.** Diagrama de energía de una molécula diatómica con el nivel electrónico fundamental y excitado y sus niveles vibracionales.

En esta figura, se representan dos transiciones electrónicas desde el estado fundamental hasta el excitado, inducidas con valores de energía  $\Delta E_1$  y  $\Delta E_2$ .

Cuando la radiación de energía  $h\nu$  interacciona con una molécula, que tiene dos estados electrónicos con energías  $E_1$  y  $E_0$ , si se verifica que:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu \quad (7)$$

La molécula absorberá esta energía ( $\Delta E = h\nu$ ) y realizará una transición electrónica, pasando del estado fundamental ( $S_0$ ) a un estado excitado ( $S_1$ ).

La transición electrónica tiene lugar en un espacio de tiempo del orden de 10-15 segundos, sin variación de la distancia entre los núcleos (Principio de Franck-Condon). En los picosegundos siguientes, el núcleo de la molécula se adapta a las nuevas condiciones de equilibrio correspondientes a este estado excitado. Finalmente, la molécula regresa a su estado fundamental por uno de los caminos siguientes:

- La partícula excitada emite un fotón de la misma energía que ha absorbido y vuelve inmediatamente al estado fundamental.
- La molécula en el estado excitado sufre un proceso de relajación sin emisión de fotones. En dicho proceso, la molécula pierde energía dentro del estado excitado. Cuando regresa al estado fundamental emite radiación electromagnética de mayor longitud de onda y menos energía. Este tipo de sucesos tiene lugar en escala de tiempo de los nanosegundos donde se sitúan las espectroscopías de absorción y de fluorescencia.
- La radiación electromagnética puede dar lugar a una reacción fotoquímica, como por ejemplo las reacciones químicas del proceso de la fotosíntesis en células vegetales especializadas.

Estos conceptos constituyen el fundamento de la espectroscopía molecular y cada técnica espectroscópica está restringida a una zona del espectro de energías.

#### 4.2.4. Espectroscopía UV

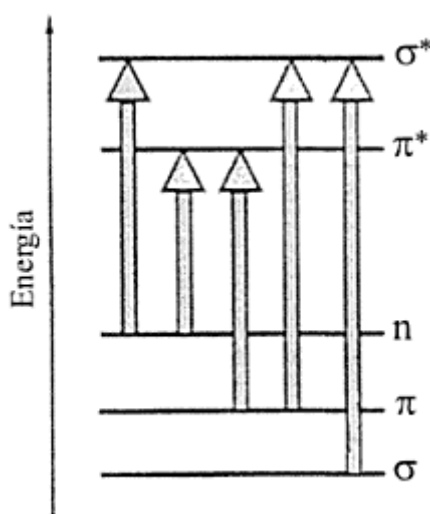
Cuando la radiación electromagnética incide sobre la solución de moléculas puede dar lugar a tres tipos de sucesos: absorción, dispersión y emisión de la radiación.

La teoría de orbitales moleculares (OM) considera que en la formación de un enlace entre dos átomos, dos orbitales atómicos se fusionan para dar los orbitales moleculares enlazante y antienlazante. Cada orbital molecular puede acomodar un par de electrones con espines apareados (de signo opuesto) que se denomina estado singlete. En una transición electrónica, uno de los electrones pasará a un orbital molecular distinto conservando su número de espín y en este caso, la molécula en el estado excitado sigue en el estado singlete. Pero, dado que ahora los electrones se encuentran en orbitales moleculares distintos pueden tener los espines paralelos (mismo signo) y si esto ocurre, a dicho estado se le denomina triplete:

En general, los orbitales moleculares se clasifican en:

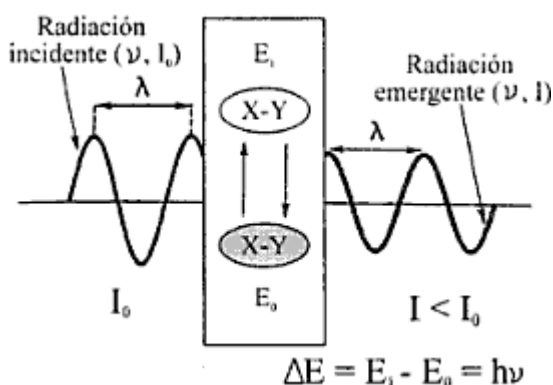
- **Orbitales  $\sigma$  enlazante y  $\sigma^*$  antienlazante** que se forman por la combinación de los orbitales atómicos tipo (s) y/o (p) y constituyen los enlaces simples de las moléculas.
- **Orbitales  $\pi$  enlazante y  $\pi^*$  antienlazante** originados por la combinación de los orbitales atómicos (p) que participan en los enlaces múltiples.
- **Orbitales n** que representan las moléculas con un heteroátomo tipo N y O con pares de electrones desapareados que no participan directamente en el enlace molecular.

En condiciones normales, los electrones de una molécula ocupan preferentemente los orbitales moleculares enlazantes de menor energía con sus espines apareados.



**Figura 29.** Diagrama de los niveles de energía y posibles transiciones moleculares.

Una molécula absorberá radiación electromagnética de energía  $h\nu$  y realizará una transición electrónica, si la longitud de onda cumple con la condición  $\Delta E = h\nu$ , siendo  $\Delta E$  la diferencia de energía entre el nivel electrónico fundamental y uno más energético. Este concepto constituye el fundamento de la espectroscopía de absorción. La espectroscopía de absorción UV-Vis analiza las transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$  inducidas por la radiación luminosa ultravioleta-visible. Las transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  requieren energía UV lejano.



**Figura 30.** Molécula X-Y que absorbe radiación electromagnética ( $\Delta E$ ) y pasa del estado electrónico fundamental ( $E_0$ ) al excitado ( $E_1$ ).

En la figura 30 se puede observar que la longitud de onda de la radiación incidente y emergente es la misma, pero no su intensidad.

Los grupos funcionales de una molécula que son excitados por la absorción de radiación luminosa UV-Visible se denominan cromóforos.

### **Ecuación de Lambert-Beer: coeficiente de extinción molar**

Si se hace incidir radiación monocromática sobre una muestra con una concentración  $c$  de una sustancia que absorbe a esa longitud de onda  $\lambda$ , la intensidad de la radiación que la atraviesa,  $I$ , está relacionada con la intensidad incidente  $I_0$  y con el espesor de la muestra,  $l$ , por la expresión:

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot c \cdot l} \quad (8)$$

aplicando logaritmos:

$$\log I = \log I_0 - \epsilon \cdot c \cdot l \quad (9)$$

reordenando términos:

$$\log I_0 - \log I = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (10)$$

pudiéndose escribir:

$$\log (I/I_0) = -\epsilon \cdot c \cdot l \quad (11)$$

Habitualmente, el cociente  $I/I_0$  se denomina transmitancia de la muestra y se suele expresar como porcentaje de luz transmitida:  $(I/I_0) \cdot 100$ . Por otra parte, se define la absorbancia de la muestra como:  $A = \log(1/T)$ . Tanto la absorbancia como la transmitancia son magnitudes que se obtienen directamente en el espectrofotómetro.

Según estas definiciones, queda finalmente la siguiente expresión que se conoce con el nombre de la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (12)$$

donde  $\varepsilon$  es la absorptividad molar (una medida de la radiación absorbida), que es un valor constante para cada sustancia a cada longitud de onda  $\lambda$  y en unas condiciones experimentales determinadas; también se denomina coeficiente de extinción molar si, como es frecuente, la concentración se expresa en moles por litro.

Si se opera, por tanto, a una longitud de onda dada y con una cubeta de un determinado espesor,  $l$ , la absorbancia  $A$ , medible directamente, es proporcional a la concentración molar de la muestra,  $c$ , lo que constituye el fundamento del análisis espectrofotométrico cuantitativo.

Existen, sin embargo, distintos factores que afectan al cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, especialmente a concentraciones elevadas. Por ello antes de proceder al análisis de una muestra es preciso comprobar experimentalmente el rango de concentraciones en que dicha ley se cumple, obteniendo la curva de calibrado que relaciona las absorbancias con las concentraciones.

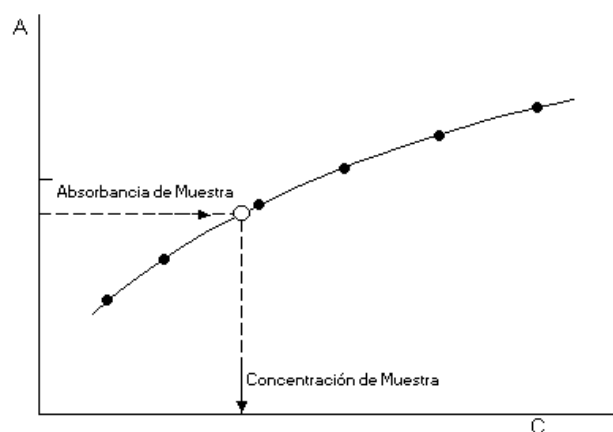
### **Curva de Calibración**

Denominamos espectro de una sustancia a la representación de absorbancia ( $A$ ) en función de longitud de onda ( $\lambda$ ), este gráfico presenta ondulaciones con máximos y mínimos.

Para hacer las determinaciones cuantitativas se elige, en general, la longitud de onda correspondiente a un máximo, pues el error de medición es mínimo y la sensibilidad máxima.

Para verificar el cumplimiento de la ley de Beer, se debe realizar la curva de calibración; absorbancia ( $A$ ) en función de concentración ( $c$ ), para lo cual se preparan soluciones de la sustancia de concentraciones conocidas y se mide la absorbancia a la longitud de onda elegida.

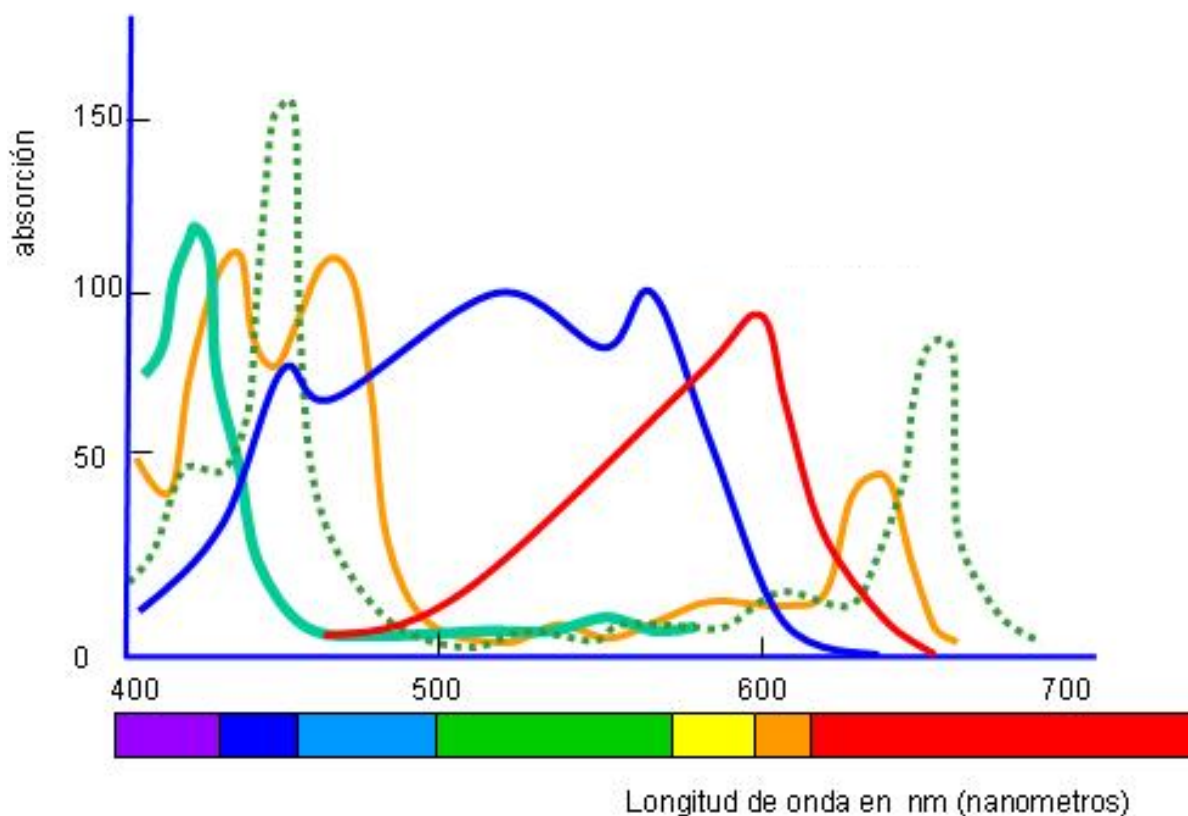
Si es válida la ley de Beer, para esa sustancia a esas concentraciones, la relación debe ser una recta, que pase por el origen de los ejes cartesianos; a menudo se observan desviaciones debidas a diversos factores.



**Figura 31.** Curva de calibración

### **Espectro de absorción UV-Vis**

El espectro de absorción de una molécula en solución es la representación gráfica de la probabilidad de absorción de radiación luminosa por sus cromóforos con respecto a la longitud de onda. Constituye una característica propia de la molécula que depende de sus propiedades estructurales y del disolvente.



**Figura 32.** Espectro de absorción de diferentes sustancias

Cuando un cromóforo absorbe radiación luminosa realiza transiciones electrónicas discretas y su espectro debería estar formado por líneas de absorción cuya magnitud estaría relacionada con la probabilidad de la transición y la concentración molecular.

Sin embargo, el espectro de absorción en disolución es continuo debido a la interacción soluto-disolvente y está formado por las bandas de absorbancia que corresponden a las diversas transiciones permitidas entre el estado fundamental y cualquiera de los niveles vibracionales de los estados electrónicos excitados. Cada banda se caracteriza por una longitud de onda de máxima absorción,  $\lambda_{\text{máx}}$ , que corresponde a la transición más probable.

#### *4.2.5. Instrumentación para espectroscopía UV*

### **Espectrofotómetros**

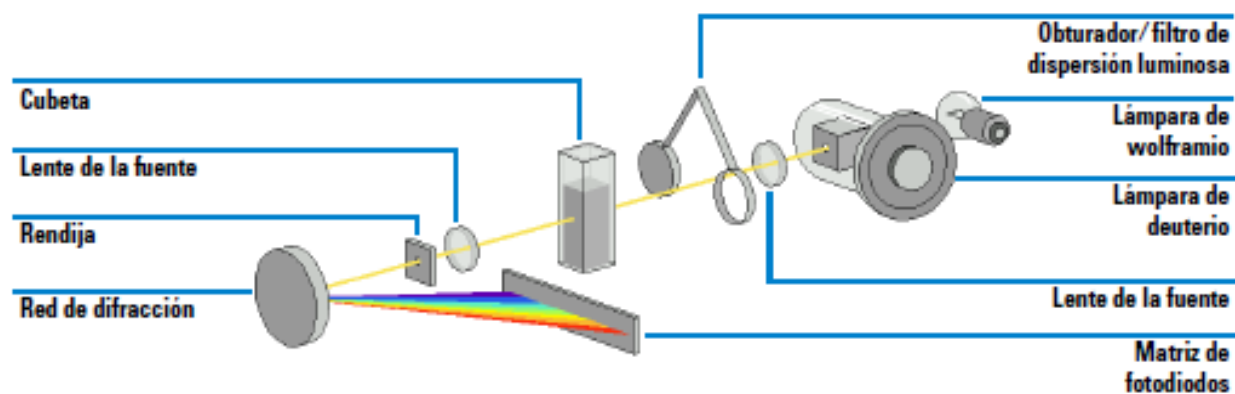
Un espectrofotómetro consta de las siguientes unidades básicas:

- a) La lámpara que emite la radiación electromagnética. Los espectrofotómetros de absorción UV-Visible suelen estar equipados con dos tipos de lámparas: las halógenas que emiten luz visible en la zona del espectro visible (400-700 nm) y las de deuterio que emiten radiación ultravioleta y cubren el espectro UV-próximo (200-350 nm).
- b) Las lentes ópticas que concentran el haz de luz luminoso y lo enfocan sobre el monocromador.
- c) El monocromador, unidad que permite obtener luz monocromática o radiación formada por una sola longitud de onda.
- d) El sistema de cubetas o células, donde situamos la solución de muestra a analizar y se caracteriza por su longitud de paso.
- e) El detector: la luz no absorbida (transmitida) por la muestra continúa su camino hacia el fotomultiplicador y por mediación del sistema de fotodiodos esta señal óptica es transformada en eléctrica, para finalmente, ser ampliada y registrada o digitalizada.

Para determinar la absorbancia,  $A$ , de una muestra en un espectrofotómetro de mono-haz, es necesario hacer dos lecturas independientes: primero la del disolvente ( $A_d$ ) y a continuación la solución de muestra ( $A_m$ ). Dado que las absorbancias son aditivas, la medida de absorbancia del soluto será:  $A = A_d - A_m$ .

Los espectrofotómetros de doble haz tienen las mismas unidades comentadas, pero además, disponen de un dispositivo que divide el haz óptico inicial en dos haces idénticos que recorrerán caminos paralelos e incidirán sobre dos cubetas de forma casi simultánea, una de referencia donde se sitúa el disolvente y otra para la muestra. Así pues, en una sola operación se obtiene la medida de absorbancia del soluto.





**Figura 33.** Sistema óptico de un espectrofotómetro mono-haz



**Figura 34.** Espectrofotómetro UV-VIS utilizado

# **CAPÍTULO 5: PARTE EXPERIMENTAL**

La metodología analítica empleada para cuantificar la cafeína, consistía en separar por sistemas tradicionales de extracción líquido-líquido el principio activo y valorarla después por técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, teniendo en cuenta la exactitud y precisión de los métodos empleados.

## **5.1. MATERIAL DE LABORATORIO UTILIZADO**

A continuación se muestra un listado con el material utilizado para los experimentos realizados en el laboratorio.

- Aro de corchos para matraces
- Cubetas (o celda) de cuarzo para espectrofotómetro UV
- Cuentagotas
- Desecador
- Embudo alemán (vidrio) y Embudo Büchner
- Embudo decantación
- Embudo para pesar sólidos

- Equipo de filtración de HPLC (Crisol con placa porosa de vidrio Pyrex, Cuerpo con placa porosa, Embudo de filtración, Matraz erlenmeyer, pinzas para rótulas)
- Equipo de reflujo (Soporte, Aro de acero con espiga, Nuez doble o Pinza triples, Pinzas para buretas y refrigerantes (sin nuez), Refrigerante de bolas, gomas, bridas)
- Espátulas
- Filtros de jeringa HPLC
- Frasco lavador de agua Mili-Q
- Jeringa (plástico y vidrio)
- Jeringa Hamilton
- Matraz aforado
- Matraz erlenmeyer (sin esmerilar)
- Matraz Kitasato (sin esmerilar)
- Matraz redondo, fondo plano sin esmerilar y esmerilado
- Matraz redondo, fondo redondo esmerilado
- Mortero de porcelana
- Papel absorbente
- Papel de filtro para análisis cualitativo y Papel de filtro (microfibra de vidrio)
- Papel indicador de pH
- Parafilm
- Pera de goma
- Pesafiltros
- Pipetas aforadas, Pipetas graduadas
- Pipeta Pasteur polietileno
- Probeta graduada
- Tubos de ensayo con tapón rosca
- Tubos Eppendorf
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitados (vidrio y polipropileno)

El resto de material, equipos, productos y reactivos utilizados pueden ser consultados en los Anexos 5 y 6.

### *5.1.1. Preparación del material de vidrio*

Todo el material de vidrio ha sido lavado con agua y jabón, aclarado abundantemente con agua destilada (Mili-Q) y después rociado con acetona y secado con aire para asegurar su limpieza sin que quedara ningún residuo o impureza.

Las conexiones entre piezas de vidrio se han impregnado con vaselina para conseguir así un mejor encaje entre ellas y permitiendo al mismo tiempo que posteriormente se puedan volver a separar.

## 5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PATRÓN PARA ELABORAR LA RECTA DE CALIBRADO

### *5.2.1. Instrumentación*

Equipos: Unidad de purificación de agua para laboratorios ELGA, Purelab Classic.

Balanza analítica Mettler, AB-104-S

Estufa Selecta, Digitheat.

Reactivos: Cafeína (Sigma-Aldrich, reactivo analítico)

Agua Milli-Q (Millipore).

Ácido clorhídrico 0,01 M

### *5.2.2. Preparación de las muestras patrón*

Primero se ha preparado la disolución patrón de cafeína, a partir de 40 mg de cafeína (previamente secada que se disuelven, en matraz aforado de 100 ml, en agua Milli-Q (400ppm). Seguidamente, se traspasan, con ayuda de pipeta aforada, 10 ml de esta disolución a otro matraz aforado de 100 ml y se lleva a enrase con la misma agua Milli-Q (40 ppm).

A partir de esta última solución patrón de cafeína de 40 ppm, se preparan 5 soluciones más diluidas de concentraciones de 4, 8, 16, 24 y 32 microgramos de cafeína por mililitro:

- (5 ml de solución patrón de cafeína de 40 ppm + 2 ml HCl 0,01 M)/50 ml de agua (4 ppm)
- (5 ml de solución patrón de cafeína de 40 ppm + 1 ml HCl 0,01 M)/25 ml de agua (8 ppm)
- (10 ml de solución patrón de cafeína de 40 ppm + 1 ml HCl 0,01 M)/25 ml de agua (16 ppm)
- (15 ml de solución patrón de cafeína de 40 ppm + 1 ml HCl 0,01 M)/25 ml de agua (24 ppm)
- (20 ml de solución patrón de cafeína de 40 ppm + 1 ml HCl 0,01 M)/25 ml de agua (32 ppm)

## 5.3. MUESTRAS DE CAFEÍNA DE CAFÉ

Se han analizado un total de 32 muestras de café.

*Tabla 5. 32 muestras de cafés analizados*

<b>Muestra</b>	<b>Tipo de café</b>
1	Café Kenya natural. Tostadero Bon Mercat
2	Café Costa Rica natural. Tostadero Bon Mercat
3	Café Caracolillo natural. Tostadero Bon Mercat
4	Café Guatemala natural. Tostadero Bon Mercat
5	Café Brasil natural. Tostadero Bon Mercat
6	Café Colombia natural. Tostadero Bon Mercat
7	Café Sumatra natural. Tostadero Bon Mercat
8	Café molido de tueste 100% natural. Carrefour
9	Café molido de Colombia tueste 100% natural. Carrefour Selección
10	Café molido de Etiopía tueste 100% natural. Carrefour Selección
11	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Carrefour Selección
12	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Saimaza Colombia. Desarrollo Sosten.
13	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Saimaza Brasil. Desarrollo Sostenible
14	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Marcilla SENSEO® Kenya
15	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Marcilla SENSEO® Brasil
16	Café molido de tueste 100% natural. Hacendado
17	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Bonka Puro Colombia
18	Café molido de tueste natural 100% Arábica. Cafe Mexique Chiapas Destination
19	Café molido mezcla ( % natural y % torrefacto). Soley
20	Café molido mezcla (30 % natural y 70 % torrefacto). Bonka Especial
21	Café molido mezcla (70 % natural y 30 % torrefacto). Bonka
22	Café molido mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto). Bonka Intenso
23	Café Express mezcla (70 % natural y 30 % torrefacto). Dia
24	Café molido mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto). Dia
25	Café molido descafeinado de tueste 100% natural. Gran Aroma Marcilla
26	Café molido descafeinado de tueste 100% natural. Carrefour
27	Café molido mezcla descafeinado (50 % natural y 50 % torrefacto). Dia
28	Café Express mezcla descafeinado (80 % natural y 20 % torrefacto). Dia
29	Café soluble de tueste 100% natural. NESCAFÉ Classic Natural
30	Café soluble de tueste 100% natural. Auchan
31	Café soluble descafeinado de tueste 100% natural. Carrefour
32	Café soluble descafeinado de tueste 100% natural. NESCAFÉ Classic Descafeinado

Estas muestras están divididas en 8 cafés naturales de tostadero (Tostadero Bon Mercat) de diferentes países de origen y 24 muestras de cafés de marcas comerciales.

Los cafés de marcas comerciales se han dividido en 6 grupos, ya que son los tipos de café más comercializados en nuestro país:

- Tueste natural
- Mezcla
- Descafeinado natural
- Descafeinado mezcla
- Soluble natural
- Soluble natural descafeinado

Cada uno de estos tipos tiene unas características distintas independientemente de la calidad de la mezcla. Se ha intentado recoger la máxima información sobre los diferentes tipos.

#### *5.3.1. Instrumentación*

Equipos: Unidad de purificación de agua para laboratorios ELGA, Purelab Classic.

Balanza analítica Mettler, AB-104-S

Reactivos: Cafés de Tostadero Bon Mercat

Cafés comerciales

#### *5.3.2. Preparación de las muestras de café*

Para explicar la preparación de las muestras de café, en el siguiente apartado se detalla la extracción de la cafeína del café mediante diferentes procedimientos.

## 5.4. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN DE LA CAFEÍNA DEL CAFÉ

En este capítulo se explica el procedimiento de extracción de cafeína de café para posteriormente determinarla por las dos técnicas analíticas utilizadas: cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotometría UV-Vis.

Para la separación de la cafeína de productos naturales se deben realizar una serie de pasos iniciales que permitan la extracción de la cafeína, aislada del resto de las sustancias que la acompañan y que es necesario eliminar, puesto que pueden constituir interferencias para su posterior determinación.

### 5.4.1. Método de extracción de cafeína utilizado (I)

#### **Instrumentación**

Equipos: Unidad de purificación de agua para laboratorios ELGA, Purelab Classic.

Balanza analítica Mettler, AB-104-S

Manta calefactora Selecta, Fibroman-C

Material de laboratorio

Reactivos: Cafeína (Sigma-Aldrich, reactivo analítico)

Sulfato de sodio anhidro (Panreac, reactivo analítico)

Carbonato de sodio anhidro (Panreac, reactivo analítico)

Cloroformo (Panreac, reactivo analítico)

Acetona (Panreac, reactivo analítico)

Éter de petróleo (Panreac, reactivo analítico)

Agua Milli-Q (Millipore).

Muestra de café

#### **Preparación de las muestras de café**

Este método se ha realizado siguiendo el procedimiento que se describió en el PFC1, pero sustituyendo el rotavapor por una sencilla evaporación en una manta calefactora. Cada uno de los ensayos utilizados se especifica paso a paso en el procedimiento normalizado de trabajo PNT-P-OBCACAER-00 (incluido en los anexos del PFC1).

Se pesan aproximadamente 100 g de café y se ponen a reflujo con 200 ml de Agua Milli-Q durante 15 minutos.

Seguidamente, se filtra la solución al vacío en caliente y se añaden 5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hasta la total disolución. Se deja enfriar y se agregan 15 ml cloroformo que se extraen agitando suavemente durante unos minutos, se repite éste procedimiento una vez más.

Posteriormente, en un matraz de fondo redondo se introducen las dos fases orgánicas recolectadas de las dos extracciones anteriores. Se añaden pequeñas cantidades de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para absorber el agua y se deja evaporar hasta sequedad.

Una vez eliminado el cloroformo, se disuelve la cafeína en acetona, calentando y añadiendo gota a gota éter de petróleo con lo que se observa una ligera turbidez. Se deja secar a temperatura ambiente, hasta que se vean los cristales de cafeína purificada y se filtran al vacío.

Finalmente, se introducen los cristales en una cápsula de porcelana, previamente tarada, y se dejan secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se pesa la cápsula de porcelana con los cristales de cafeína para poder obtener el rendimiento.

Este método es muy laborioso y se produjeron pérdidas durante la recrystalización. Por otra parte, la cantidad de café utilizado es excesivamente grande, por lo que se decidió modificar el método de extracción.

#### *5.4.2. Método de extracción de cafeína utilizado (II)*

### **Instrumentación**

Equipos: Unidad de purificación de agua para laboratorios ELGA, Purelab Classic.

Balanza analítica Mettler, AB-104-S

Material de laboratorio

Reactivos: Cafeína (Sigma-Aldrich, reactivo analítico)

Acetato de plomo (Panreac, reactivo analítico)

Ácido sulfúrico (Panreac, reactivo analítico)

Ácido clorhídrico 0,01 M

Agua Milli-Q (Millipore).

Muestra de café

### **Preparación de las muestras de café**

Se supone aproximadamente un porcentaje medio de 1,2% de cafeína en el café, basándonos en la bibliografía. Por lo tanto, se transfiere a un matraz aforado de 250 ml, 200 mg de café finamente triturado (equivalente aproximadamente a 2,4 mg de cafeína) y se añade Agua Milli-Q hasta aproximadamente 150 ml.



A continuación, se agita vigorosamente el matraz bien tapado durante 5 min, se añaden 10 ml de HCl 0,01 M y se vuelve a agitar durante 5 minutos. Se continúa añadiendo 5 mL de una solución de acetato de plomo al 10% y se repite la agitación. Después, se enrasa con Agua Milli-Q, se homogeniza y se filtra.

Finalmente, se pipetea 25 ml de filtrado, se transfieren a un matraz aforado de 50 ml, se añaden 0,1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,5 M y se agita la solución. Inmediatamente, se enrasa con Agua Milli-Q, se homogeniza y se filtra.

Al realizar este procedimiento se observa que la solución obtenida es ligeramente turbia y tiene una coloración amarillenta. Por este motivo, se optó por modificar el método de extracción.

#### 5.4.3. Método de extracción de cafeína utilizado (III)

### **Instrumentación**

Equipos: Unidad de purificación de agua para laboratorios ELGA, Purelab Classic.

Balanza analítica Mettler, AB-104-S

Manta calefactora Selecta, Fibroman-C

Estufa Selecta, Digitheat.

Reactivos: Cafeína (Sigma-Aldrich, reactivo analítico)

Sulfato de sodio anhidro (Panreac, reactivo analítico)

Carbonato de sodio anhidro (Panreac, reactivo analítico)

Cloroformo (Panreac, reactivo analítico)

### **Preparación de las muestras de café**

Suponiendo que en cada café la proporción de cafeína sea del 1,2%, se pesan aproximadamente 300 mg y se ponen a reflujo con 200 ml de Agua Milli-Q durante 15 minutos.

Seguidamente, se filtra la solución en caliente y se añaden 5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta la total disolución. Se deja enfriar y se agregan 15 ml cloroformo que se extraen agitando suavemente durante unos minutos y se repite esta operación una vez más.

Después de la separación de las dos fases, se añaden pequeñas cantidades de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para absorber el agua, se filtra la fase clorofórmica haciéndola pasar por papel filtro hacia un matraz erlenmeyer o balón, y se deja evaporar hasta sequedad.

Una vez eliminado el cloroformo, se añade al mismo matraz o balón, 50 ml de Agua Milli-Q y se agita bien hasta perfecta disolución. Posteriormente, mediante un embudo se enrasa a 100 ml en un matraz aforado.

Finalmente, se toman 10 ml de esta última solución, se añade 1 ml de la solución de ácido clorhídrico 0,01 M y se enrasa a 25 ml con Agua Milli-Q.

Este método es rápido y eficaz, por lo que se concluyó y se aceptaron estas condiciones de extracción.

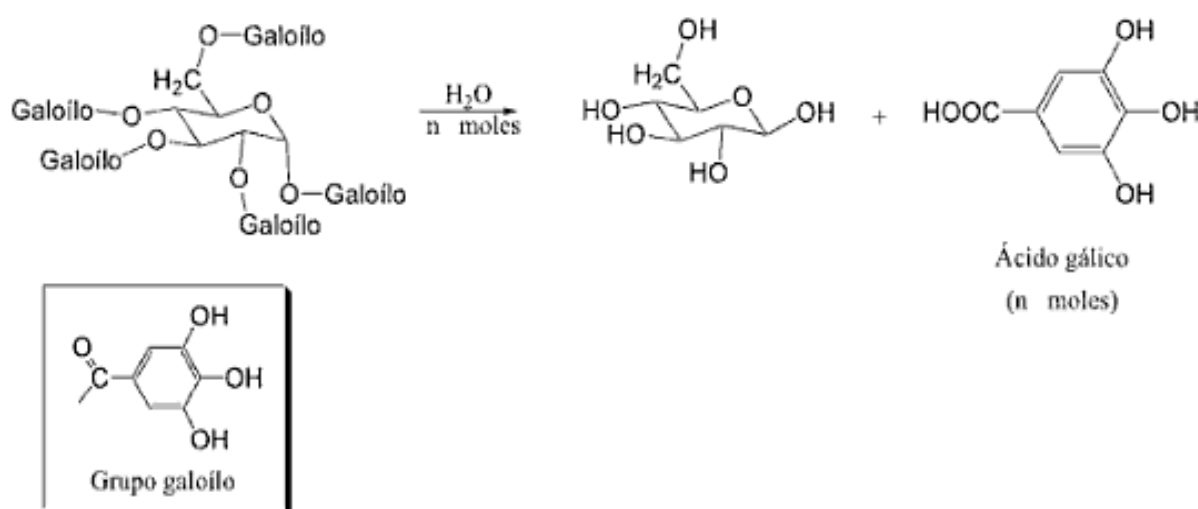
### **Aplicación de la técnica de extracción de la cafeína de café**

El café contiene celulosa, que es un polímero de la glucosa y el principal material estructural de las células de todas las plantas. Dado que la celulosa es insoluble en agua, no presenta problemas en el procedimiento de separación de la cafeína.

Los taninos también se disuelven en agua caliente utilizada para extraer los compuestos vegetales. El término tanino no se refiere a un compuesto único homogéneo, o inclusive a sustancias que tienen una estructura química similar; éste se refiere a una clase de compuestos que tienen ciertas propiedades en común.

Los taninos son compuestos de origen vegetal que tienen naturaleza de polifenoles (antioxidantes del café de alta absorción por el organismo humano) y un peso molecular entre 500 y 3000. Se usan ampliamente para teñir el cuero. Los taninos se dividen normalmente en los que pueden ser hidrolizados con agua y los que no pueden hidrolizarse.

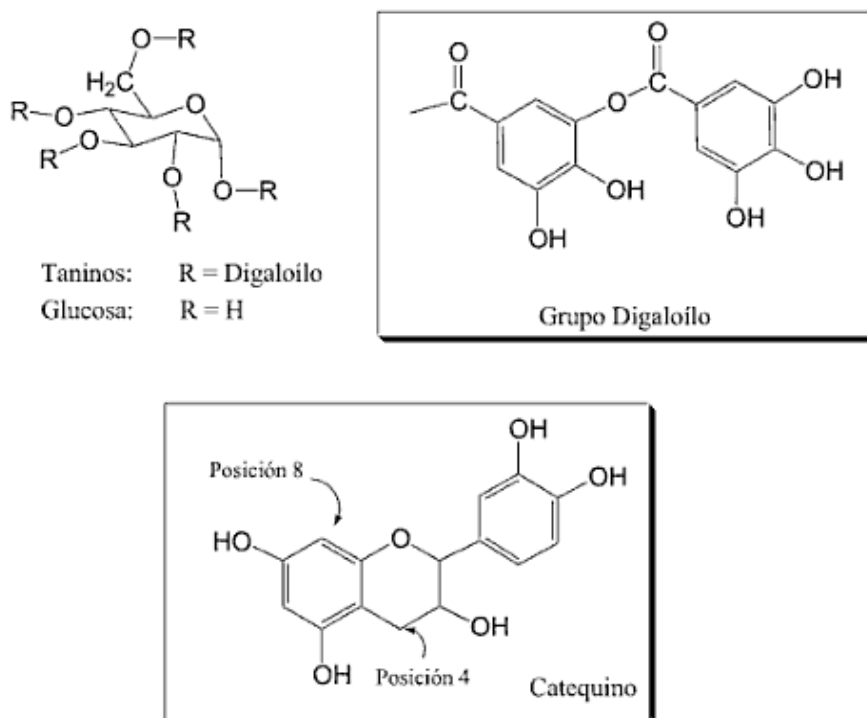
Los **taninos hidrolizables (gálicos o pirogálicos)** se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática. Se encuentran en este grupo los taninos gálicos propiamente dichos que son polímeros del ácido gálico, ésteres de un poliol, generalmente de la glucosa con varias moléculas de ácido gálico y los taninos elágicos o elagitaninos también son ésteres pero en este caso del ácido hexahidroxidifénico y sus derivados. El ácido hexahidroxidifénico se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico.



**Figura 35.** Hidrólisis de taninos derivados del ácido gálico

Los **taninos no hidrolizables (condensados o proantocianidinas)** se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobafenos). Químicamente son polímeros condensados del catequino o catecol (flavanol). Estos polímeros no son uniformes en su estructura; la molécula de catequino está normalmente ligada a la posición 4 y 8 del anillo.

También se han encontrado casos de taninos en los cuales algunos de los grupos hidroxilo de la glucosa han sido esterificados con grupos digaloílo.



**Figura 36.** Estructura de los taninos derivados del digaloílo y catequino

Cuando los taninos se extraen con agua caliente, algunos de esos compuestos son parcialmente hidrolizados para formar ácido gálico. Los taninos son compuestos ácidos, lo cual se debe a la naturaleza de los grupos fenólicos y del grupo carboxilo. El tratamiento químico de los frutos vegetales (té, café, nuez de cola, etc.) con una base, como por ejemplo carbonato de sodio, convierte a los taninos ácidos en sus respectivas sales de sodio, las cuales son muy solubles en agua por su naturaleza iónica.

Aunque la cafeína es soluble en agua, es mucho más soluble en cloroformo y por eso puede ser extraída con este disolvente orgánico, mientras las sales de sodio del ácido gálico y los taninos permanecen en la fase acuosa. Así, la extracción con cloroformo de la solución básica separa la cafeína casi pura.

El sulfato de sodio anhidro actúa eliminando toda el agua y las sales solubles en agua que se mantienen en el disolvente orgánico (capa orgánica) o accidentalmente transferido en la decantación.

El disolvente orgánico puede ser eliminado fácilmente por evaporación o por destilación, teniendo en cuenta su punto de ebullición, o mediante vacío usando un equipo de evaporación rotatoria, para conseguir la cafeína.

## **Extracción**

La extracción es un proceso mediante el cual una sustancia que se encuentra en una mezcla sólida o disuelta en un determinado disolvente es transferida a otro disolvente. Las razones más frecuentes por las que se usa una extracción en Química Analítica son aislar, concentrar o separar un analito de una especie que interferiría en su análisis. La sustancia a separar puede tratarse tanto de un sólido como de un líquido, y en función de tener una muestra sólida o líquida, el método de trabajo será diferente. Por lo tanto, la extracción puede clasificarse dependiendo del estado físico de los materiales: sólido-líquido o líquido-líquido.

- Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. El componente que se transfiere a la fase líquida recibe el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte.

La extracción se lleva a cabo mediante un sistema de reflujo que consiste en calentar a ebullición una mezcla que contenga, al menos un líquido en el interior del matraz, redondo, en la boca del cual se ha colocado un refrigerante de camisa o serpentín, de modo que los vapores generados en el matraz condensan en el refrigerante y vuelven a caer en el interior del mismo. Permite mantener la reacción a temperatura constante (punto de ebullición del disolvente), el tiempo que sea necesario y sin pérdida de disolvente.

La cafeína es perfectamente soluble en agua caliente, por lo que se puede extraer eficazmente. La cafeína pasa a la disolución acuosa, pero acompañada de otros compuestos orgánicos que también son solubles en agua caliente, especialmente taninos (compuestos de origen vegetal que tienen naturaleza de polifenoles).



**Figura 37.** Extracción sólido-líquido mediante reflujo

- Extracción líquido-líquido

El caso más frecuente es la extracción de una disolución acuosa con un disolvente orgánico. Los disolventes orgánicos utilizados en extracción deben tener baja solubilidad en agua, alta capacidad de solvatación hacia la sustancia que se va a extraer y bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación posterior.

Cuando las dos fases se separan en dos capas, se dará un equilibrio tal que, a una temperatura dada, la razón de la concentración del soluto en cada capa viene dada por una constante llamada coeficiente de distribución o de partición,  $K$ , que es entonces definido por:

$$K = C_A / C_B \quad (13)$$

Donde  $C_A$  es la concentración en gramos por litro del compuesto en el disolvente A y  $C_B$  es la concentración del mismo en el disolvente B.

A nivel de laboratorio el proceso se desarrolla en un embudo de decantación. La extracción nunca es total, pero se obtiene más eficacia cuando la cantidad del segundo disolvente se divide en varias fracciones y se hacen sucesivas extracciones que cuando se añade todo de una vez y se hace una única extracción.



**Figura 38.** Extracción líquido-líquido con embudo de decantación

- Disolvente para la extracción

La cafeína es bastante más soluble en un disolvente orgánico que en agua; así que agitando el filtrado en contacto con un cierto volumen de disolvente en el embudo de decantación, la cafeína pasa mayoritariamente a la fase orgánica.

La elección del disolvente se realiza en cada caso teniendo en cuenta la solubilidad en el mismo de la sustancia a extraer y la facilidad con que puede separarse ésta del disolvente.

Se utilizó cloroformo por la gran solubilidad en el mismo de la mayor parte de los compuestos orgánicos y por su bajo punto de ebullición (62°C). Sin embargo, su gran volatilidad y su fácil inflamabilidad exigen manejarlo con la máxima precaución.

**Tabla 6.** *Disolvente escogido.*

Disolvente	P <sub>eb</sub> (°C)	P <sub>f</sub> (°C)	Constante dieléctrica	Miscibilidad en agua
Cloroformo	61,3	-63,5	4,7	-

Dado que el disolvente orgánico es más denso que el agua, formará la capa inferior, que se podrá recoger separada simplemente abriendo la llave del embudo. La glucosa se separa de la cafeína extrayendo ésta en el disolvente orgánico, en el que la glucosa no es soluble.

La extracción líquido-líquido con ayuda del embudo no puede ser demasiado vigorosa, para evitar la formación de emulsiones que retardan drásticamente la definición de las dos fases. Una emulsión es una dispersión de gotas muy finas de un líquido en otro inmiscible, y en los procesos de extracción puede causar tropiezos.



**Figura 39.** *Extracción líquido-líquido con embudo de decantación en la que se ven la fase orgánica y la fase acuosa.*

- Emulsiones

La extracción líquido-líquido con ayuda del embudo no puede ser demasiado vigorosa, para evitar la formación de emulsiones que retardan drásticamente la definición de las dos fases. Una emulsión es una dispersión de gotas muy finas de un líquido en otro inmiscible, y en los procesos de extracción puede causar tropiezos.

Si la emulsión llegara a formarse, es aconsejable adicionar un compuesto iónico como cloruro de sodio (NaCl) o sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a la fase acuosa; los componentes iónicos disminuyen la tensión en la superficie de las gotas de agua, e incrementan drásticamente la incompatibilidad entre el agua y los solventes orgánicos, facilitando la rápida y clara distinción de las dos capas.

## Filtración

La filtración es la operación unitaria en la que el componente sólido insoluble de una suspensión sólido-líquido se separa del componente líquido haciéndolo pasar a través de una membrana porosa que retiene a las partículas sólidas en su superficie.

Se le denomina prefiltrado a la suspensión sólido-líquido alimentada, filtrado al componente líquido que pasa a través de la membrana, a la membrana se le conoce como el medio filtrante y a los sólidos separados se les llama torta del filtro.

Todo equipo de filtración, independientemente de su diseño, debe tener un soporte para el medio filtrante, un espacio para la acumulación de sólidos, canales para alimentar el prefiltrado y para retirarlo, y un medio para inducir el flujo del filtrado a través del filtro. En algunas ocasiones es el líquido (el filtrado) el que constituye al producto deseado, y en otras ocasiones la torta del filtro.

La filtración puede efectuarse en caliente o frío, y realizarse por gravedad o por vacío. Se escogió la filtración en caliente y por gravedad.

La disolución de la mezcla sólida en el disolvente caliente, permite eliminar mediante filtración las impurezas insolubles, mientras la muestra permanece disuelta en el disolvente caliente. La filtración en caliente presenta algunas ventajas como: es más rápida; y se mantiene a la temperatura del disolvente evitando la formación de cristales en el papel de filtro y su contaminación como resultado del enfriamiento de la solución.

Las filtraciones que se realizan en la separación de la cafeína se hacen con la solución caliente para evitar la formación de cristales y obtener un rendimiento óptimo. Esta operación debe efectuarse con mucho cuidado y rápidamente, con un mínimo de evaporación en el embudo y provisto de un filtro de pliegues para aumentar la velocidad de filtración.



**Figura 40.** Filtración en caliente a través de un filtro de pliegues

## **Evaporación**

El objetivo de esta operación es concentrar una solución que consta de un soluto no volátil y un disolvente volátil. Se lleva a cabo vaporizando una parte del disolvente con el fin de obtener una solución concentrada.

Existen operaciones de extracción en las que se le añaden grandes cantidades de disolventes orgánicos, que es necesario eliminar para obtener los extractos o los productos naturales en forma pura.

El equipo que se utilizó para este tipo de operación es una manta calefactora ya que permite realizar la evaporación del disolvente en el matraz donde se introduce la disolución, mediante calentamiento y eliminando los disolventes utilizados en la purificación y aislamiento de compuestos orgánicos.

Esto permite la formación de una película de líquido muy fina y una gran transferencia de calor entre la manta y el matraz, consiguiéndose una evaporación muy rápida.



**Figura 41.** *Evaporación de la solución acuosa en la manta calefactora*

- **Desecantes**

Cuando se lleva a cabo una extracción la fase orgánica arrastra cierta cantidad de agua por lo que, antes de realizar una posterior purificación de los productos, hay que secarla. Para ello se usan sustancias químicas que reaccionan de alguna forma con el agua o absorben ésta, eliminándola, y que se denominan agentes desecantes.

Se utilizó el sulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ya que es inerte e insoluble en los líquidos orgánicos por lo que se puede utilizar para secar cualquier tipo de compuestos. Es barato y presenta una gran capacidad, sin embargo, es lento pero eficaz. Adecuado para desecar compuestos fácilmente descomponibles, como ácidos grasos, aldehídos, cetonas, halogenuros de alquilo.

Dependiendo del producto comercial (yerba mate, café, bebida de cola, guaraná, chocolate, té o bebida energética) que se utilice se opera con diferentes técnicas para la separación y purificación de la cafeína. Cada uno de los ensayos utilizados se describe paso a paso en los procedimientos normalizados de trabajo (PNT's) que se pueden observar en el anexo 4 del PFC1 que se adjuntan en este trabajo.



## 5.5. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC)

Se presenta el desarrollo, y puesta a punto de una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para determinar y cuantificar la cafeína en presencia de otros compuestos.

### 5.5.1. Instrumentación

Equipos: Cromatógrafo Perkin Elmer Series 410 LCPump:

Bomba PerkinElmer LC-410

Detector Perkin Elmer LC-410

Interfase Perkin Elmer 970

Jeringa: Tipo Hamilton de 50  $\mu$ L

Columna de acero Inoxidable Nucleosil 100 (C18):

Longitud: 100 mm, diámetro interno: 4,6 mm, tamaño de partícula: 5  $\mu$ m

Reactivos: Cafeína anhidra

Acetonitrilo HPLC

Agua HPLC

### 5.5.2. Puesta a punto del Sistema Cromatográfico

Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del principio activo a evaluar: cafeína, así como la solubilidad en los solventes recomendados para HPLC (acetonitrilo, agua, metanol), sus características de polaridad y sus propiedades de absorción de la radiación se decidió ensayar una fase móvil conformada por agua y acetonitrilo.

Para la separación cromatográfica se empleó una columna C18 para fase reversa y detección a 273 nm.

Se propuso el sistema:

Columna: Nucleosil 100 C18, 5 micrómetros, 100 x 4,6 mm.

Detector: UV (273 nm).

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 20  $\mu$ L

En la puesta a punto del método cromatográfico se ajustaron las condiciones cromatográficas, inicialmente encontradas en bibliografía, para conseguir una eficiente determinación cuantitativa de la cafeína. Con este objetivo se realizaron diferentes ensayos, empezando por construir una recta de calibrado con soluciones patrón de cafeína de concentración conocida. Una vez obtenida dicha recta patrón, nos servirá para interpolar en ella las áreas correspondientes a nuestros problemas (cafeína extraída de los distintos cafés ensayados) y obtener la cantidad de cafeína que contienen.

1. Para la preparación de las soluciones patrón se procedió a insertar un embudo para pesar sólidos dentro de la báscula, se taró (0 mg) y posteriormente se pesaron 40 mg de cafeína anhidra pura (peso real: 39,90 mg).

Después, se preparó la solución patrón A: estos 39,90 mg de cafeína anhidra pura se pasaron mediante el mismo embudo para pesar sólidos, a un matraz aforado de 100 ml y se enrasaron con agua Mili-Q filtrada HPLC. Obteniendo una concentración de 399 ppm (399 mg/L).

Para la preparación de la solución patrón B: se pipetearon 10 ml de la solución patrón A y se pasaron a un matraz aforado de 100 ml donde se enrasaron con agua Mili-Q filtrada HPLC. Obtenemos una concentración de 39,90 ppm (39,90 mg/L).

Seguidamente, se prepararon las siguientes diluciones:

- (5 ml de la solución patrón B + 2 ml de solución HCl 0,01M)/ 50 ml agua Mili-Q filtrada HPLC = 3,99 ppm
  - (5 ml de la solución patrón B + 1 ml de solución HCl 0,01M)/ 25 ml agua Mili-Q filtrada HPLC = 7,98 ppm
  - (10 ml de la solución patrón B + 1 ml de solución HCl 0,01M)/ 25 ml agua Mili-Q filtrada HPLC = 15,96 ppm
  - (15 ml de la solución patrón B + 1 ml de solución HCl 0,01M)/ 25 ml agua Mili-Q filtrada HPLC = 23,94 ppm
  - (20 ml de la solución patrón B + 1 ml de solución HCl 0,01M)/ 25 ml agua Mili-Q filtrada HPLC = 31,92 ppm
2. Para la preparación de las soluciones de cafeína de café obtenidas mediante extracción (ver Capítulo 5).

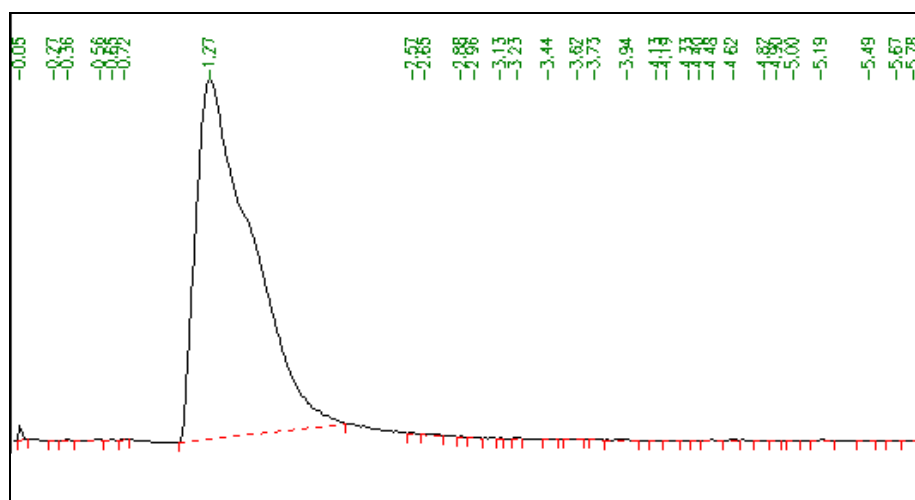
Se propuso empezar a ensayar con diferentes proporciones de la fase móvil teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la puesta a punto del sistema cromatográfico, realizada antes de que el cromatógrafo de líquidos (HPLC) se estropeará. El desarrollo de la puesta a punto se puede ver al completo en el Anexo 1.

Se empezó a ensayar con diferentes muestras de cafeína de café y la misma fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 70:30.

**Tabla 7.** Fase móvil estudiada con diversas muestras de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Solución patrón 15,95 ppm	Agua-Acetonitrilo	70:30	1,27
Muestra de cafeína de café Costa Rica 1 (sin HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	70:30	1,28
Muestra de cafeína de café Costa Rica 2 (sin HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	70:30	1,31
Muestra de cafeína de café Costa Rica 1 (con HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	70:30	1,31
Muestra de cafeína de café Costa Rica 2 (con HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	70:30	1,31

Para una fase móvil de 70% de agua y 30% de acetonitrilo:



**Figura 42.** Cromatograma de la fase móvil 70% de agua y 30% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 15,96 ppm.

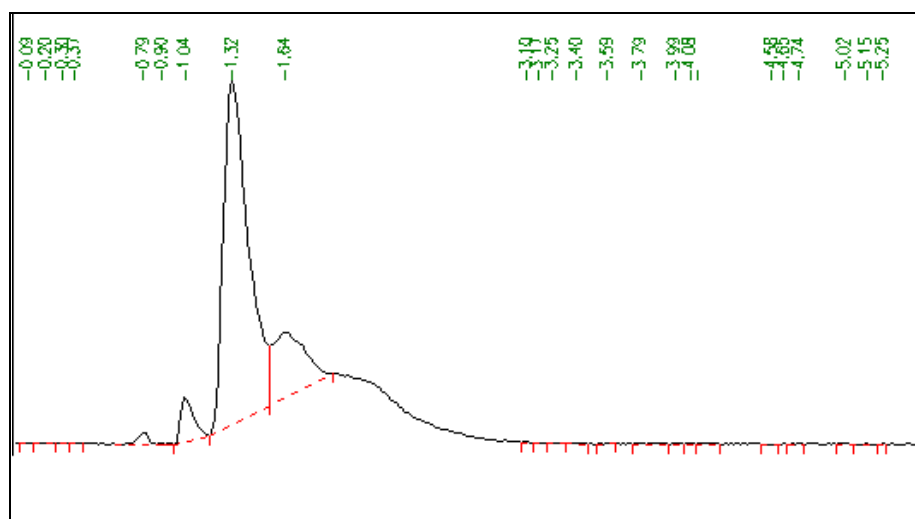
De las diversas inyectadas realizadas de las muestras de cafeína, utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 70:30 se obtuvieron cromatogramas en los cuales podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a unos tiempos de retención que oscilaban entre 1,27 y 1,31 minutos.

Se propuso seguir ensayando con una proporción diferente de la fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 80:20.

**Tabla 8.** Fase móvil estudiada con diversas muestras de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Muestra de cafeína de café Costa Rica 2 (con HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	80:20	1,29
Solución patrón de cafeína de 15,96 ppm	Agua-Acetonitrilo	80:20	1,32

Para una fase móvil de 80% de agua y 20% de acetonitrilo:



**Figura 43.** Cromatograma de la fase móvil 80% de agua y 20% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 15,96 ppm.

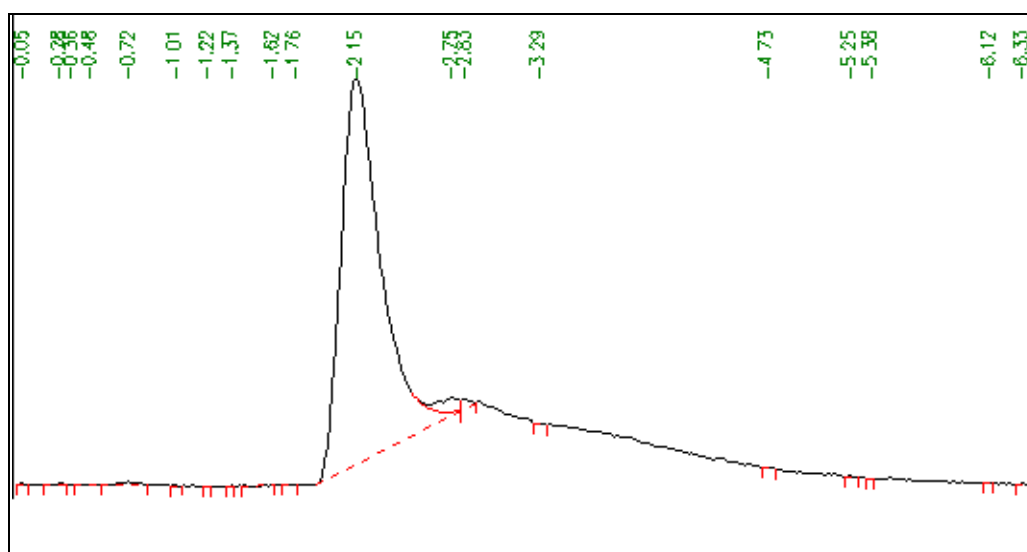
De las diversas inyectadas realizadas de las muestras de cafeína, utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 80:20 se obtuvieron cromatogramas en los cuales podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a unos tiempos de retención que oscilaban entre 1,29 y 1,32 minutos.

Se propuso cambiar la proporción de la fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 85:15.

**Tabla 9.** Fase móvil estudiada con diversas muestras de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Solución patrón de cafeína de 15,96 ppm	Agua-Acetonitrilo	85:15	2,15
Muestra de cafeína de café Costa Rica 2 (con HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	85:15	2,19
Solución patrón B de cafeína de 39,90 ppm	Agua-Acetonitrilo	85:15	1,88
Muestra de cafeína de café Kenia 2 (con HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo	85:15	2,07
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo	85:15	1,97

Para una fase móvil de 85% de agua y 15% de acetonitrilo:



**Figura 44.** Cromatograma de la fase móvil 85% de agua y 15% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 15,96 ppm.

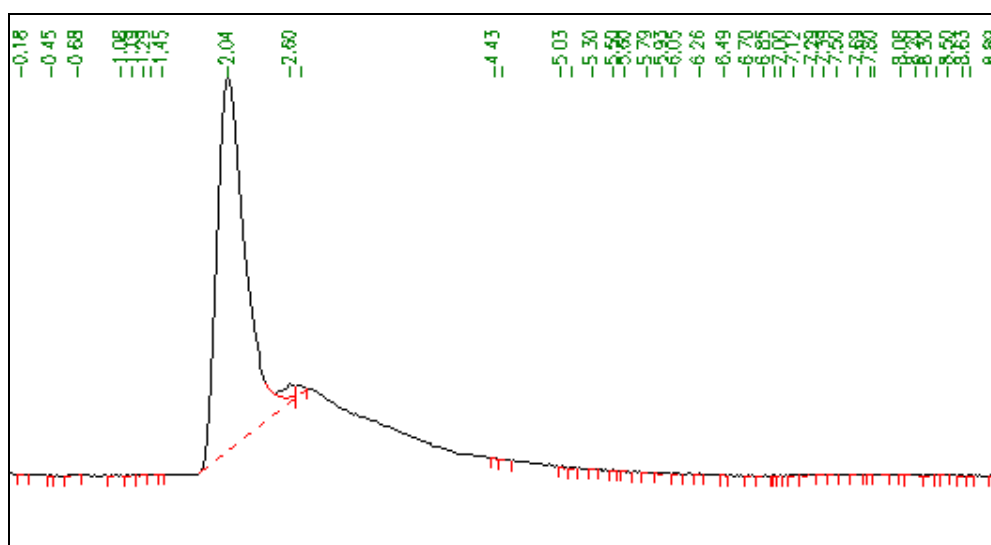
De las diversas inyectadas realizadas de las muestras de cafeína, utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 85:15 se obtuvieron cromatogramas en los cuales podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a unos tiempos de retención que oscilaban entre 1,88 y 2,19 minutos.

Se propuso cambiar la proporción de la fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 90:10.

**Tabla 10.** Fase móvil estudiada con diversas muestras de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo	90:10	2,04

Para una fase móvil de 90% de agua y 10% de acetonitrilo:



**Figura 45.** Cromatograma de la fase móvil 90% de agua y 10% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 31,92 ppm.

Utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 90:10 se obtuvo un cromatograma en el cual podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a un tiempo de retención de 2,04 minutos.

Al ver que aumentando cada vez más el porcentaje de agua de fase móvil se conseguía un pico más definido aunque con una base ancha.

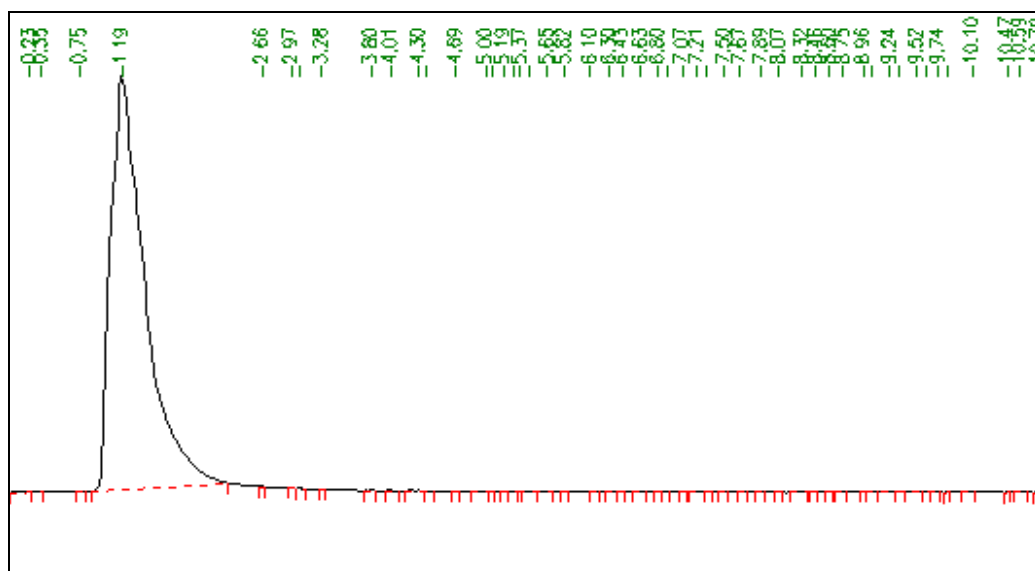
Se propuso hacer lo contrario cambiando la proporción de la fase móvil aumentando cada vez más la cantidad de acetonitrilo de la fase móvil.

Se cambió a una fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 30:70 y se probó ir aumentando cada vez más la velocidad de flujo con el fin de definir más la forma del pico.

**Tabla 11.** Fase móvil estudiada con diversas muestras de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo (velocidad de 1 ml/min)	30:70	1,19
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo (velocidad de 1,2 ml/min)	30:70	1,00
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo (velocidad de 1,5 ml/min)	30:70	0,81
Muestra de cafeína de café Costa Rica 2 (con HCl 0,01 M)	Agua-Acetonitrilo (velocidad de 1,5 ml/min)	30:70	0,80

Para una fase móvil de 30% de agua y 70% de acetonitrilo a una velocidad de 1 ml /min:



**Figura 46.** Cromatograma de la fase móvil 30% de agua y 70% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 31,92 ppm.

De las diversas inyectadas realizadas de las muestras de cafeína, utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 30:70 se obtuvieron cromatogramas en los cuales podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a unos tiempos de retención que descendían a medida que aumentaba la velocidad: de 1,19 minutos a 1 minuto y finalmente hasta los 0,80 minutos.

Se comprobó que manteniendo la misma proporción de fase móvil pero aumentando progresivamente la velocidad, se conseguían unos picos mucho más definidos aunque su tiempo de retención disminuía significativamente.

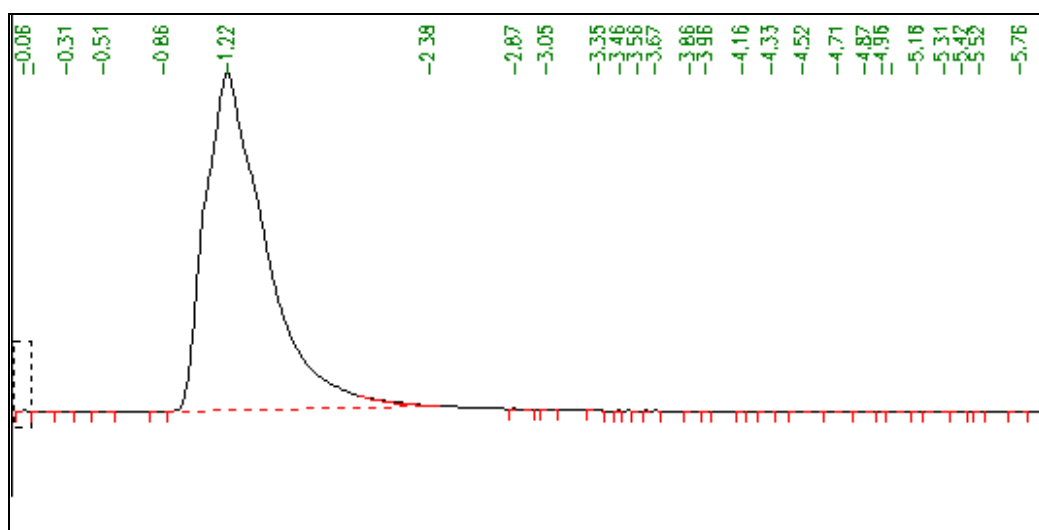
Así que se decidió seguir probando con diferentes proporciones de fase móvil pero con una velocidad constante de **1 ml/min**.

Se siguió ensayando con diferentes proporciones de fase móvil:

**Tabla 12.** Fases móviles estudiadas con muestras patrón de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo	35:65	1,22
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo	40:60	1,21

Para una fase móvil de 35% de agua y 65% de acetonitrilo.

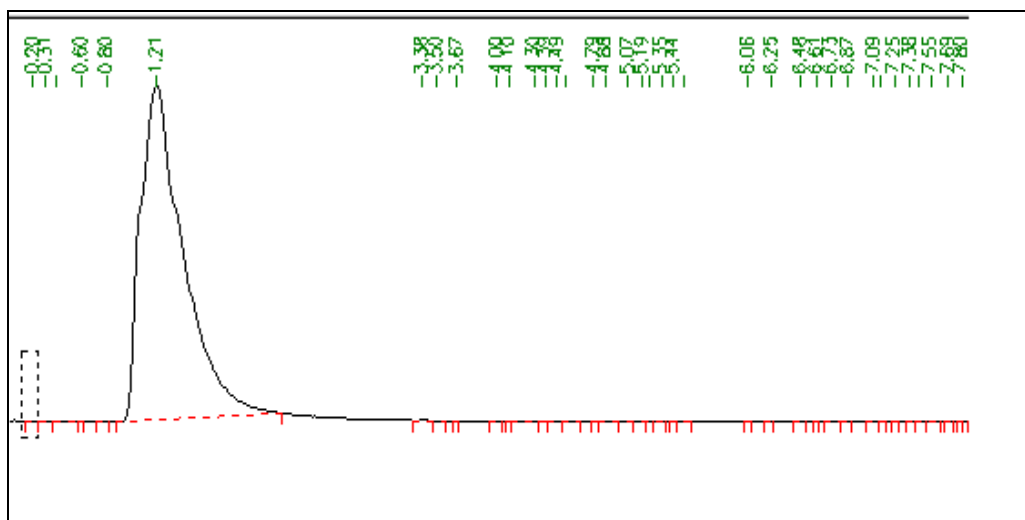


**Figura 47.** Cromatograma de la fase móvil 35% de agua y 65% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 31,92 ppm.

Utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 35:65 se obtuvo un cromatograma en el cual podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a un tiempo de retención de 1,22 minutos.



Para una fase móvil de 40% de agua y 60% de acetonitrilo.



**Figura 48.** Cromatograma de la fase móvil 40% de agua y 60% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 31,92 ppm.

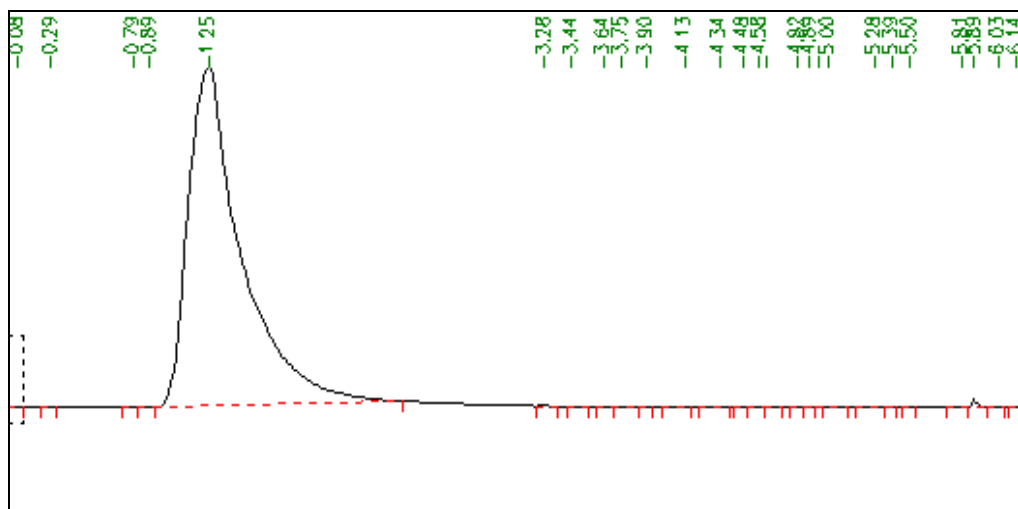
Utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 40:60 se obtuvo un cromatograma en el cual podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a un tiempo de retención de 1,21 minutos.

Se siguieron probando diferentes proporciones de fase móvil:

**Tabla 13.** Fases móviles estudiadas con muestras patrón de cafeína

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo	25:75	1,25
Solución patrón de cafeína de 31,92 ppm	Agua-Acetonitrilo	20:80	1,27

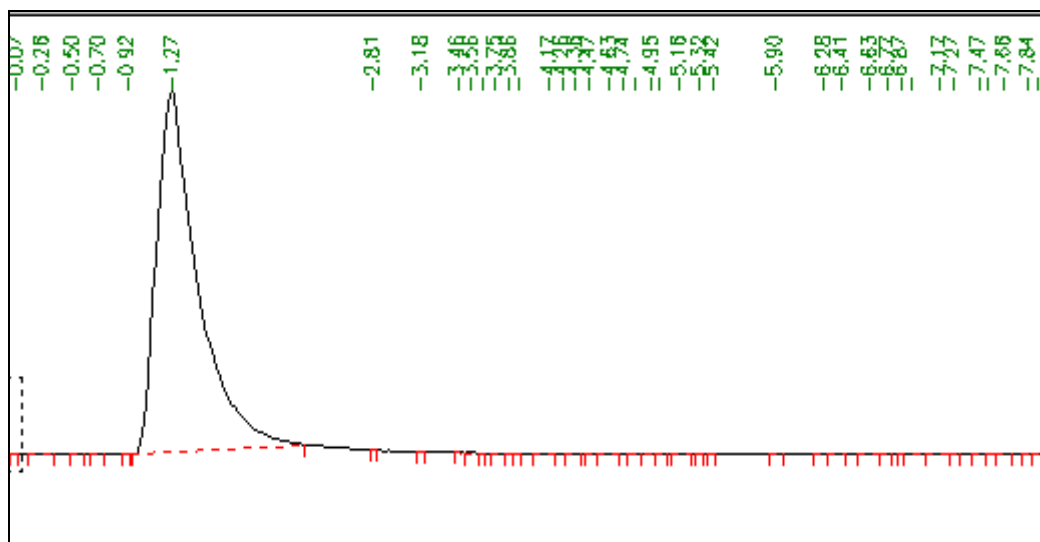
Para una fase móvil de 25% de agua y 75% de acetonitrilo:



**Figura 49.** Cromatograma de la fase móvil 25% de agua y 75% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 31,92 ppm.

Utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 25:75 se obtuvo un cromatograma en el cual podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a un tiempo de retención de 1,25 minutos.

Para una fase móvil de 20% de agua y 80% de acetonitrilo:



**Figura 50.** Cromatograma de la fase móvil 20% de agua y 80% de acetonitrilo con la solución patrón de cafeína de 31,92 ppm.

Utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 2:80 se obtuvo un cromatograma en el cual podía apreciarse que la cafeína salía de la columna a un tiempo de retención de 1,27 minutos y un pico definido, menos ancho en su base.

Una vez realizadas todas las pruebas necesarias y de acuerdo con los resultados obtenidos, la fase móvil óptima que permitía una mejor interacción con la fase estacionaria y la mejor separación era la compuesta por la fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 20:80.

Al trabajar en una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa, la fase estacionaria de la columna es apolar y la fase móvil es polar. Esto hace que primero eluya el más polar que es el agua y después eluya el menos polar que es el acetonitrilo. Por lo que a la proporción de 20% de agua eluye primero (pasa de largo sin interaccionar con la cafeína) y el 80% de acetonitrilo retiene durante más tiempo la cafeína haciendo que su aparición sea alrededor de entre los 1,28 y 1,30 minutos de tiempo.

Al aumentar la polaridad de la fase móvil se aumenta el tiempo de retención. Por ello, en los primeros ensayos al ir aumentando más la cantidad de agua (polar) que de acetonitrilo (menos polar) se obtenía un tiempo de retención superior de alrededor de los 2 minutos pero con un pico con una forma definida aunque con una base ancha.

Por eso se decidió ir probando diferentes proporciones de fase móvil con una mayor cantidad de acetonitrilo que de agua hasta encontrar la composición óptima de fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 20:80 que nos permitía obtener un tiempo de retención superior al minuto (se gasta menos cantidad de producto que si hubieran sido 2 minutos) y una forma de pico muy bien definida.

## 5.6. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV

Se presenta el desarrollo y puesta a punto de una metodología analítica por espectrofotometría UV-VIS para determinar y cuantificar la cafeína.

### 5.6.1. Instrumentación

Equipos: Agilent 8453 Sistema de Espectroscopía UV-Visible  
Cubeta de cuarzo de 10 mm

Reactivos: Cafeína anhidra  
Agua Milli-Q (Millipore).  
Ácido clorhídrico 0,01 M

### 5.6.2. Puesta a punto del Sistema Espectrofotométrico

Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del principio activo a evaluar, así como el disolvente utilizado para la preparación de las muestras, se decide realizar espectros UV en el rango de longitudes de onda entre 300 y 190 nm ya que teóricamente a 273 nm, la cafeína presenta un máximo de absorción.

En la puesta a punto del método espectrofotométrico se pensó empezar a ensayar con las soluciones patrón y las soluciones de cafeína de café obtenidas mediante extracción, para así poder comparar las concentraciones de cafeína con el fin de saber las cantidades necesarias de café para realizar la extracción:

1) Patrones: 10, 20, 40, 60 y 80 ppm.

La preparación de las soluciones diluidas conteniendo 10, 20, 40, 60 y 80 microgramos por mililitro de cafeína se puede encontrar ampliamente detallada en el Capítulo 5.

Una vez se han preparado los patrones y se ha efectuado la recta de calibrado que relaciona concentraciones y valores de absorbancia, se observa que el rango de concentraciones no es el adecuado, ya que a partir de los 20 ppm ya no se cumple la ley de Beer (ver Capítulo 4).

Se decidió disminuir las concentraciones de los patrones.

2) Patrones: 4, 8, 16, 24 y 32 ppm.

Siguiendo los pasos descritos en la preparación de las muestras patrón indicados en el capítulo 4, se preparan soluciones diluidas conteniendo 4, 8, 16, 24 y 32 microgramos por mililitro de cafeína.

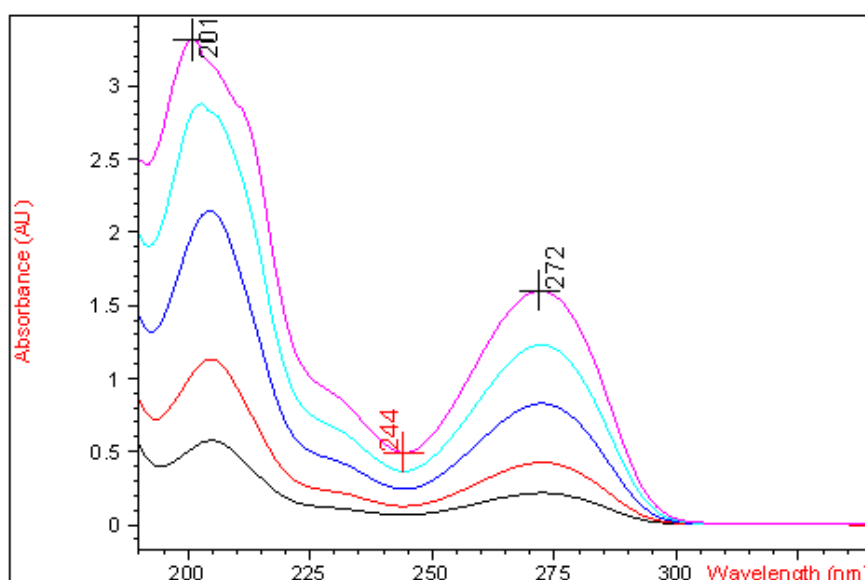
Una vez se han preparado los patrones y se ha efectuado la recta de calibrado, se observa que las concentraciones son óptimas, ya que en ese rango se cumple la ley de Beer.

Se realizan una serie de pruebas para garantizar la recta que mejor se ajuste a los datos experimentales.

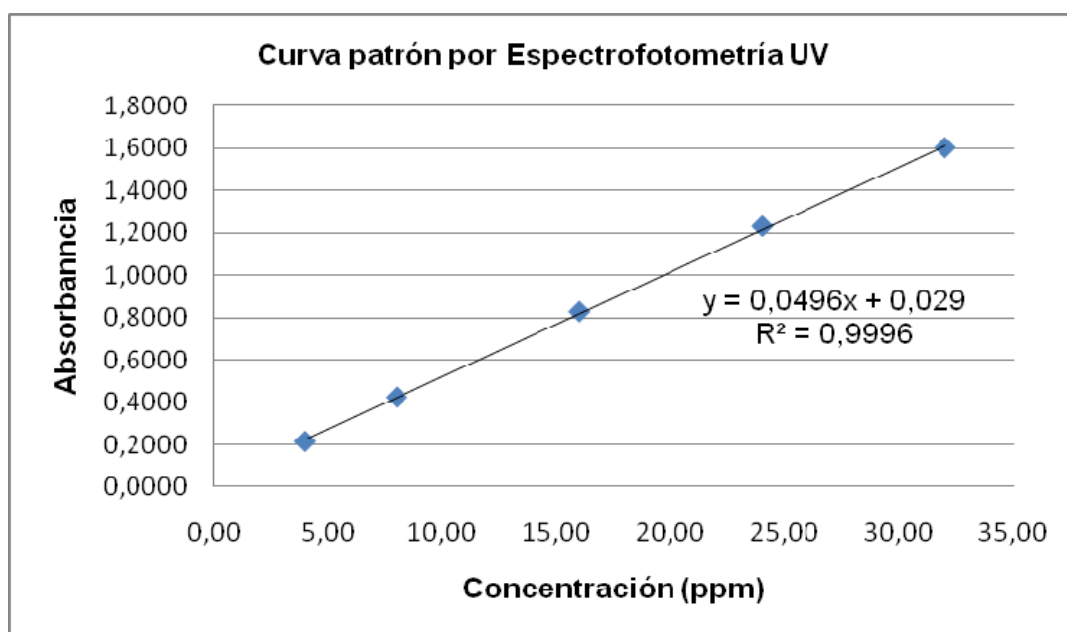
**Tabla 14.** Datos de la recta de calibrado en cada una de las pruebas

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
Coeficiente $k_1$ (mg/L)	21,2220	21,0910	21,0880	19,7090
Desviación estándar de $k_1$ (mg/L)	0,2563	0,2985	0,3133	0,1868
Desviación estándar de calibrado (mg/L)	0,5298	0,6208	0,6519	0,4170
Coeficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9994	0,9992	0,9991	0,9996

Después de realizar diferentes ensayos, la que proporciona mejor resultado es la cuarta prueba, ya que se ha obtenido un valor de  $R^2 = 0,9996$ .



**Figura 51.** Espectro de las muestras patrón de la cuarta prueba



**Figura 52.** Recta de calibrado de la cuarta prueba

Este valor, garantiza la bondad del ajuste de los puntos experimentales a la recta de calibrado.

### 3) Peso de café: 400 mg de café

Siguiendo los pasos descritos en el método de extracción (capítulo 5), se decide extraer la cafeína de un café comercial (café natural Carrefour), iniciando la extracción con 400 mg de café.

**Tabla 1.** Absorbancia del café Carrefour

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	Longitud de onda (nm)	Absorbancia (AU)
Muestra de cafeína de café Carrefour	271	1,5544
	271	1,5595
	271	1,5586

Se observa que la absorbancia obtenida en este café es elevada, ya que contiene una concentración comprendida entre los 24-32 ppm.

## 4) Peso de café: 300 mg de café

Se decide disminuir el peso de café a 300 mg, para realizar el procedimiento de extracción. Se decide extraer la cafeína de dos cafés: Caracolillo y Costa Rica de tostadero Bon Mercat.

**Tabla 2.** Absorbancia del café Caracolillo y Costa Rica

SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	Longitud de onda (nm)	Absorbancia (AU)
Muestra de cafeína de café Caracolillo	266	1,1881
	266	1,1901
	266	1,1898
Muestra de cafeína de café Costa Rica	271	0,8433
	271	0,8468
	271	0,8492

El peso de café utilizado es óptimo ya que nos proporciona unos valores intermedios, que permiten interpolar en la recta de calibrado.

Finalmente, como conclusión de la puesta en marcha de este sistema, se analizarán las muestras pesando una cantidad aproximada de café de 300 mg. Se comprueba que el peso de café utilizado es óptimo ya que nos proporciona unos valores intermedios, que permiten interpolar en la recta de calibrado y disminuir el error.

También, se trabajó representando una curva patrón con valores distintos de concentración de cafeína. Estos patrones seleccionados contienen una concentración de 4, 8, 16, 24 y 32 ppm.

# **CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para la identificación y cuantificación de la cafeína preparamos las muestras tal y como se indica en el Capítulo 5. Dentro de las muestras de café, se han analizado diferentes tipos de café según sus características; tales como la variedad del café, el país de origen, procesado y la preparación.

Cada muestra de café se analiza por separado. Para los cafés de tostadero se preparan soluciones por triplicado de extracciones diferentes. En los cafés de marcas comerciales se desarrollan soluciones por duplicado de extracciones distintas.

Las soluciones se analizan por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y por espectrofotometría UV, hallándose de esta manera la concentración de cafeína presente en cada una de las muestras.



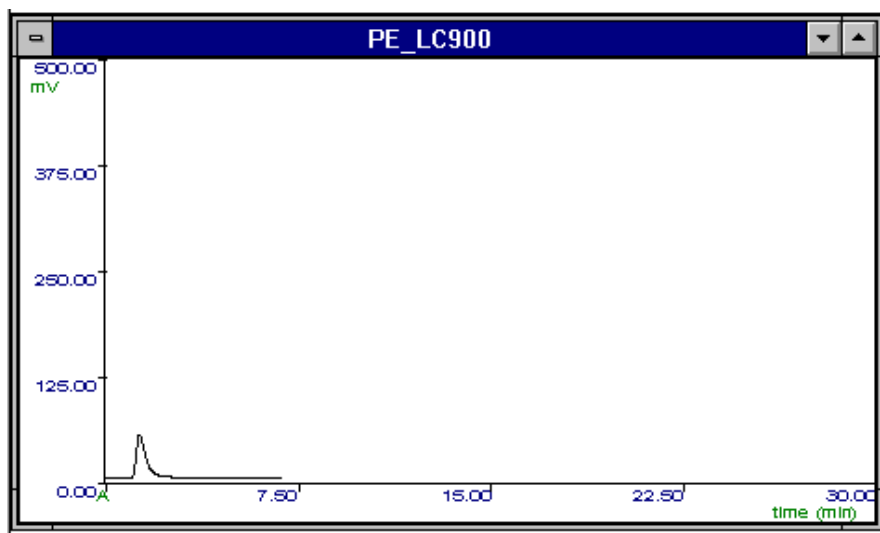
## 6.1. RESULTADOS OBTENIDOS POR (HPLC)

A partir de los resultados obtenidos en la puesta a punto del sistema cromatográfico, se definió que la fase móvil que permitía una mejor determinación cuantitativa de la cafeína era la compuesta por la fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 20:80.

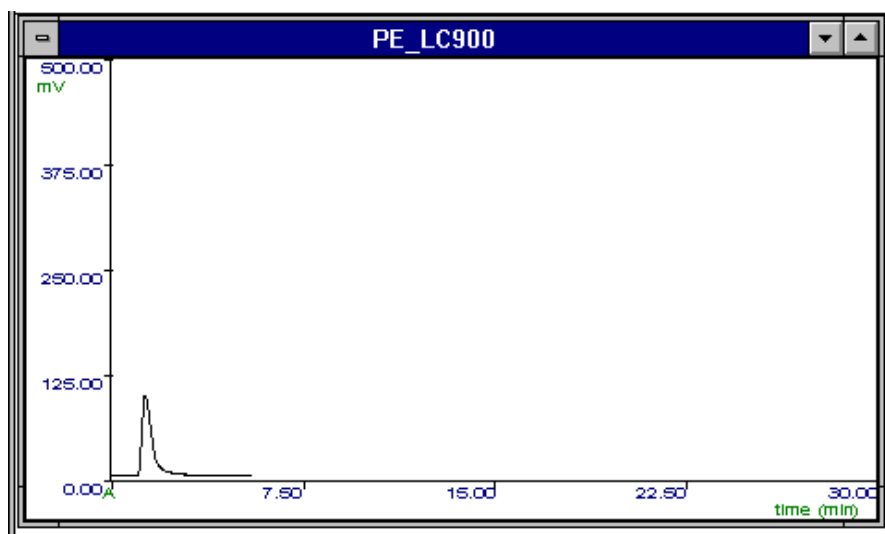
Se empezó a inyectar las soluciones patrón realizadas nuevamente y las soluciones de cafeína obtenida por extracción (ver Capítulo 4) en diferentes tipos de cafés.

Se inyectaron 20  $\mu$ l de muestra (volumen del loop de inyección) con una velocidad de flujo de fase móvil de 1 ml/min con elución de modo isocrático y a temperatura ambiente.

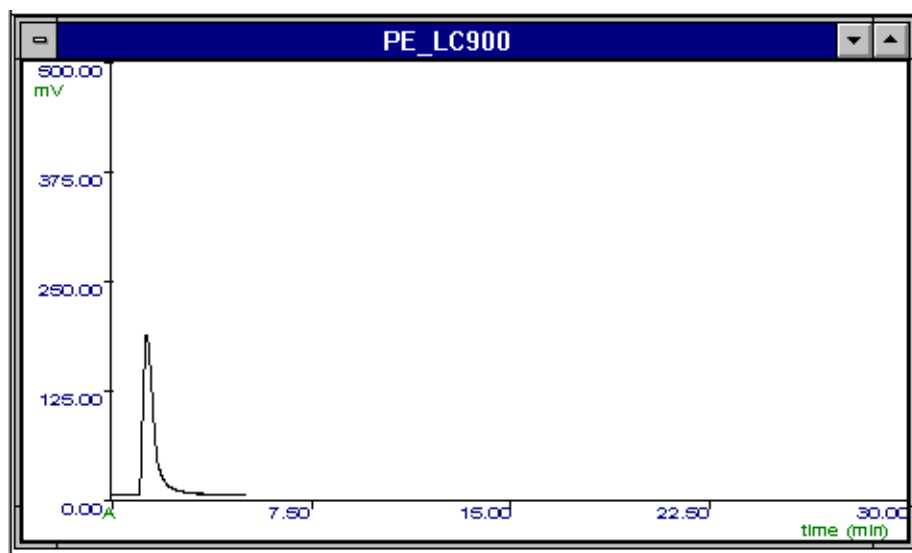
Las soluciones patrón de cafeína con concentraciones: 4,00 ppm, 8,00 ppm, 16,00 ppm, 24,00 ppm y 32,00 ppm se inyectaron por separado en el sistema cromatográfico y se registraron los siguientes cromatogramas:



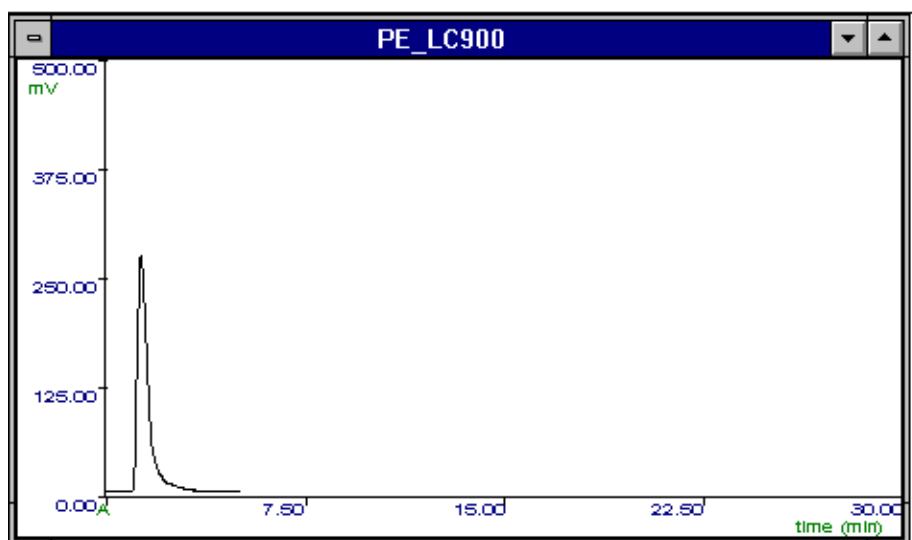
**Figura 53.** Cromatograma de la solución patrón 4 ppm.



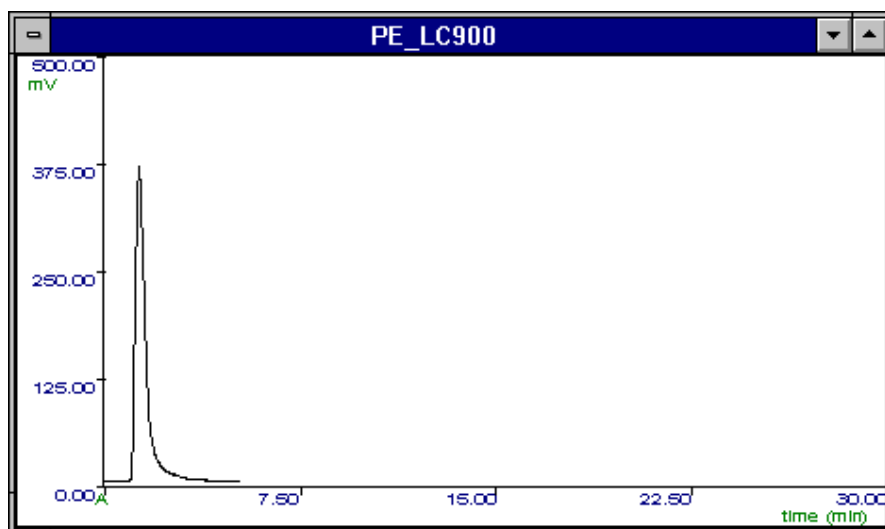
**Figura 54.** Cromatograma de la solución patrón 8 ppm.



**Figura 55.** Cromatograma de la solución patrón 16 ppm.



**Figura 56.** Cromatograma de la solución patrón 24 ppm.



**Figura 57.** Cromatograma de la solución patrón 32 ppm.

### 6.1.1. Determinación de la cafeína por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

#### Determinación de la concentración de cada muestra

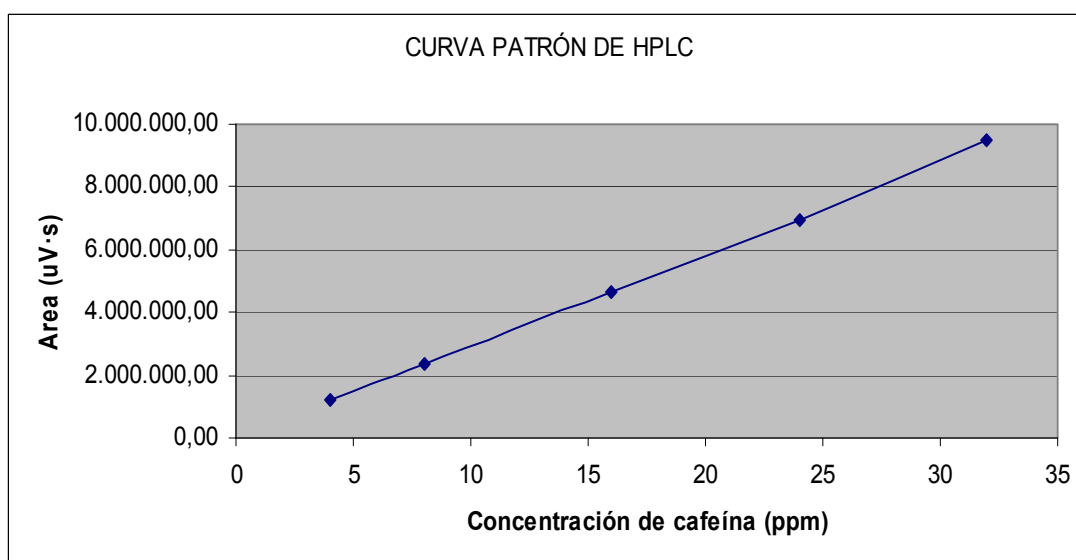
Utilizamos la recta de calibrado obtenida y que relaciona concentraciones de cafeína (abscisas) y áreas de pico (en ordenadas), para interpolar en ella las áreas de cada pico correspondiente a cafeína (aprox.  $t_r = 1,28$  min) en los diferentes cafés ensayados y conocer así su concentración.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de las inyectadas de las soluciones patrón.

**Tabla 3.** Concentraciones patrón de cafeína y sus áreas

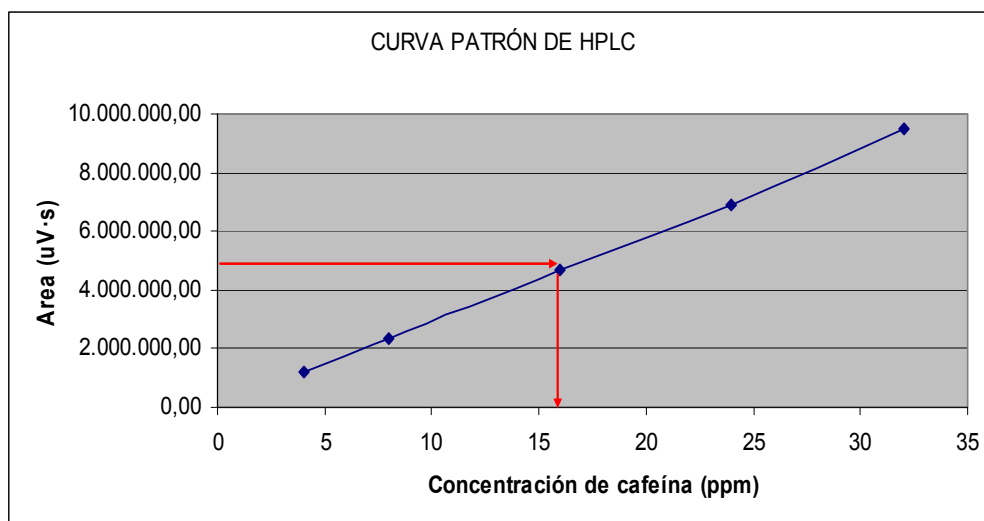
CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA (mg/ml)	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN
4	1.195.488,17	1,26
8	2.344.794,17	1,27
16	4.664.782,50	1,28
24	6.921.478,17	1,29
32	9.499.379,17	1,30

En la siguiente figura se representaron gráficamente las áreas obtenidas con las soluciones patrón frente a sus correspondientes concentraciones (ppm).



**Figura 58.** Curva de calibrado obtenida con HPLC

Se interpoló el área del pico correspondiente a la muestra de cafeína de café en la curva estándar y se obtuvo la concentración de la muestra inyectada (ver recorrido de las flechas rojas).



**Figura 59.** Interpolación de solución patrón en la curva de calibrado

Para realizar estos cálculos se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (14)$$

$$R^2 = 0,99940061$$

Así que teniendo en cuenta que la ecuación obtenida en la curva de calibrado es:

$$Y = m \cdot x + b \quad (15)$$

Donde: **Y:** Área

**m:** Pendiente de la curva de calibrado

**x:** Concentración de cafeína de las muestras inyectadas (ppm)

**b:** Ordenada en el origen de la curva de calibrado

A partir de las áreas de los cromatogramas obtenidos y con la ecuación de la curva de calibrado se obtiene la cantidad de cafeína contenida en las muestras de café. Para la preparación de las muestras de cafeína de café obtenidas mediante extracción (Ver capítulo 4).

### Cálculos

En los cálculos para cuantificar la cantidad de cafeína en cada café, se utilizaron todos los valores de áreas resultantes de las diversas inyectadas de muestras de cafeína de café, a excepción de los valores de áreas que despreciamos, ya que pensamos que pudieron haber pérdidas en el proceso de extracción.

En el Anexo 1, se pueden ver la totalidad de los resultados obtenidos de las diferentes muestras de cafés, así como los resultados tabulados. A continuación se muestran unos ejemplos de cálculo de la concentración de cafeína de cada uno de los tipos de café.

### Café de tostadero

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café natural de Brasil de tostadero Bon Mercat y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 4.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café Brasil natural. Tostadero Bon Mercat				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Brasil 1	1	1,31	3.107.982,5000	3.149.061,7500
	2	1,31	3.190.141,0000	
Brasil 2	1	1,33	3.007.938,0000	2.979.114,0000
	2	1,31	2.950.290,0000	
Brasil 3	1	1,32	3.365.353,0000	3.338.872,5000
	2	1,32	3.312.392,0000	

La concentración del café natural Brasil del tostadero Bon Mercat se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones, ya que los resultados son muy similares.

- Área media del café Brasil natural de tostadero ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) = **3.155.682,75**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

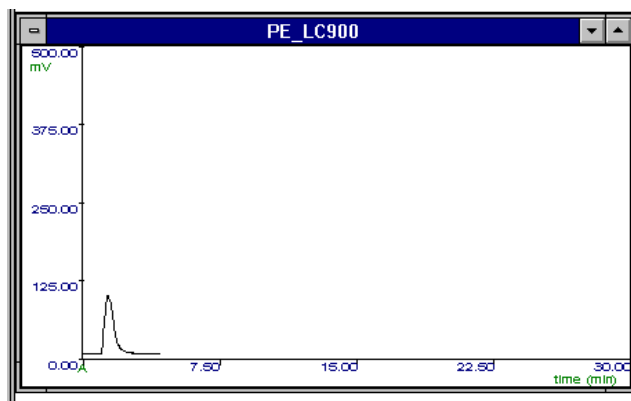
$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (16)$$

Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$3.155.682,75 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (17)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína en:

- Concentración de cafeína en HPLC = **10,79** ppm



**Figura 60.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Brasil Bon Mercat.

### Café natural

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café natural 100% arabiga Saimaza Brasil y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 5.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café molido de tueste natural 100% Arábica. Saimaza Brasil.				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Saimaza Brasil 1	1	1,33	3.018.386,0000	2.975.572,50
	2	1,33	2.964.731,5000	
	3	1,32	2.943.600,0000	
Saimaza Brasil 2	1	1,32	3.292.049,8300	3.178.237,28
	2	1,33	3.154.807,0000	
	3	1,32	3.087.855,0000	

La concentración del café natural Saimaza Brasil se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones, ya que los resultados son muy similares.

- Área media del café natural Saimaza Brasil (uV·s) = **3.076.904,89**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

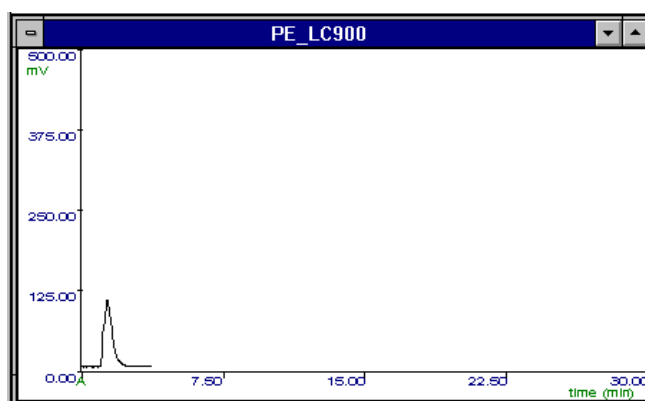
$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (18)$$

Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$3.076.904,89 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (19)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína:

- Concentración de cafeína en HPLC = **10,52 ppm**



**Figura 61.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Brasil Saimaza

Café mezcla

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café mezcla (50% natural y 50% torrefacto) Bonka y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 6.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café molido mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto). Bonka				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Bonka mezcla 50/50 1	1	1,32	4.352.926,5000	4.322.491,17
	2	1,32	4.488.246,0000	
	3	1,32	4.126.301,0000	
Bonka mezcla 50/50 2	1	1,31	4.224.099,0000	4.274.942,33
	2	1,32	4.222.980,0000	
	3	1,32	4.377.748,0000	

La concentración del café mezcla Bonka se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones, ya que los resultados son muy similares.

- Área media del café mezcla Bonka (uV·s) = **4.298.716,75**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

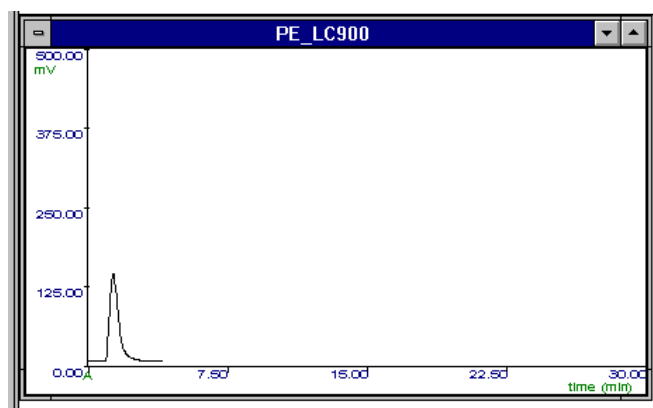
$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (20)$$

Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$4.298.716,75 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (21)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína:

- Concentración de cafeína en HPLC = **14,67 ppm**



**Figura 62.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Bonka.

### Café natural descafeinado

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café natural descafeinado gran aroma Marcilla y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 7.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café molido descafeinado de tueste 100% natural. Gran Aroma Marcilla				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Marcilla descafeinado natural 1	1	1,27	1.046.912,1400	1.068.389,38
	2	1,27	1.085.960,0000	
	3	1,27	1.072.296,0000	
Marcilla descafeinado natural 2	1	1,27	920.685,5100	955.124,5033
	2	1,27	972.508,0000	
	3	1,27	972.180,0000	

La concentración del café natural descafeinado Marcilla se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones, ya que los resultados son muy similares.

- Área media del café descafeinado Marcilla (uV·s) = **1.011.756,94**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (22)$$

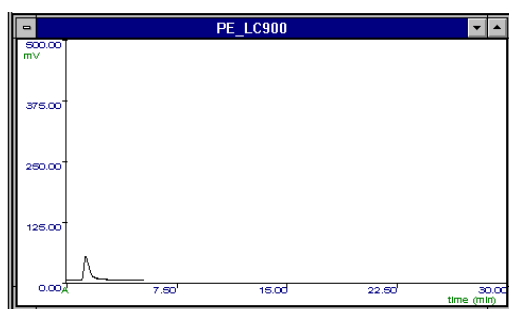
Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$1.011.756,94 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (23)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína:

- Concentración de cafeína en HPLC = **3,51 ppm**

En este caso se tuvo que extrapolar ya que el rango de las soluciones patrón abarcan de los 4 a los 32ppm. Los 3,51 ppm están por debajo de ese rango.



**Figura 63.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Marcilla.



Café mezcla descafeinado

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café mezcla (50% natural y 50% torrefacto) descafeinado Día y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 8.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café molido mezcla descafeinado (50 % natural y 50 % torrefacto). Día				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Día mezcla 50/50 descafeinado 1	1	1,26	602.392,0000	631.304,5733
	2	1,26	673.412,5000	
	3	1,26	618.109,2200	
Día mezcla 50/50 descafeinado 2	1	1,28	346.080,0000	388.603,4767
	2	1,27	380.568,9300	
	3	1,29	439.161,5000	

La concentración del café mezcla descafeinado Día se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones.

- Área media del café mezcla descafeinado Día (uV·s) = **509.954,02**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (24)$$

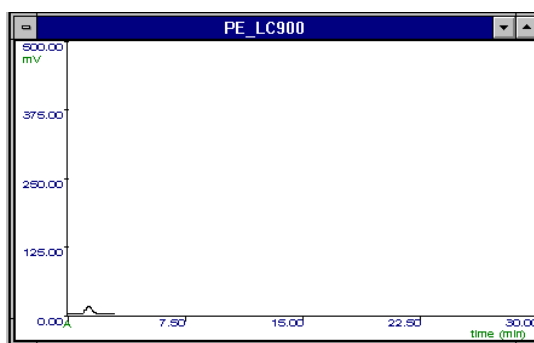
Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$509.954,02 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (25)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína:

- Concentración de cafeína en HPLC = **1,80 ppm**

En este caso se tuvo que extrapolar ya que el rango de las soluciones patrón abarcan de los 4 a los 32ppm. Los 1,80 ppm están por debajo de ese rango.



**Figura 64.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Día.

### Café soluble

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café soluble natural Nescafé y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 9.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café soluble de tueste 100% natural. NESCAFÉ Classic Natural				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Nescafé soluble natural 1	1	1,33	8.615.776,5000	8.647.965,83
	2	1,33	8.796.931,5000	
	3	1,31	8.531.189,5000	
Nescafé soluble natural 2	1	1,33	8.972.830,0000	8.941.025,33
	2	1,33	8.875.422,0000	
	3	1,33	8.974.824,0000	

La concentración del café soluble natural Nescafé se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones.

- Área media del café soluble natural Nescafé (uV·s) = **8.794.495,58**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

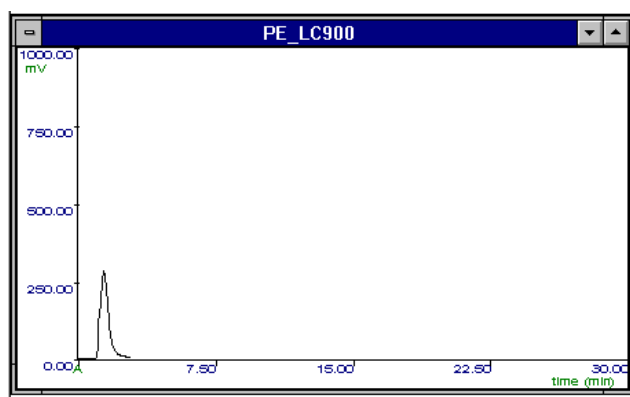
$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (26)$$

Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$8.794.495,58 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (27)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína:

- Concentración de cafeína en HPLC = **29,94 ppm**



**Figura 65.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Nescafé.

Café soluble descafeinado

En la siguiente tabla se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café soluble natural descafeinado Carrefour y el tiempo de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

**Tabla 10.** Muestras de cafeína de café, tiempo de retención y áreas

Café soluble descafeinado de tueste 100% natural. Carrefour				
HPLC				
Nombre	Valoración	Tiempo retención (min)	Área	Área media
Carrefour soluble descafeinado natural 1	1	1,30	845.436,0000	827.922,0000
	2	1,32	810.408,0000	
Carrefour soluble descafeinado natural 2	1	1,31	924.346,0000	910.436,8750
	2	1,30	896.527,7500	

La concentración del café soluble natural descafeinado Carrefour se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones.

- Área media café soluble descafeinado Carrefour ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) = **869.179,43**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

$$Y = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (28)$$

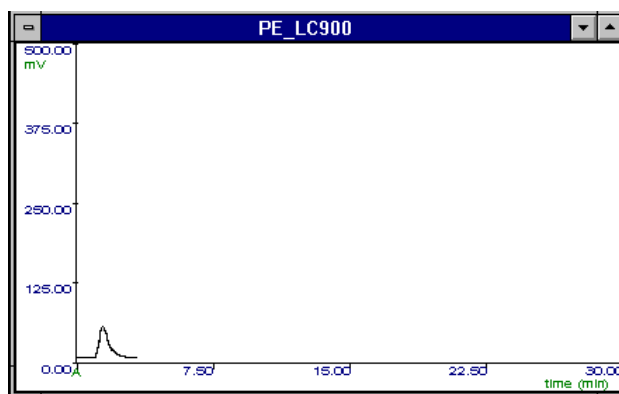
Se sustituye la Y por la media de las áreas obtenidas:

$$869.179,43 = 294.506 \cdot x - 22.523 \quad (29)$$

Y despejando x se obtiene la concentración de cafeína:

- Concentración de cafeína en HPLC = **3,03 ppm**

En este caso se tuvo que extrapolar ya que el rango de las soluciones patrón abarcan de los 4 a los 32ppm. Los 3,03 ppm están por debajo de ese rango.



**Figura 66.** Cromatograma de la muestra de cafeína del café Carrefour.

### **Cálculos para la determinación del tanto por ciento de cafeína en los diferentes cafés analizados.**

Seguidamente, una vez determinadas las áreas de cada una de las muestras, se determina la concentración de cafeína que poseen en tanto por cien (%).

En los cálculos iniciales se supuso que los cafés contenían un 1,2 % de cafeína y se trabajó pesando 300 mg de café.

Se procedió a determinar la cantidad de cafeína hallada mediante las áreas de los picos correspondientes a la cafeína en los distintos cromatogramas obtenidos.

Datos:

Peso de café real = 300 mg

Solución A = mg cafeína extraída / 100 ml agua Milli-Q

Solución B = 10 ml solución A / 25 ml agua Milli-Q

En estos factores de conversión se pueden apreciar los cálculos de uno de los cafés anteriormente descritos.

Café soluble natural descafeinado Carrefour:

$$100ml \text{ sol A} \cdot \frac{25ml \text{ sol B}}{10ml \text{ sol A}} \cdot \frac{3,03mg \text{ cafeína en café}}{1000ml \text{ sol B}} = 0,7575mg \text{ cafeína en café}$$

$$\frac{0,7575mg \text{ cafeína en café}}{300mg \text{ de café}} \cdot 100 = 0,25\%$$

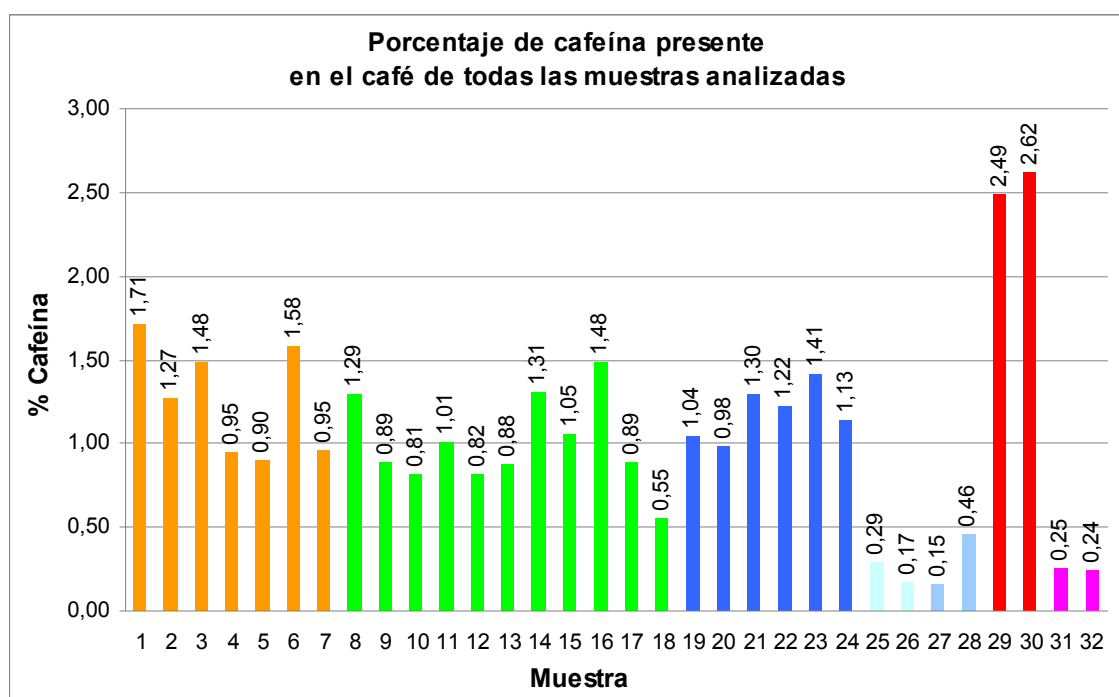
Por lo tanto, se estaría hablando de que el café soluble natural descafeinado Carrefour posee una concentración real de **0,25% de cafeína**.

Los cálculos de los demás cafés se pueden ver tabulados y representados en el Anexo 1.

## Discusión de resultados

Se representa en tanto por ciento la concentración de cafeína de los diferentes cafés y se observa la variación entre cada uno de ellos.

En los siguientes diagramas, se muestran las diferencias de concentraciones de las 32 muestras analizadas, en función de los cafés de diferente origen adquiridos en el tostadero Bon Mercat (muestras de la 1 a la 7) y según los diferentes tipos de café de marcas comerciales: naturales (muestras de la 8ª a la 18), mezcla (muestras de la 19 a la 24), naturales descafeinados (muestras 25 y la 26), mezclas descafeinados (muestras 27 y 28), solubles naturales (muestras 29 y 30) y solubles descafeinados (muestras 31 y 32) .



**Figura 67.** Representación de la concentración de cafeína de todas las muestras analizadas

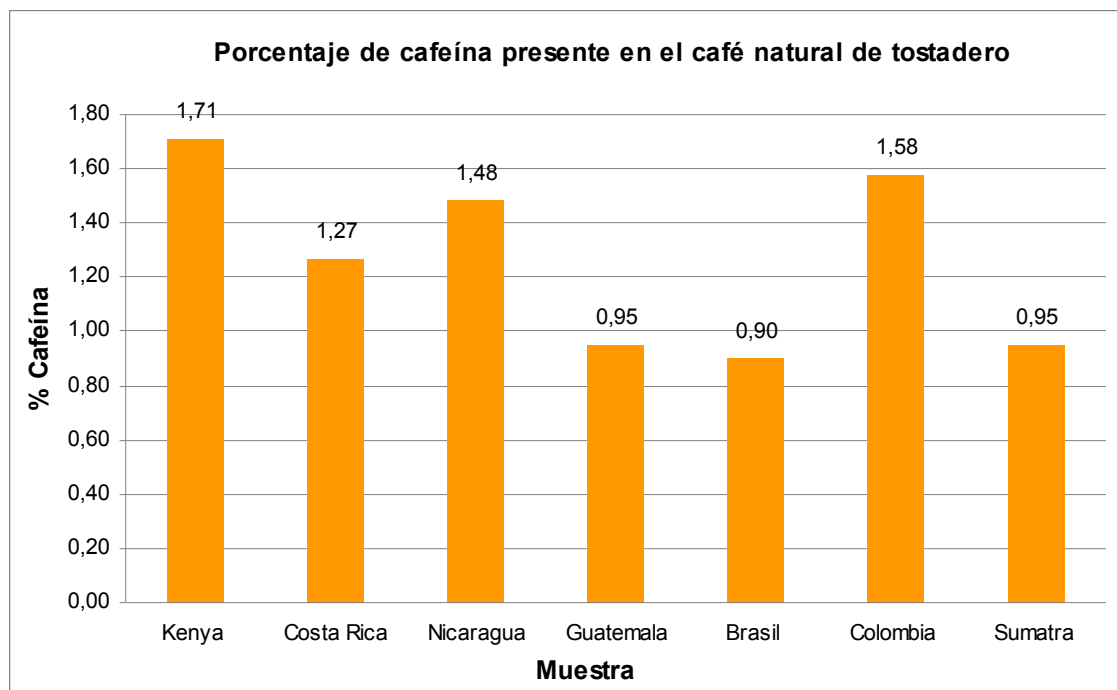
Como se puede observar hay una gran similitud de concentración de cafeína entre cada uno de los diferentes tipos de café. Los cafés solubles son los que muestran una mayor concentración de cafeína.

Todos los cafés, los cálculos de los porcentajes y las gráficas resultantes se pueden encontrar tabulados y representados en el Anexo 1.

En los siguientes diagramas, se muestra la diferencia de concentraciones en función de los cafés de diferente origen adquiridos en el tostadero Bon Mercat y según los diferentes tipos de café de marcas comerciales.

### Según cafés de tostadero:

En el siguiente diagrama se representan 7 muestras de cafés diferentes, se encuentran cafés de Kenya, Costa Rica, Caracolillo (Nicaragua), Guatemala, Brasil, Colombia y Sumatra. Los siete cafés utilizados para el análisis pertenecen a la variedad arábica.



**Figura 68.** Representación de la concentración de cafeína según país de origen

Se observa que el café de Kenya es el que más concentración de cafeína contiene con 1,71%, seguido del café de Colombia que posee un 1,58%. A diferencia de los demás, el café de Brasil, es el que contiene menor cantidad de cafeína.

El café natural crudo o tostado tiene un contenido en cafeína que sería normal entre 0,8% y 2,4%, según tipo y variedad. Los datos bibliográficos encontrados, informan que la variedad de café arábica contiene poca cafeína, comprendida entre 0,7 y 1,5%. Por lo tanto, todas las concentraciones de cafeína obtenidas en nuestros ensayos están dentro del rango definido, ya que los resultados oscilan entre 0,90% y 1,71%.

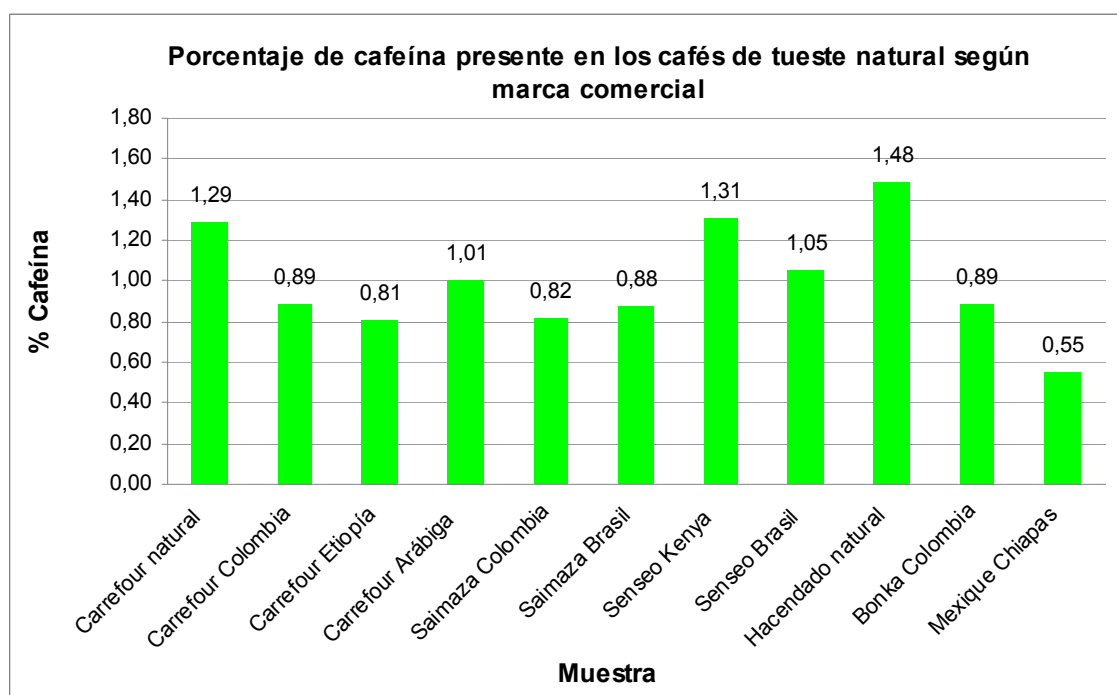
Teniendo en cuenta que los siete tipos de café son 100 % arábicas, el café de Kenya y el café de Colombia sobrepasan por poco el rango definido de concentración de cafeína.

### Según el tipo de café de marcas comerciales:

Las muestras de café de marcas comerciales que se han analizado en el laboratorio, se han clasificado en 6 tipos diferentes. Entre ellos se encuentra los cafés de tueste natural, los cafés de mezcla, los cafés descafeinados 100 % naturales, los cafés descafeinados de mezcla, los cafés solubles 100 % naturales y los cafés solubles 100 % naturales descafeinados.

Primero, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos realizados con los cafés naturales de diferentes marcas comerciales. Las marcas utilizadas son: Carrefour natural, Carrefour Colombia, Carrefour Etiopía, Carrefour Arábica, Saimaza Colombia, Saimaza Brasil, Senseo Kenya, Senseo Brasil, Hacendado natural, Bonka Colombia y Mexique Chiapas.

El siguiente diagrama muestra el tanto por ciento de concentración de cafeína presente en cada una de las muestras de café natural.



**Figura 69.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés naturales de marcas comerciales

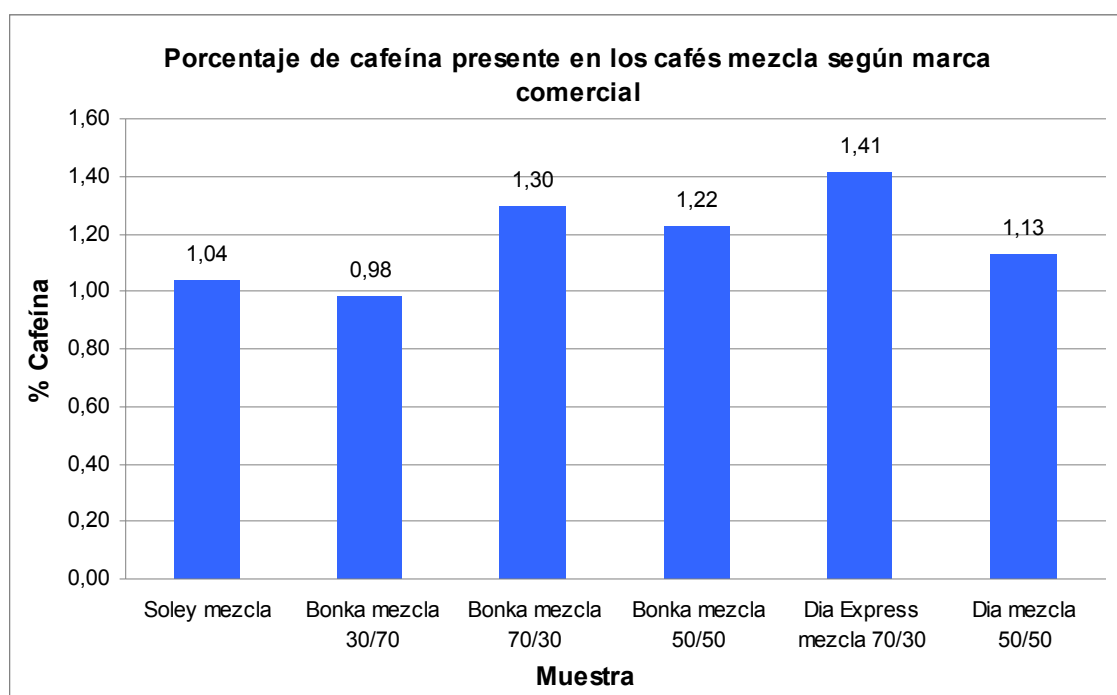
Estos resultados presentan variaciones aún siendo los mismos tipos de café. Puede observarse, que la concentración de cafeína en el café Hacendado natural es mayor que en las demás marcas de café, mientras que el café de Mexique Chiapas presenta menos cantidad de cafeína que todos los demás.

Algunos de estos cafés tienen países de origen diferentes, por lo que los niveles de cafeína hallados pueden variar según el lugar de procedencia. También, en ausencia de más información sobre sus características, es posible que algunos de estos cafés comerciales sean mezclas de variedad robusta y arábica, por lo que el primero podría incrementar su concentración debido a que posee mayor cantidad de robusta que otros.

Atendiendo a la definición anterior sobre la proporción de cafeína en el café natural crudo o tostado, se pueden aceptar los resultados como válidos, ya que todos oscilan en el intervalo descrito entre 0,7 y 1,5%.

En segundo lugar, se exponen los valores de tanto por ciento de cafeína presente en los cafés mezcla de diversas marcas comerciales existentes en el mercado. Los cafés con mezcla natural y torrefacto se consumen habitualmente, puesto que la utilización exclusiva de café natural produce una infusión poco densa y con un color claro, y al mezclarlo con café torrefacto se obtiene más cuerpo y color.

Entre ellos tenemos muestras de Soley mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto), Bonka mezcla Especial (30 % natural y 70 % torrefacto), Bonka mezcla (70 % natural y 30 % torrefacto), Bonka mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto), Dia Express mezcla (70 % natural y 30 % torrefacto) y Dia mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto).



**Figura 70.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés mezcla de marcas comerciales.

Puede observarse que la cantidad de cafeína existente en las mezclas de café es bastante variable. Los cafés que contienen 70% natural y 30% torrefacto, muestran un nivel de cafeína superior a las demás mezclas analizadas. Los cafés con mezcla 50% natural y 50% torrefacto presentan valores muy similares en cuanto a la proporción de cafeína, ya que sus concentraciones oscilan entre 1,04 y 1,22%. El café Bonka de mezcla 30% natural/70% torrefacto, contiene 0,98% y es el de menor concentración de cafeína.

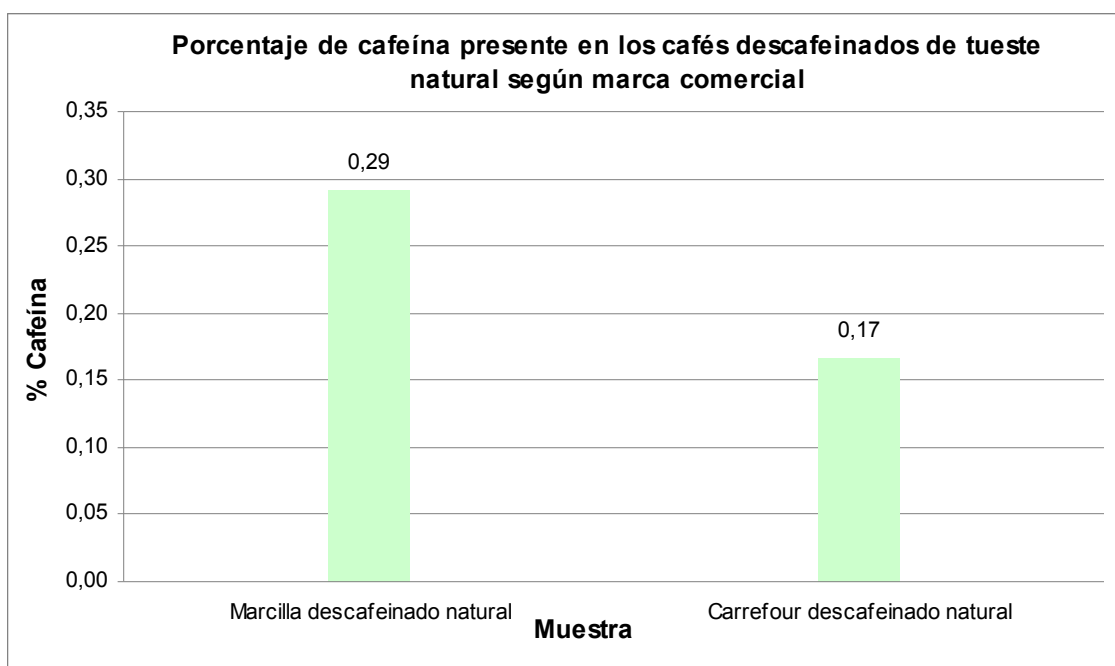
Observando las diferencias halladas en cuanto a la concentración de cafeína en las diferentes mezclas, podría decirse que en función del método de tueste, el nivel de cafeína presente oscila, decreciendo a medida que se aumenta la proporción de café torrefacto. Pero, para poder corroborar esta hipótesis se deberían analizar más muestras de café mezcla 70/30, por lo que sería arriesgado validar esta suposición.



A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los análisis efectuados con los cafés descafeinados de tueste natural de diferentes marcas comerciales existentes en el mercado.

El objetivo de la descafeinación es producir un café que retenga su aroma y sabor a pesar de los procesos que son necesarios para eliminar la cafeína. Como la mayoría de los componentes que dan el sabor al café se desarrollan durante el tostado, el café es normalmente descafeinado en grano verde, antes del tostado.

Las marcas utilizadas son: Marcilla descafeinado 100% natural y Carrefour descafeinado 100% natural.



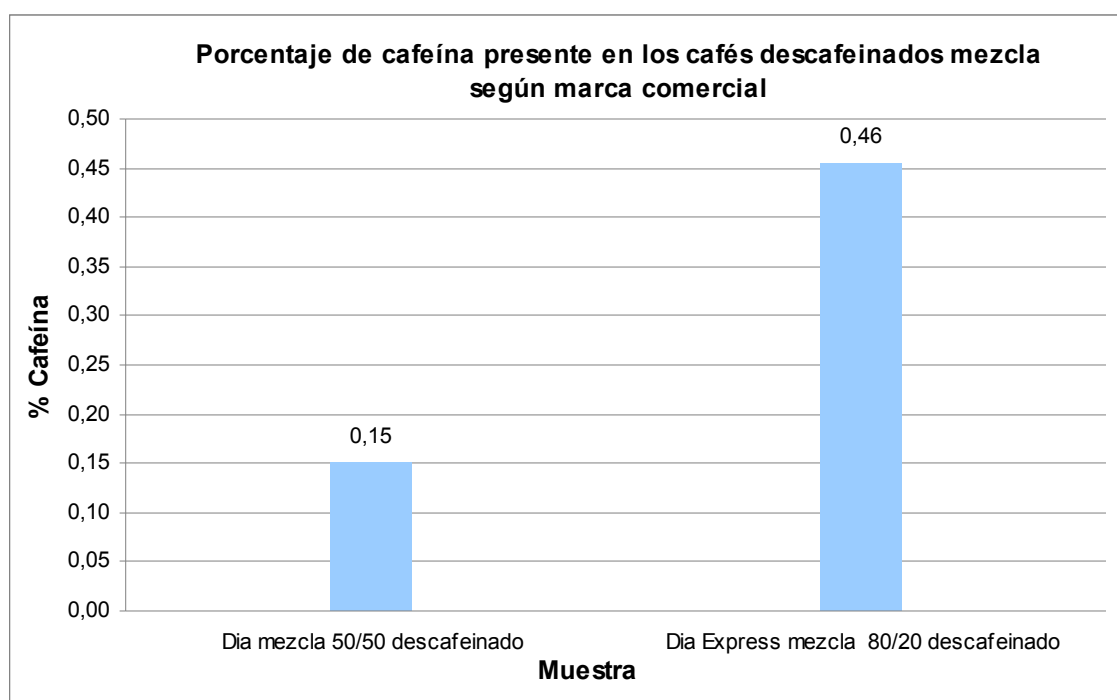
**Figura 71.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés mezcla de marcas comerciales.

En la representación gráfica, se puede apreciar como la cantidad de cafeína presente en estos tipos de café es insignificante. La proporción de cafeína presente en las muestras analizadas en el laboratorio, presentan desigualdad ya que los valores hallados son de 0,29% y 0,17%. Esta disconformidad puede ser consecuencia del método de extracción, ya que durante su separación el procedimiento debe ser muy riguroso debido a que el contenido del principio activo en estos cafés es paupérrimo.

Seguidamente, se exponen los valores de tanto por ciento de cafeína presente en los cafés descafeinados mezcla, de diferentes marcas comerciales presentes en el mercado.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo de la elaboración de café descafeinado es mantener su aroma y sabor excluyendo el principio activo. La extracción se aplica sobre el café verde, pudiendo seleccionar las proporciones necesarias para su tostado natural y torrefacto, y elaborar la mezcla deseada.

Para poder estudiar los niveles de cafeína presentes en los cafés descafeinados de mezcla se han utilizado dos cafés diferentes como son: Día descafeinado mezcla (50% natural y 50% torrefacto) y Día Express descafeinado mezcla (80% natural y 20% torrefacto).



**Figura 72.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés descafeinados mezcla de marcas comerciales.

Puede observarse que la proporción de cafeína existente en las mezclas de café descafeinado es discordante y que el nivel de cafeína hallado es muy pequeño. Atendiendo a lo comentado anteriormente sobre los cafés descafeinados, la cantidad de cafeína extraída en las muestras analizadas, presentan desigualdad con valores de 0,15% y 0,46%, ya que el procedimiento de separación ha de ser minucioso.

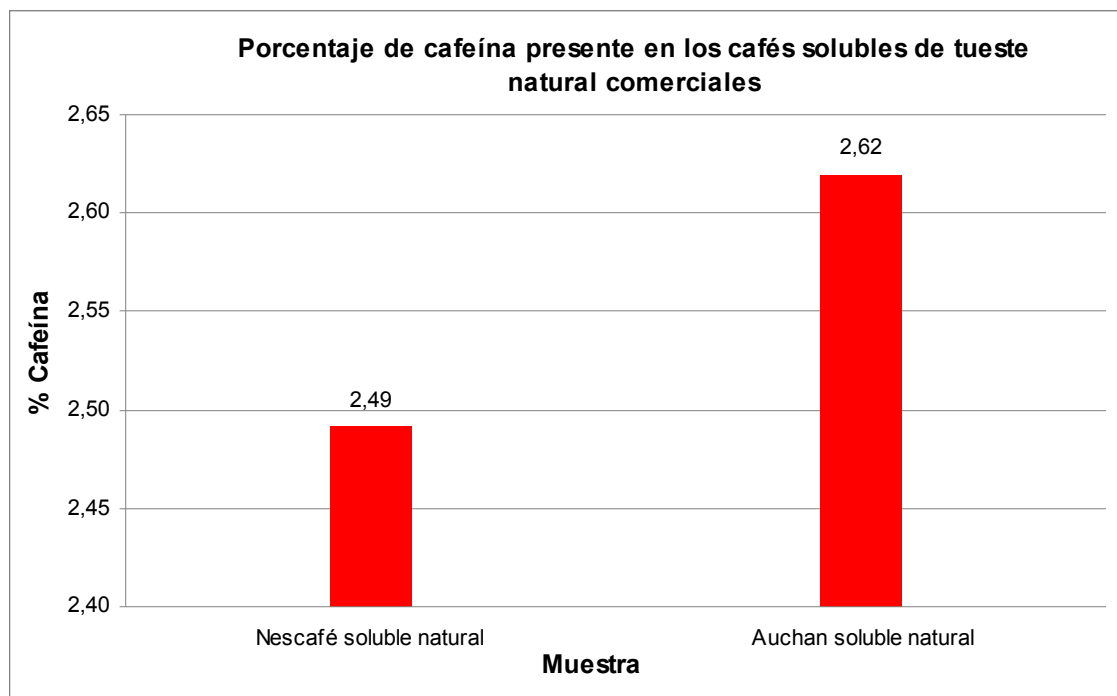
Rescatando la discusión expuesta en los cafés mezcla y observando la representación de los cafés descafeinados mezcla, se puede ver como la concentración de cafeína aumenta a medida que se disminuye la proporción de café torrefacto. Pero, es atrevido aceptar esta hipótesis ya que solo se disponen de dos muestras en el análisis.

A continuación, se presentan los resultados adquiridos en los análisis efectuados con los cafés solubles de tueste natural de diferentes marcas comerciales existentes en el mercado.

El café instantáneo y soluble es café seco en polvo o granulado, que se puede disolver rápidamente en agua caliente para ser consumido. En este caso el café tostado se muele para permitir la extracción de los sólidos solubles con agua a altas temperaturas y presión.

El café soluble tiene hoy su mercado y, aunque la calidad es inferior al grano o molido, posee algunas ventajas como son la facilidad de preparación, que no necesita cafetera, diversidad de usos en repostería, etc. Este tipo de café contiene cafeína siempre en una cantidad superior al 2,5%.

En el siguiente diagrama se representan 2 muestras de cafés diferentes, se encuentran Nescafé y Auchan soluble natural.



**Figura 73.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés solubles naturales de marcas comerciales.

Estos resultados presentan similitud ya que los valores son bastante aproximados. Se aprecia, que la concentración de cafeína en el café soluble natural Auchan es ligeramente mayor que el café soluble de la marca Nescafé.

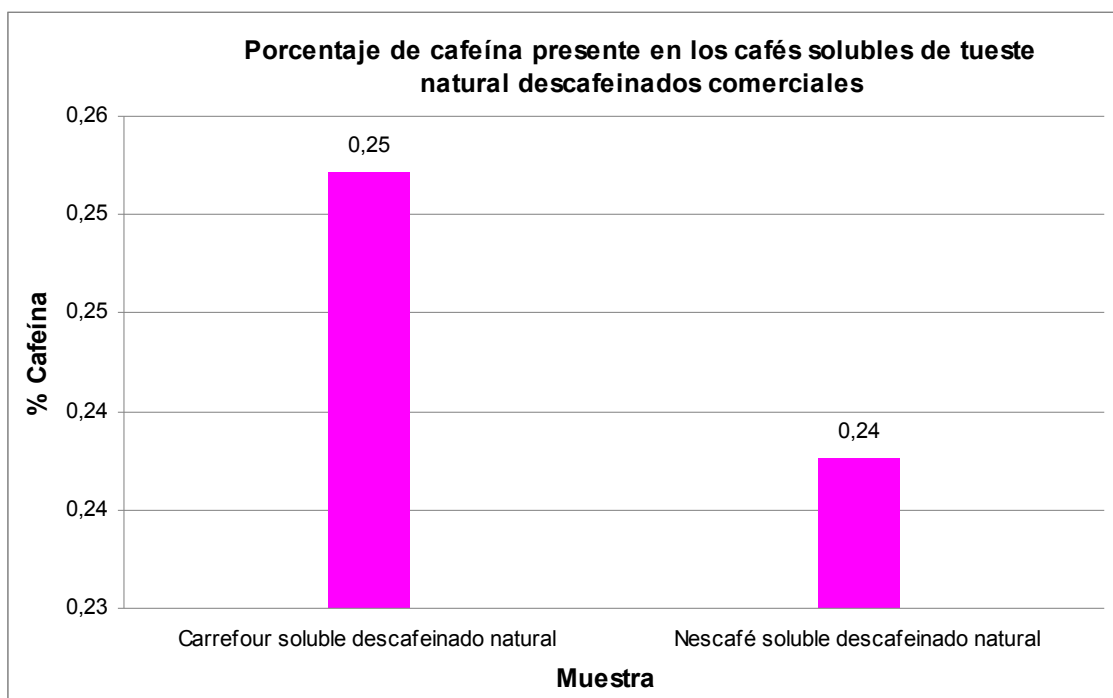
Es posible que algunos de estos cafés comerciales sean mezclas de variedad robusta y arábica, por lo que este primero podría incrementar su concentración debido a que posee mayor cantidad. Según datos bibliográficos, la variedad robusta es usada por la industria alimentaria en la elaboración de café soluble.

En consecuencia, el resultado es aceptable, ya que los cafés robusta contienen una cantidad de cafeína comprendida entre 2% y 3,5%. Las muestras de café, contienen 2,49% y 2,62%, que se encuentra en el rango estimado.

Seguidamente, se exponen los valores de tanto por ciento de cafeína presente en los cafés descafeinados solubles, de diferentes marcas comerciales presentes en el mercado.

Actualmente, los métodos de producción del café soluble descafeinado permiten conservar el aroma y el sabor con una disminución considerable del principio activo estimulante, lo que ha hecho que el café soluble descafeinado se implante en muchos países del mundo.

Según la normativa española, los cafés descafeinados solubles no pueden contener más un 0,3 por ciento (ver anexo 3).

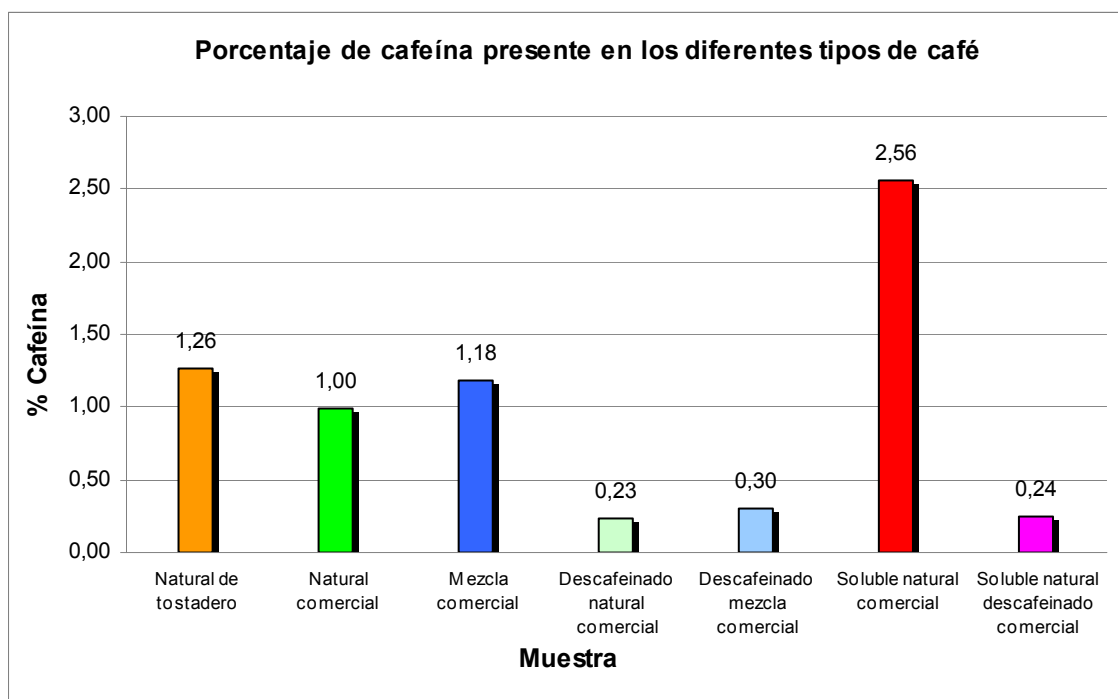


**Figura 74.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés solubles descafeinados naturales de marcas comerciales.

En la representación gráfica, se puede observar como la cantidad de cafeína hallada en estos tipos de café es inapreciable. El tanto por ciento de cafeína presente en las muestras analizadas en el laboratorio, presentan similitud ya que los valores hallados son de 0,25% y 0,24%. Esta semejanza puede ser consecuencia de la solubilidad del café en polvo o granulado en el proceso de extracción, ya que beneficia la separación de la escasa cafeína existente en esos tipos de café.

También, puede apreciarse como la proporción encontrada en la cromatografía HPLC se asemeja al porcentaje máximo de cafeína estimado por la legislación en estos tipos de cafés. La marca comercial Nescafé, supera el máximo permitido, pero la desviación es muy leve.

A continuación, se representan los porcentajes de cafeína presentes en los diferentes tipos de cafés analizados en el laboratorio, con la idea de elaborar una comparación sobre la proporción de este principio activo.



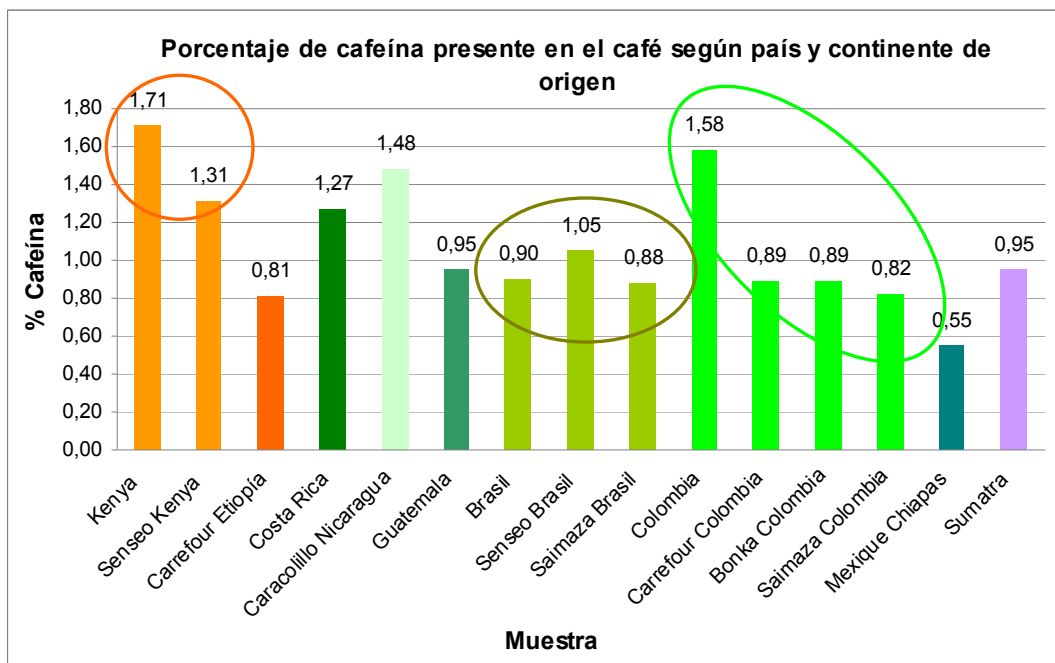
**Figura 75.** Representación de la concentración de cafeína de los diferentes tipos de café

Mediante esta representación gráfica puede observarse como los cafés solubles naturales contienen una proporción de cafeína superior a los demás tipos de café, ya que como se ha comentado anteriormente, son elaborados con los granos de café de variedad robusta.

En último lugar, tenemos los cafés descafeinados naturales y solubles naturales, con una proporción de cafeína de 0,23 y 0,24% respectivamente.

### Según el país de origen:

Observando los valores hallados en los cafés de marca comercial, en los que resalta su marketing según el país de origen, y los resultados experimentales obtenidos en los cafés de tostadero, se puede determinar una comparativa en cuanto a la concentración de cafeína en cada uno de ellos.



**Figura 76.** Representación de la concentración de cafeína según país y continente de origen con cafés de tostadero y comerciales

Los cafés están representados por colores dependiendo del país y continente del que proceden los cafés más conocidos. En colores anaranjados se encuentran los del continente africano, en gama de colores verdosos los países del continente suramericano y en color lila los del continente asiático.

En primer lugar, se encuentra el café de Kenya del tostadero Bon Mercat y el café Kenya de la marca Senseo. Como se puede ver en el diagrama, con un círculo de color naranja, ambos presentan resultados variables, aun tratándose del mismo país de procedencia.

A continuación, se observan los diferentes tipos de café analizados en el laboratorio según el país de origen de Brasil. Estos valores están indicados gráficamente por un eclipse de color verde oscuro. Estas muestras son: el café Brasil de tostadero Bon Mercat, el café Brasil de la marca Senseo y el café Brasil de la marca Saimaza. El tanto por ciento de cafeína presente en estos cafés presentan similitud, ya que los valores hallados son de 0,90%, 1,05% y 0,88%.

Finalmente, hay otros 4 tipos de cafés diferentes que coinciden en el país de procedencia. Se trata del café de Colombia que está indicado en la representación gráfica rodeado por un símbolo elíptico de color verde. Entre ellos tenemos muestras de café de Colombia del tostadero Bon mercat, Carrefour Colombia, Bonka Colombia y Saimaza Colombia. Como puede verse, los valores son bastante equivalentes, a excepción del café del tostadero que se diferencia mucho de los otros tres tipos. Los cafés de marca comercial, se encuentran entre un rango de valores comprendido entre 0,82% y 1,58%.

## 6.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS

Se empezó a ensayar con las soluciones patrón realizadas nuevamente y las soluciones de cafeína de café obtenidas mediante extracción (ver capítulo 5) para inyectar como muestras.

La detección se hace a 273 nm, ya que la cafeína presenta, a esa longitud de onda, un máximo de absorción.

Las soluciones patrón de cafeína con concentraciones: 4,00 ppm, 8,00 ppm, 16,00 ppm, 24,00 ppm y 32,00 ppm se registraron los correspondientes espectrofotogramas.

### 6.2.1. Determinación de la cafeína por Espectrofotometría UV

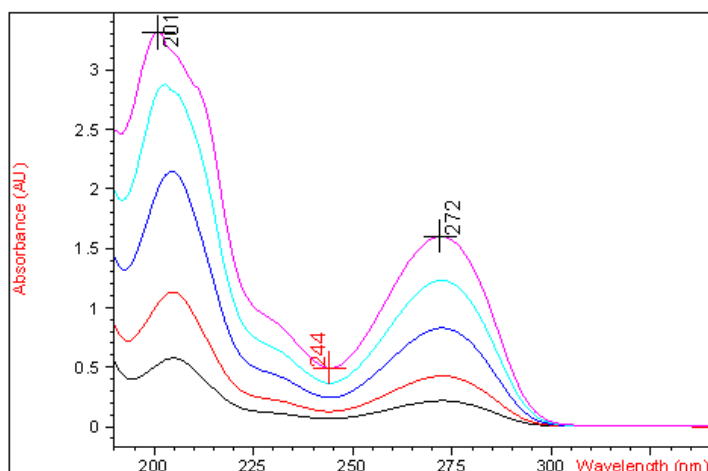
#### Determinación de la curva de calibrado

En esta tabla se muestran los resultados obtenidos de las absorbancias de las soluciones patrón.

**Tabla 11.** Concentraciones patrón de cafeína y absorbancias

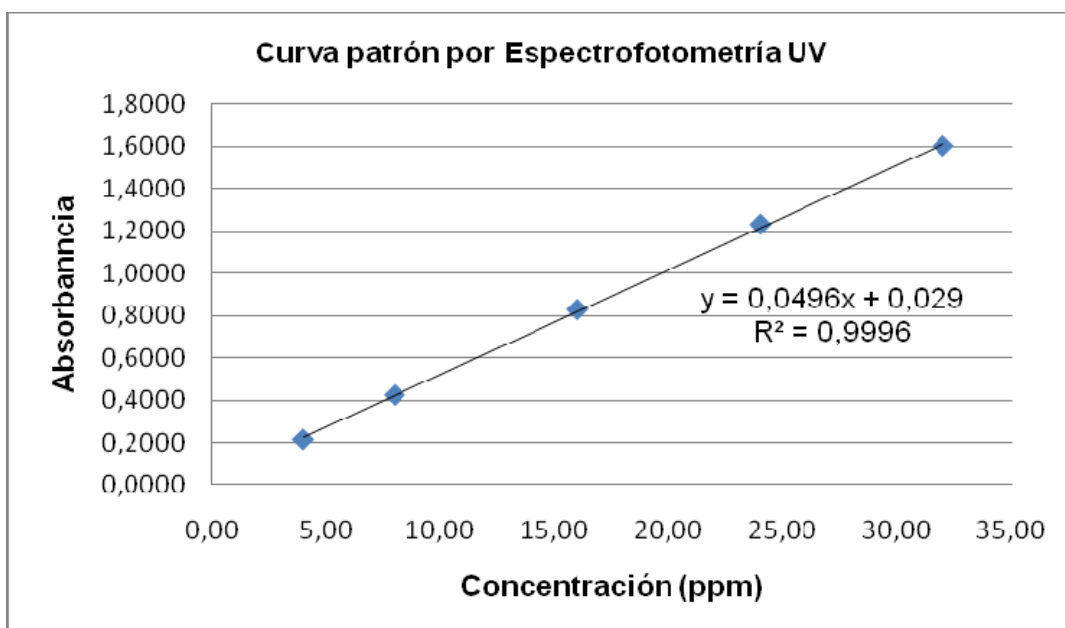
CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA (mg/ml)	ABS (273 nm)	ERROR (%)
4,00	0,2179	0,3004
8,00	0,4267	0,3003
16,00	0,8298	0,3000
24,00	1,2315	0,3004
32,00	1,6018	0,3002

En la siguiente figura se representaron gráficamente las absorbancias obtenidas con las soluciones patrón frente a sus correspondientes longitudes de onda (nm).



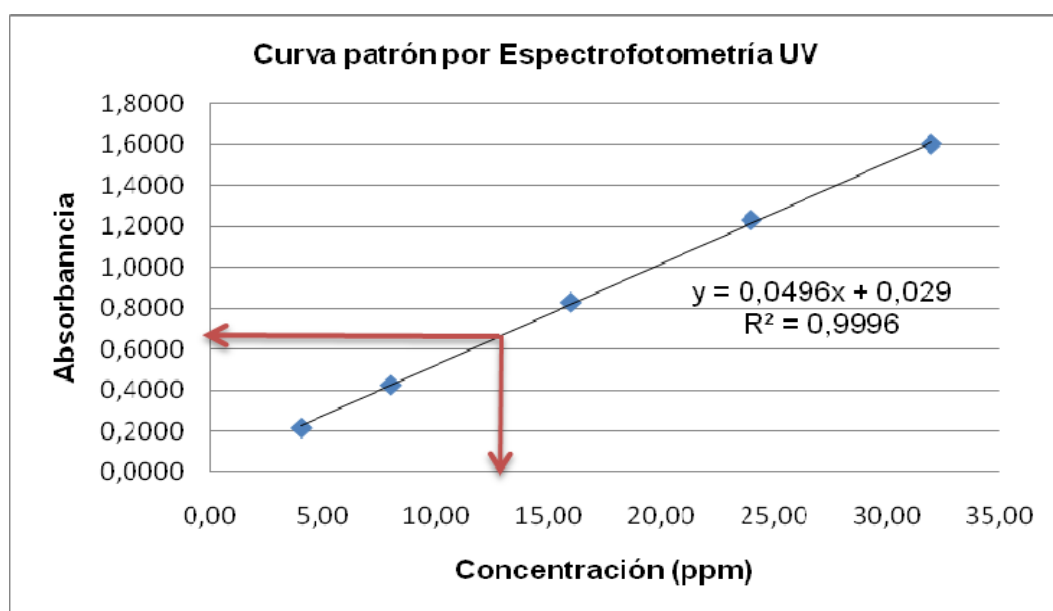
**Figura 77.** Espectro de las muestras patrón

En la siguiente figura se representaron gráficamente las absorbancias obtenidas con las soluciones patrón frente a sus correspondientes concentraciones (ppm).



**Figura 78.** Curva de calibrado obtenida con espectrofotómetro UV-Vis

Se interpoló la absorbancia correspondiente a una muestra de cafeína de café en la curva estándar y se obtuvo la concentración de la muestra (ver recorrido de las flechas rojas).



**Figura 79.** Interpolación de una muestra de café en la curva de calibrado



Para realizar estos cálculos se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

$$y = 0,0496 \cdot x + 0,029 \quad (30)$$

$$R^2 = 0,9996$$

Así que teniendo en cuenta que la ecuación obtenida en la curva de calibrado es:

$$Y = m \cdot x + b \quad (31)$$

Donde:

**Y:** Absorbancia

**m:** Pendiente de la curva de calibrado

**x:** Concentración de cafeína de las muestras (ppm)

**b:** Ordenada en el origen de la curva de calibrado

Así que teniendo en cuenta que la ecuación obtenida en la curva de calibrado es:

A partir de las absorbancias de los espectros obtenidos y con la ecuación de la curva de calibrado se obtiene la cantidad de cafeína contenida en las muestras de café. Para la preparación de todas las muestras de cafeína de café obtenidas mediante extracción (ver Capítulo 5).

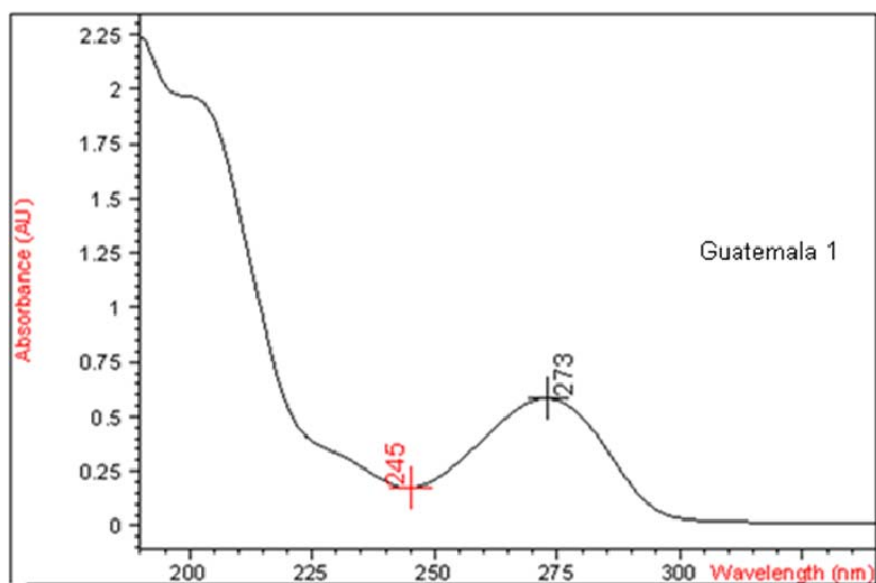
## Cálculos

En los cálculos para cuantificar la cantidad de cafeína en cada café, se utilizaron todos los valores de absorbancias resultantes de las diversas muestras de cafeína de café, a excepción de los valores de absorbancias que despreciamos, ya que pensamos que pudieron haberse producido pérdidas en el proceso de extracción.

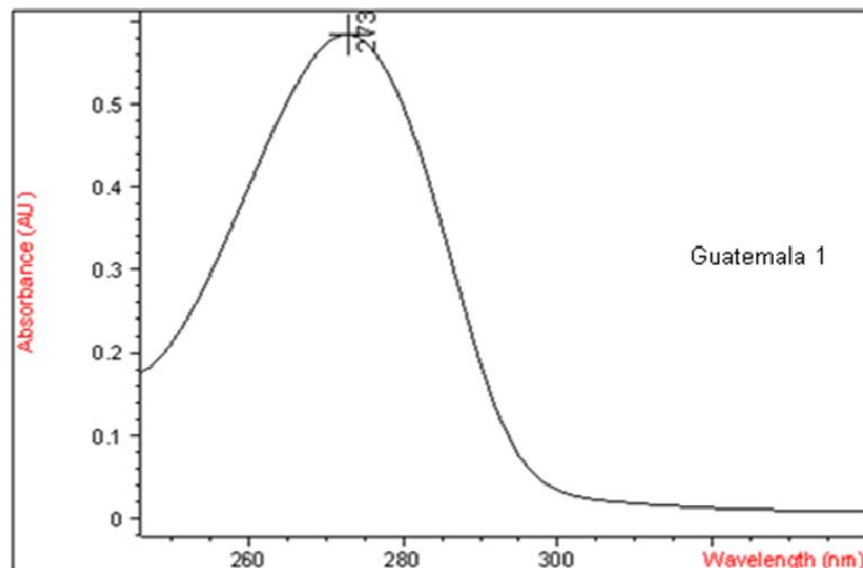
En el Anexo 1, se pueden ver los resultados obtenidos en cada una de las extracciones de los diferentes cafés, así como los resultados tabulados.

Las muestras extraídas de café se analizan en el espectro y se determina la absorbancia de cada una de ellas.

Seguidamente se representan los espectros del café Guatemala del tostadero Bon Mercat como ejemplo de cálculo de la concentración de cafeína.

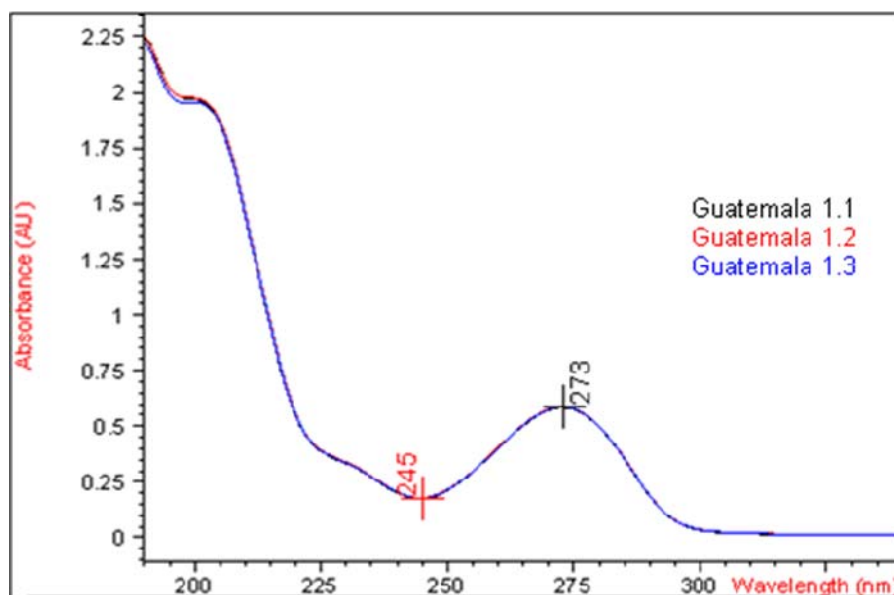


**Figura 80.** Espectro del café de Guatemala de la primera extracción con ajuste espectral de 190 a 340 nm

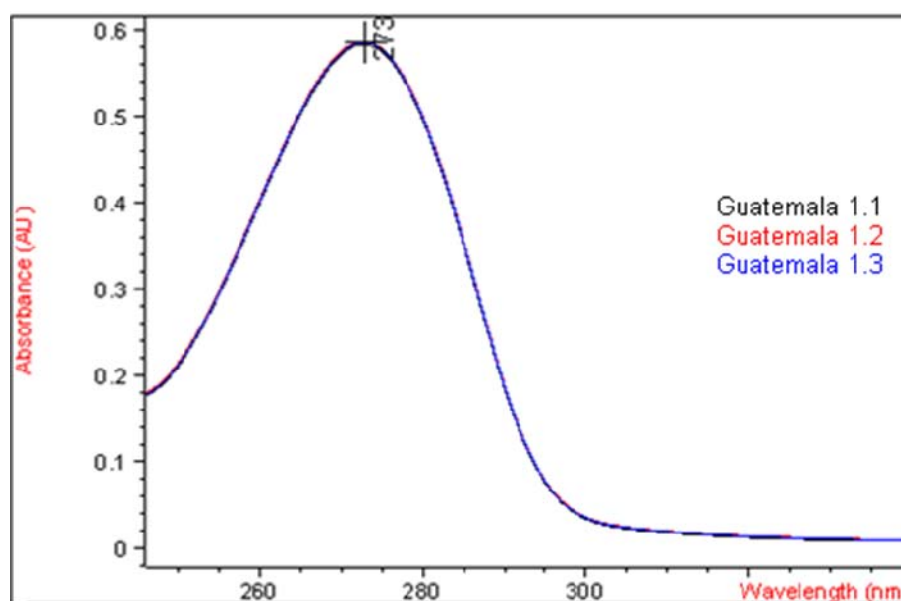


**Figura 81.** Espectro del café de Guatemala de la primera extracción con ajuste espectral reducido de 245 a 340 nm

Una vez se ha identificado el café de Guatemala de la primera extracción individualmente, se lee la absorbancia de esta por triplicado.

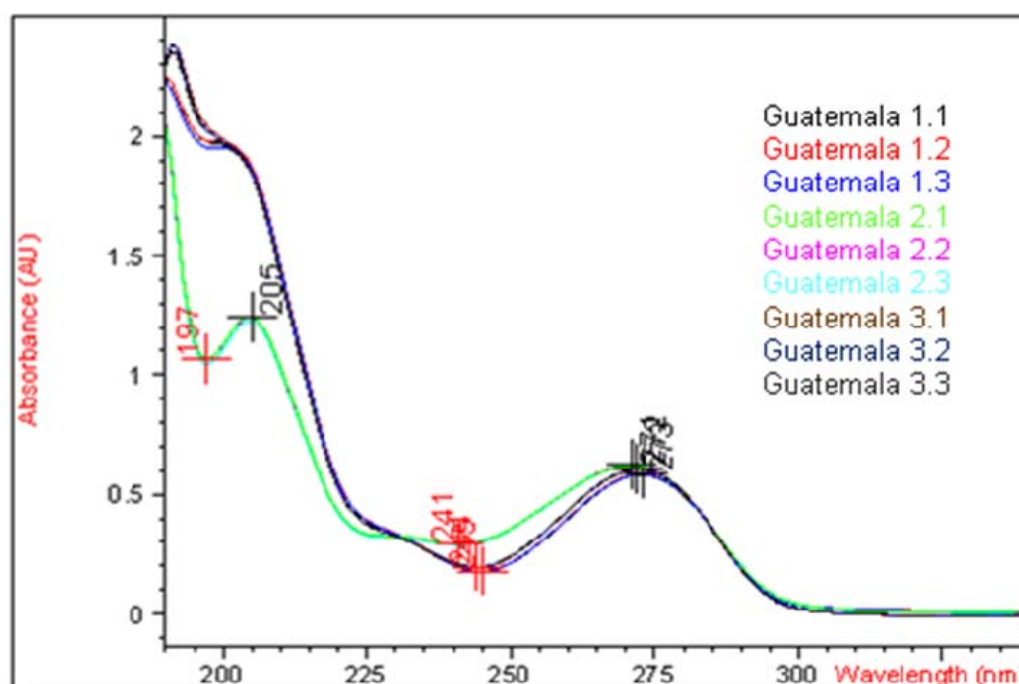


**Figura 82.** Espectro del café de Guatemala de la primera extracción por triplicado con ajuste espectral de 190 a 340 nm

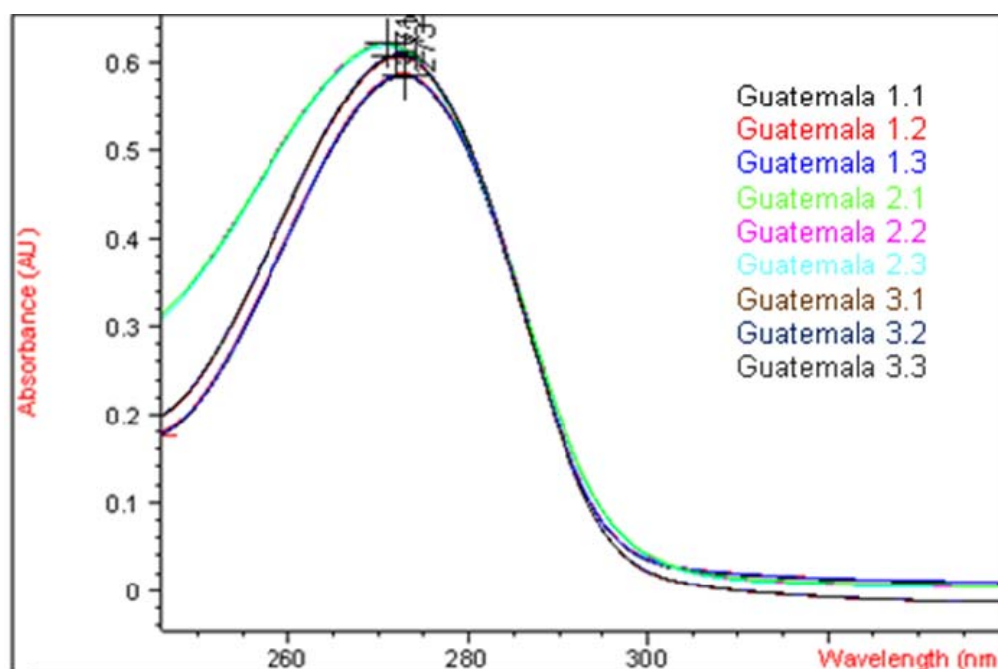


**Figura 83.** Espectro del café de Guatemala de la primera extracción por triplicado con ajuste espectral reducido de 245 a 340 nm

A continuación, se representan conjuntamente los espectros de las tres extracciones de cafeína realizadas al café de Guatemala de los tostaderos Bon Mercat.



**Figura 84.** Espectro del café de Guatemala de todas las extracciones con ajuste espectral de 190 a 340 nm



**Figura 85.** Espectro del café de Guatemala de todas las extracciones con ajuste espectral reducido de 245 a 340 nm

En la siguiente tabla se representan las absorbancias de los espectrofotogramas obtenidos de las muestras de cafeína del café Guatemala y la longitud de onda.

**Tabla 12.** Muestras de cafeína de café, pico y absorbancias

<b>Café Guatemala natural. Tostadero Bon Mercat</b>				
<b>Espectrofotometría UV-Vis (246nm-340nm)</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Valoración</b>	<b>Pico (nm)</b>	<b>Abs(AU)</b>	<b>Abs media (AU)</b>
Guatemala 1	1	273,0	0,5840	0,5860
	2	273,0	0,5876	
	3	273,0	0,5862	
Guatemala 2	1	271,0	0,6189	0,6210
	2	271,0	0,6224	
	3	271,0	0,6216	
Guatemala 3	1	272,0	0,6059	0,6078
	2	272,0	0,6094	
	3	272,0	0,6082	

La concentración del café Guatemala natural de tostadero se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones.

- Absorbancia media café Guatemala (AU) = **0,6049**

Para realizar el cálculo de concentración de cafeína se necesita la regresión lineal de la curva de calibrado que fue:

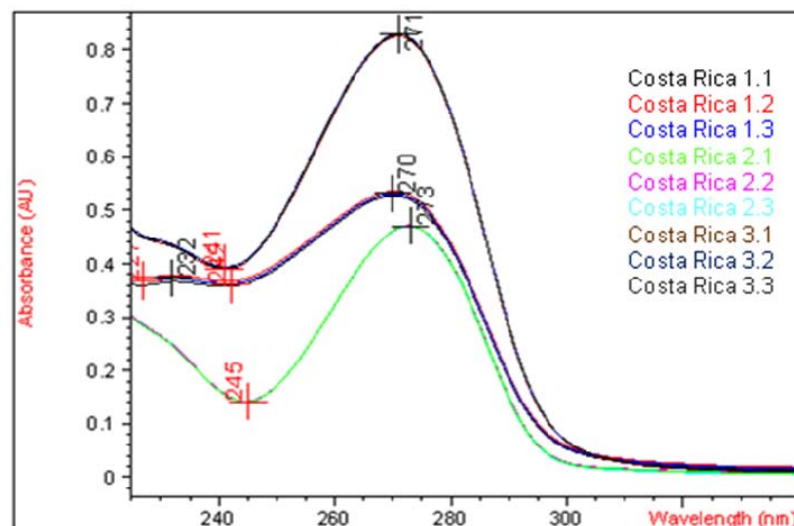
$$Y = 0,0496 \cdot x + 0,029 \quad (32)$$

Se sustituye la Y por la media de las absorbancias obtenidas y se despeja la x:

$$x = (0,6049 - 0,029) / 0,0496 \quad (33)$$

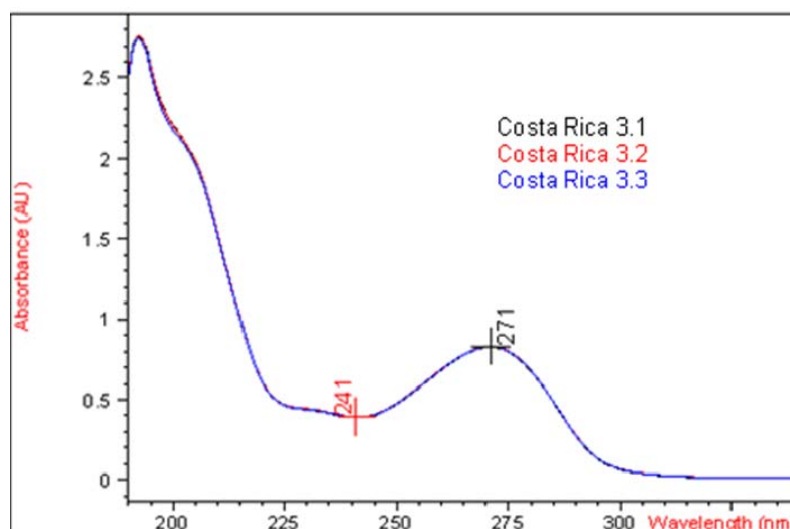
- Concentración de cafeína en espectrofotometría UV-VIS = **11,6110 ppm**

Como se ha comentado anteriormente, se utilizan las muestras de cafeína de café que proporcionen resultados equivalentes y se desprecian las muestras de cafeína de café en las que se pensó que pudieron haberse producido pérdidas en el proceso de extracción. Un ejemplo es el café Costa Rica de tostaderos Bon Mercat, en el que puede observarse la diferencia entre los espectros de las diferentes extracciones.



**Figura 86.** Espectro del café de Costa Rica de todas las extracciones con ajuste espectral de 190 a 340 nm

La tercera extracción es la que presenta mejores resultados. La primera y segunda extracción, se desprecian, ya que los resultados obtenidos son misérrimos y proporcionarían un resultado final erróneo (ver Anexo 1).



**Figura 87.** Espectro del café de Costa Rica de la tercera extracción por triplicado con ajuste espectral reducido de 245 a 340 nm

## **Cálculos para la determinación del tanto por ciento de cafeína en los diferentes cafés analizados.**

Seguidamente, una vez determinadas las absorbancias de cada una de las muestras, se determina la concentración de cafeína que poseen.

En los cálculos iniciales se supuso que los cafés contenían un 1,2 % de cafeína y se trabajó pesando 300 mg de café.

Se procedió a determinar la cantidad de cafeína hallada mediante la absorbancia de la espectrofotometría UV.

Datos:

Peso de café real = 300 mg

Solución A = mg cafeína extraída / 100 ml agua Milli-Q

Solución B = 10 ml solución A / 25 ml agua Milli-Q

En estos factores de conversión se pueden apreciar los cálculos de uno de los cafés anteriormente descritos.

Café Guatemala natural de tostadero Bon Mercat:

$$100 \text{ ml sol A} \cdot \frac{25 \text{ ml sol B}}{10 \text{ ml sol A}} \cdot \frac{11,61 \text{ mg cafeína en café}}{1000 \text{ ml sol B}} = 2,90 \text{ mg cafeína en café}$$

$$\frac{2,90 \text{ mg cafeína en café}}{300 \text{ mg de café}} \cdot 100 = 0,97\%$$

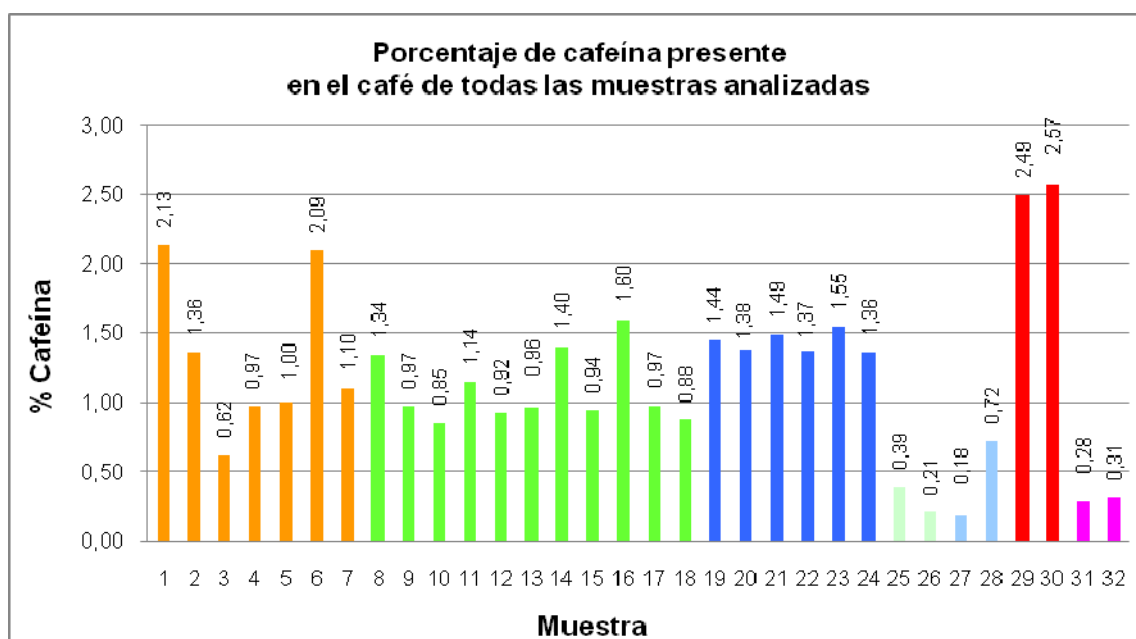
Por lo tanto, se estaría hablando de que el café Guatemala natural de tostadero Bon Mercat posee una concentración real de **0,97% de cafeína**.

Los cálculos de los demás cafés se pueden ver en el Anexo 1.

## Discusión de resultados

Se representa en tanto por ciento la concentración de cafeína de los diferentes cafés y se observa la variación entre cada uno de ellos.

En los siguientes diagramas, se muestran las diferencias de concentraciones de las 32 muestras analizadas, en función de los cafés de diferente origen adquiridos en el tostadero Bon Mercat (muestras de la 1 a la 7) y según los diferentes tipos de café de marcas comerciales: naturales (muestras de la 8ª a la 18), mezcla (muestras de la 19 a la 24), naturales descafeinados (muestras 25 y la 26), mezclas descafeinados (muestras 27 y 28), solubles naturales (muestras 29 y 30) y solubles descafeinados (muestras 31 y 32) .



**Figura 88.** Representación de la concentración de cafeína de todas las muestras analizadas

Como se puede observar hay una gran similitud de concentración de cafeína entre cada uno de los diferentes tipos de café. Los cafés solubles son los que muestran una mayor concentración de cafeína.

Todos los cafés, los cálculos de los porcentajes y las gráficas resultantes se pueden encontrar tabulados y representados en el Anexo 1.

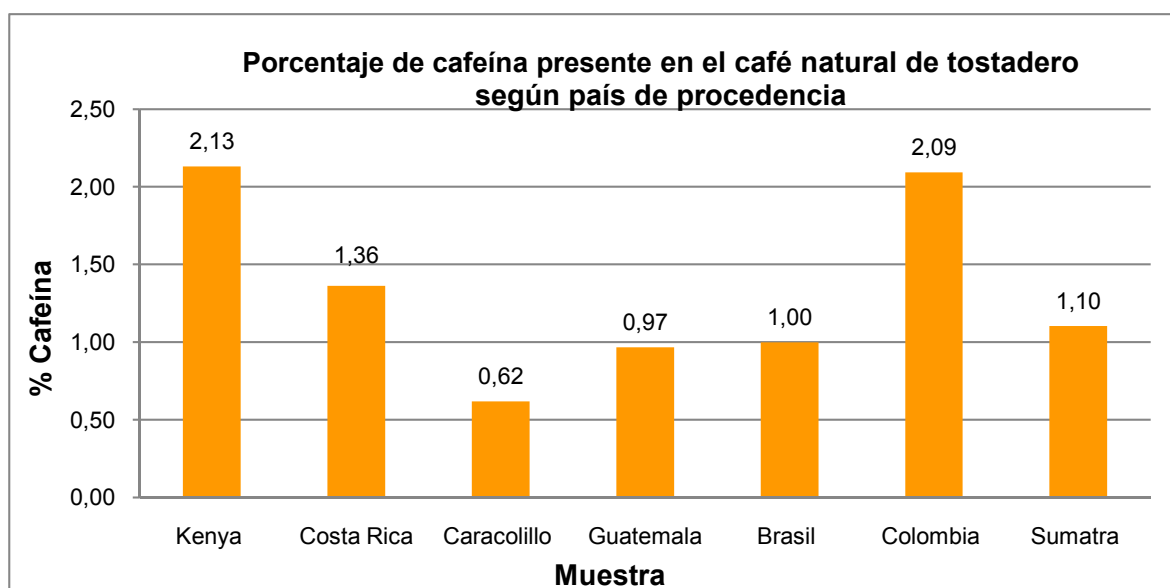
En los siguientes diagramas, se muestra la diferencia de concentraciones en función de los cafés de diferente origen adquiridos en el tostadero Bon Mercat y según los diferentes tipos de café de marcas comerciales.



### Según cafés de tostadero:

Estos cafés están elaborados al natural, ya que son cafés de tostadero, en los que se pretende rescatar el café de antaño y degustar cafés excelentes de diferente denominación de origen. Se pueden conseguir cafés de diferentes países ya que existen tostaderos pequeños que importan café directamente de los países de producción. Así los tostaderos pueden importar cantidades pequeñas de café, de una calidad bastante buena, que han sido especialmente seleccionados.

En el siguiente diagrama se representan 7 muestras de cafés diferentes, se encuentran cafés de Kenya, Costa Rica, Caracolillo (Nicaragua), Guatemala, Brasil, Colombia y Sumatra. Los siete cafés utilizados para el análisis pertenecen a la variedad arábica.



**Figura 89.** Representación de la concentración de cafeína según país de origen

Se observa que el café de Kenya es el que más concentración de cafeína contiene con 2,13%, seguido del café de Colombia que posee un 2,09%. A diferencia de los demás, el café de Caracolillo, que es muy apreciado por su paladar maduro y afrutado, es el que contiene menor cantidad de cafeína.

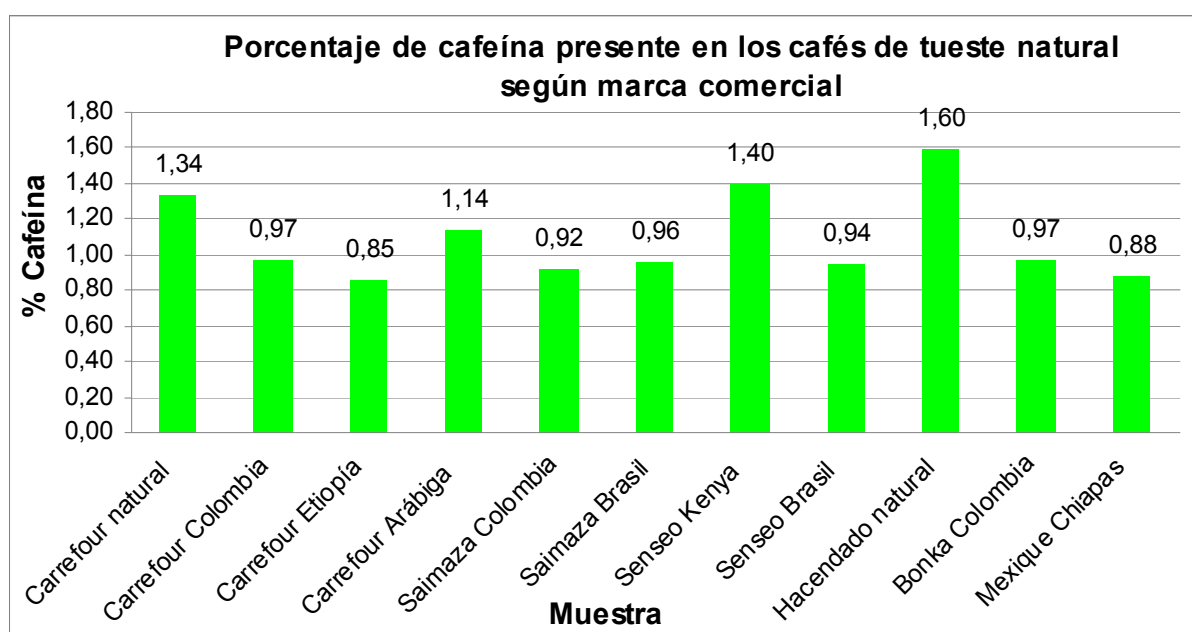
El café natural crudo o tostado tiene un contenido en cafeína que sería normal entre 0,8% y 2,4%, según tipo y variedad. Los datos bibliográficos encontrados, informan que la variedad de café arábica contiene poca cafeína, comprendida entre 0,7 y 1,5%. Por lo tanto, todas las concentraciones de cafeína obtenidas en nuestros ensayos están dentro del rango definido, ya que los resultados oscilan entre 2,13% y 0,62%. Teniendo en cuenta las definiciones encontradas en la bibliografía sobre los cafés de variedad arábica, y sabiendo que los siete tipos de café son 100 % arábicas, se encuentran discrepancias en los resultados, no siendo aceptables el café de Kenya y el café de Colombia, ya que sobrepasan el rango definido de concentración de cafeína.

### Según el tipo de café de marcas comerciales:

Las muestras de café de marcas comerciales que se han analizado en el laboratorio, se han clasificado en 6 tipos diferentes. Entre ellos se encuentra los cafés de tueste natural, los cafés de mezcla, los cafés descafeinados 100 % naturales, los cafés descafeinados de mezcla, los cafés solubles 100 % naturales y los cafés solubles 100 % naturales descafeinados.

Primero, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos realizados con los cafés naturales de diferentes marcas comerciales. Las marcas utilizadas son: Carrefour natural, Carrefour Colombia, Carrefour Etiopía, Carrefour Arábica, Saimaza Colombia, Saimaza Brasil, Senseo Kenya, Senseo Brasil, Hacendado natural, Bonka Colombia y Mexique Chiapas.

El siguiente diagrama muestra el tanto por ciento de concentración de cafeína presente en cada una de las muestras de café natural.



**Figura 90.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés naturales de marcas comerciales.

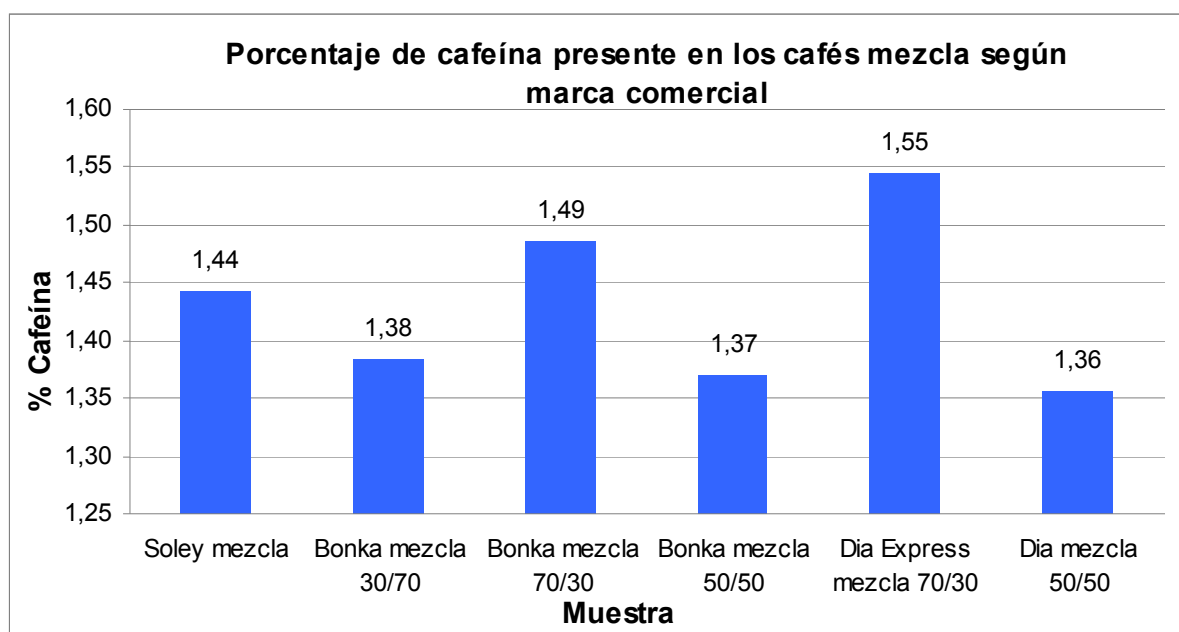
Estos resultados presentan variaciones aún siendo los mismos tipos de café. Puede observarse, que la concentración de cafeína en el café Hacendado natural es mayor que en las demás marcas de café, mientras que el café de Carrefour Etiopía presenta menos cantidad de cafeína que todos los demás.

Algunos de estos cafés tienen países de origen diferentes, por lo que los niveles de cafeína hallados pueden variar según el lugar de procedencia. También, en ausencia de más información sobre sus características, es posible que algunos de estos cafés comerciales sean mezclas de variedad robusta y arábica, por lo que el primero podría incrementar su concentración debido a que posee mayor cantidad.

Atendiendo a la definición anterior sobre la proporción de cafeína en el café natural crudo o tostado, se pueden aceptar los resultados como válidos, ya que todos oscilan en el intervalo descrito.

En segundo lugar, se exponen los valores de tanto por ciento de cafeína presente en los cafés mezcla de diversas marcas comerciales existentes en el mercado. Los cafés con mezcla natural y torrefacto se consumen habitualmente, puesto que la utilización exclusiva de café natural produce una infusión poco densa y con un color claro, y al mezclarlo con café torrefacto se obtiene más cuerpo y color.

Entre ellos tenemos muestras de Soley mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto), Bonka mezcla Especial (30 % natural y 70 % torrefacto), Bonka mezcla (70 % natural y 30 % torrefacto), Bonka mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto), Dia Express mezcla (70 % natural y 30 % torrefacto) y Dia mezcla (50 % natural y 50 % torrefacto).



**Figura 91.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés mezcla de marcas comerciales.

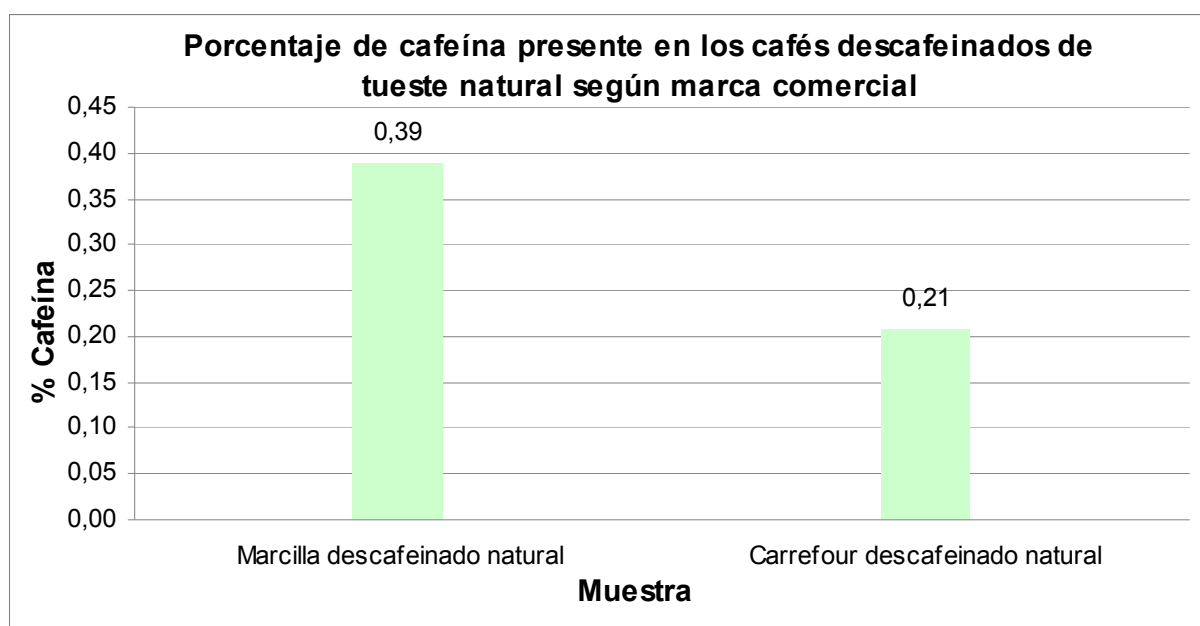
Puede observarse que la cantidad de cafeína existente en las mezclas de café es bastante variable. Los cafés que contienen 70% natural y 30% torrefacto, muestran un nivel de cafeína superior a las demás mezclas analizadas. Los cafés con mezcla 50% natural y 50% torrefacto presentan valores equitativos en cuanto a la proporción de cafeína, ya que sus concentraciones oscilan entre 1,44-1,36%. El café Bonka de mezcla 30% natural/70% torrefacto, contiene 1,38% que se encuentra entre el rango de valores hallados en los cafés de mezcla 50/50.

Observando las diferencias halladas en cuanto a la concentración de cafeína en las diferentes mezclas, podría decirse que en función del método de tueste, el nivel de cafeína presente oscila, decreciendo a medida que se aumenta la proporción de café torrefacto. Pero, para poder corroborar esta hipótesis se deberían analizar más muestras de café mezcla 70/30, por lo que sería arriesgado validar esta suposición.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los análisis efectuados con los cafés descafeinados de tueste natural de diferentes marcas comerciales existentes en el mercado.

El objetivo de la descafeinación es producir un café que retenga su aroma y sabor a pesar de los procesos que son necesarios para eliminar la cafeína. Como la mayoría de los componentes que dan el sabor al café se desarrollan durante el tostado, el café es normalmente descafeinado en grano verde, antes del tostado. La legislación europea y española, permiten etiquetar el producto como descafeinado si el máximo de cafeína contenida no supera el 0,12% en el café tostado de grano o molido.

Las marcas utilizadas son: Marcilla descafeinado 100% natural y Carrefour descafeinado 100% natural.



**Figura 92.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés mezcla de marcas comerciales.

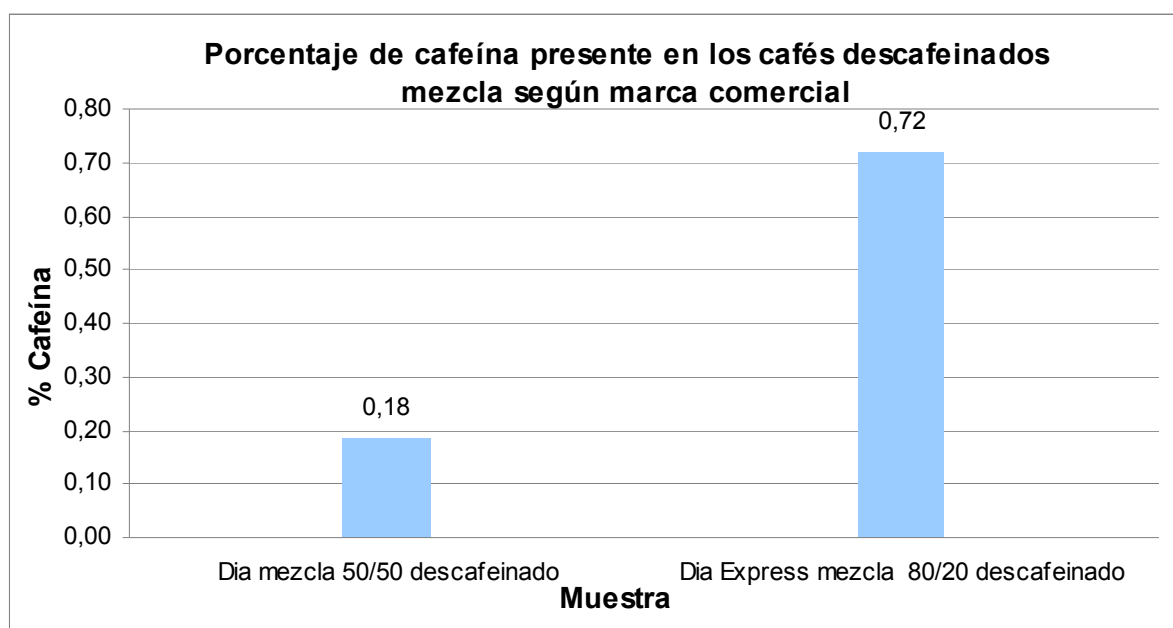
En la representación gráfica, se puede apreciar como la cantidad de cafeína presente en estos tipos de café es insignificante. La proporción de cafeína presente en las muestras analizadas en el laboratorio, presentan desigualdad ya que los valores hallados son de 0,39% y 0,21%. Esta disconformidad puede ser consecuencia del método de extracción, ya que durante su separación el procedimiento debe ser muy riguroso debido a que el contenido del principio activo en estos cafés es paupérrimo.

También, pude apreciarse como la proporción encontrada en la espectrofotometría UV-Vis no se asemeja al porcentaje máximo de cafeína estimado por la legislación en estos tipos de cafés. Ambas marcas comerciales superan el límite permitido.

Seguidamente, se exponen los valores de tanto por ciento de cafeína presente en los cafés descafeinados mezcla, de diferentes marcas comerciales presentes en el mercado.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo de la elaboración de café descafeinado es mantener su aroma y sabor excluyendo el principio activo. La extracción se aplica sobre el café verde, pudiendo seleccionar las proporciones necesarias para su tostado natural y torrefacto, y elaborar la mezcla deseada.

Para poder estudiar los niveles de cafeína presentes en los cafés descafeinados de mezcla se han utilizado dos cafés diferentes como son: Dia descafeinado mezcla (50% natural y 50% torrefacto) y Dia Express descafeinado mezcla (80% natural y 20% torrefacto).



**Figura 93.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés descafeinados mezcla de marcas comerciales.

Puede observarse que la proporción de cafeína existente en las mezclas de café descafeinado es discordante y que el nivel de cafeína hallado es muy pequeño. Atendiendo a lo comentado anteriormente sobre los cafés descafeinados, la cantidad de cafeína extraída en las muestras analizadas, presentan desigualdad con valores de 0,18% y 0,72%, ya que el procedimiento de separación ha de ser minucioso.

Rescatando la discusión expuesta en los cafés mezcla y observando la representación de los cafés descafeinados mezcla, se puede ver como la concentración de cafeína aumenta a medida que se disminuye la proporción de café torrefacto. Pero, es atrevido aceptar esta hipótesis ya que solo se disponen de dos muestras en el análisis.

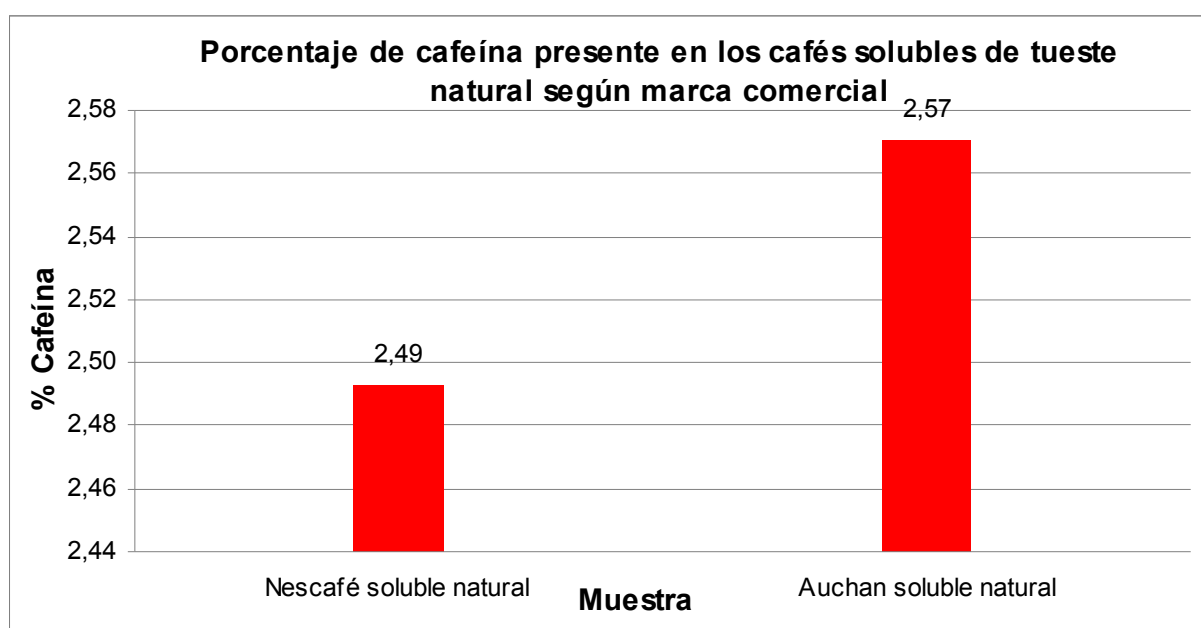
Finalmente, evaluando los resultados de estas dos marcas comerciales, pude apreciarse como la proporción examinada en la espectrofotometría UV-Vis es discrepante con el porcentaje máximo de cafeína declarado por la legislación.

Después, se presentan los resultados adquiridos en los análisis efectuados con los cafés solubles de tueste natural de diferentes marcas comerciales existentes en el mercado.

El café instantáneo y soluble es café seco en polvo o granulado, que se puede disolver rápidamente en agua caliente para ser consumido. En este caso el café tostado se muele para permitir la extracción de los sólidos solubles con agua a altas temperaturas y presión.

El café soluble tiene hoy su mercado y, aunque la calidad es inferior al grano o molido, posee algunas ventajas como son la facilidad de preparación, que no necesita cafetera, diversidad de usos en repostería, etc. Este tipo de café contiene cafeína siempre en una cantidad superior al 2,5%.

En el siguiente diagrama se representan 2 muestras de cafés diferentes, se encuentran Nescafé y Auchan soluble natural.



**Figura 94.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés solubles naturales de marcas comerciales.

Estos resultados presentan similitud ya que los valores son bastante aproximados. Se aprecia, que la concentración de cafeína en el café soluble natural Auchan es ligeramente mayor que el café soluble de la marca Nescafé.

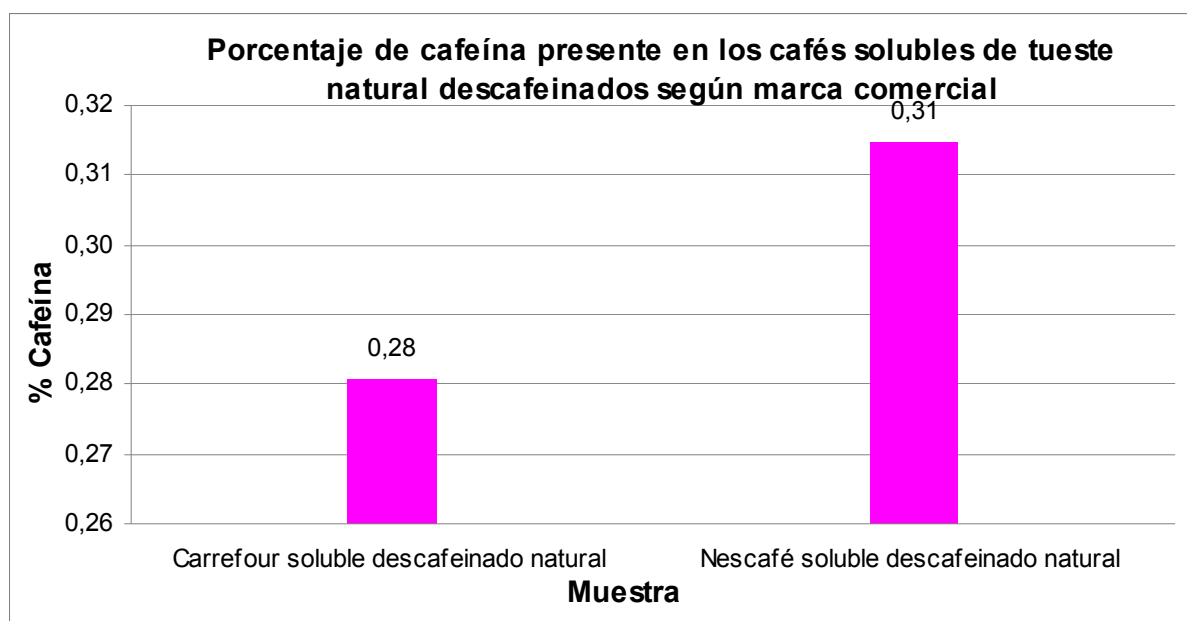
Es posible que algunos de estos cafés comerciales sean mezclas de variedad robusta y arábica, por lo que este primero podría incrementar su concentración debido a que posee mayor cantidad. Según datos bibliográficos, la variedad robusta es usada por la industria alimentaria en la elaboración de café soluble.

En consecuencia, el resultado es aceptable, ya que los cafés robusta contienen una cantidad de cafeína comprendida entre 2% y 3,5%. Las muestras de café, contienen 2,49% y 2,57%, que se encuentra en el rango estimado.

Seguidamente, se exponen los valores de tanto por ciento de cafeína presente en los cafés descafeinados solubles, de diferentes marcas comerciales presentes en el mercado.

Actualmente, los métodos de producción del café soluble descafeinado permiten conservar el aroma y el sabor con una disminución considerable del principio activo estimulante, lo que ha hecho que el café soluble descafeinado se implante en muchos países del mundo.

Según la normativa española, los cafés descafeinados solubles no pueden contener más un 0,3 por ciento.

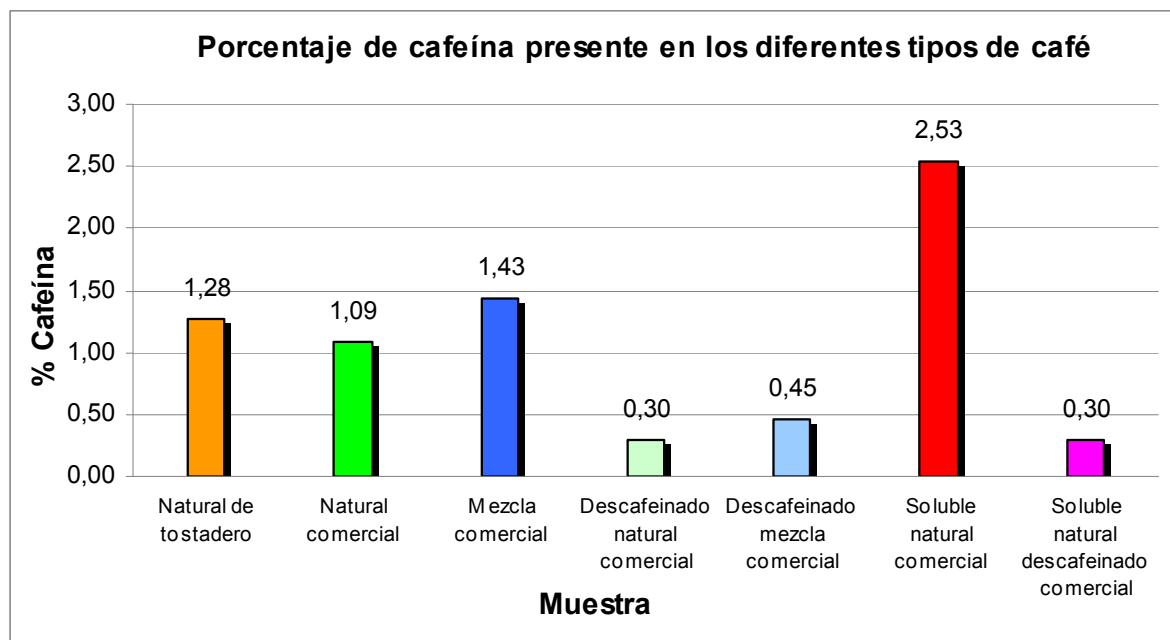


**Figura 95.** Representación de la concentración de cafeína de los cafés solubles descafeinados naturales de marcas comerciales.

En la representación gráfica, se puede apreciar como la cantidad de cafeína hallada en estos tipos de café es inapreciable. El tanto por ciento de cafeína presente en las muestras analizadas en el laboratorio, presentan similitud ya que los valores hallados son de 0,28% y 0,31%. Esta semejanza puede ser consecuencia de la solubilidad del café en polvo o granulado en el proceso de extracción, ya que beneficia la separación de la escasa cafeína existente en esos tipos de café.

También, pude apreciarse como la proporción encontrada en la espectrofotometría UV-Vis se asemeja al porcentaje máximo de cafeína estimado por la legislación en estos tipos de cafés. La marca comercial Nescafé, supera el máximo permitido, pero la desviación es muy leve.

A continuación, se representan los porcentajes de cafeína presentes en los diferentes tipos de cafés analizados en el laboratorio, con la idea de elaborar una comparación sobre la proporción de este principio activo.



**Figura 96.** Representación de la concentración de cafeína de los diferentes tipos de café

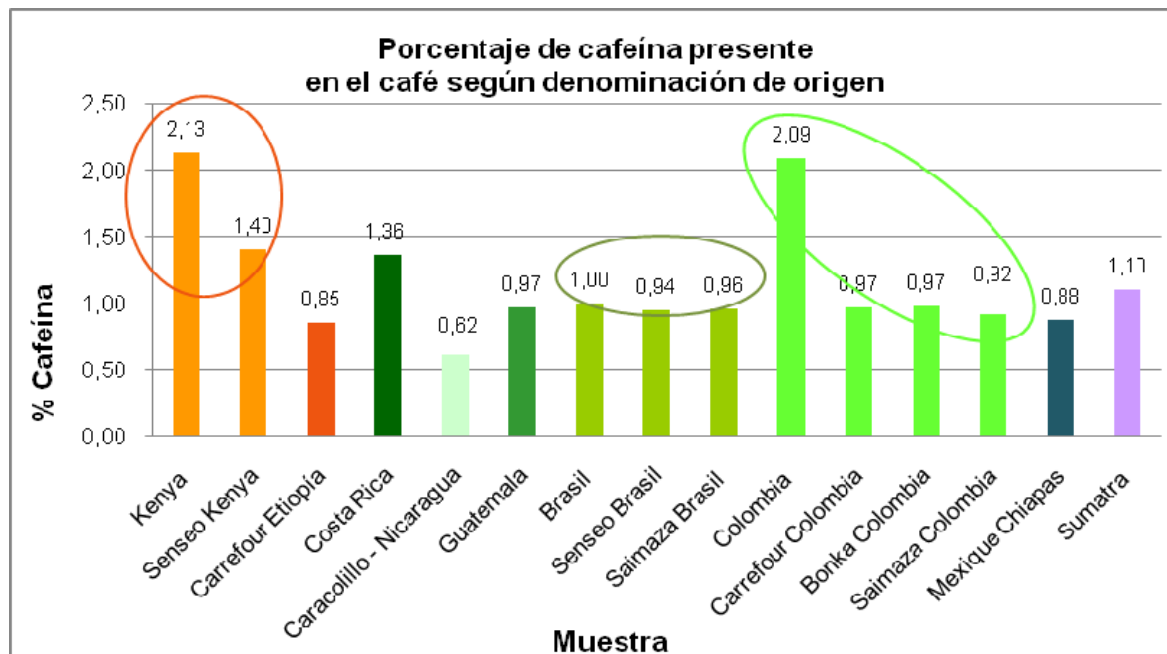
Mediante esta representación gráfica puede observarse como los cafés solubles naturales contienen una proporción de cafeína superior a los demás tipos de café, ya que como se ha comentado anteriormente, son elaborados con los granos de café de variedad robusta.

En último lugar, tenemos los cafés descafeinados naturales y solubles naturales, con una proporción de cafeína de 0,30 %.



### Según su país de origen:

Observando los valores hallados en los cafés de marca comercial, en los que resalta su marketing del país de origen, y los resultados experimentales obtenidos en los cafés de tostadero, se puede determinar una comparativa en cuanto a la concentración de cafeína en cada uno de ellos.



**Figura 97.** Representación de la concentración de cafeína según país y continente de origen con cafés de tostadero y comerciales

Los cafés están representados por colores dependiendo del país y continente del que proceden los cafés más conocidos. En colores anaranjados se encuentran los del continente africano, en gama de colores verdosos los países del continente suramericano y en color lila los del continente asiático.

En primer lugar, se encuentra el café de Kenya del tostadero Bon Mercat y el café Kenya de la marca Senseo. Como se puede ver en el diagrama, con un círculo de color verde, ambos presentan resultados variables, aun tratándose del mismo país de procedencia.

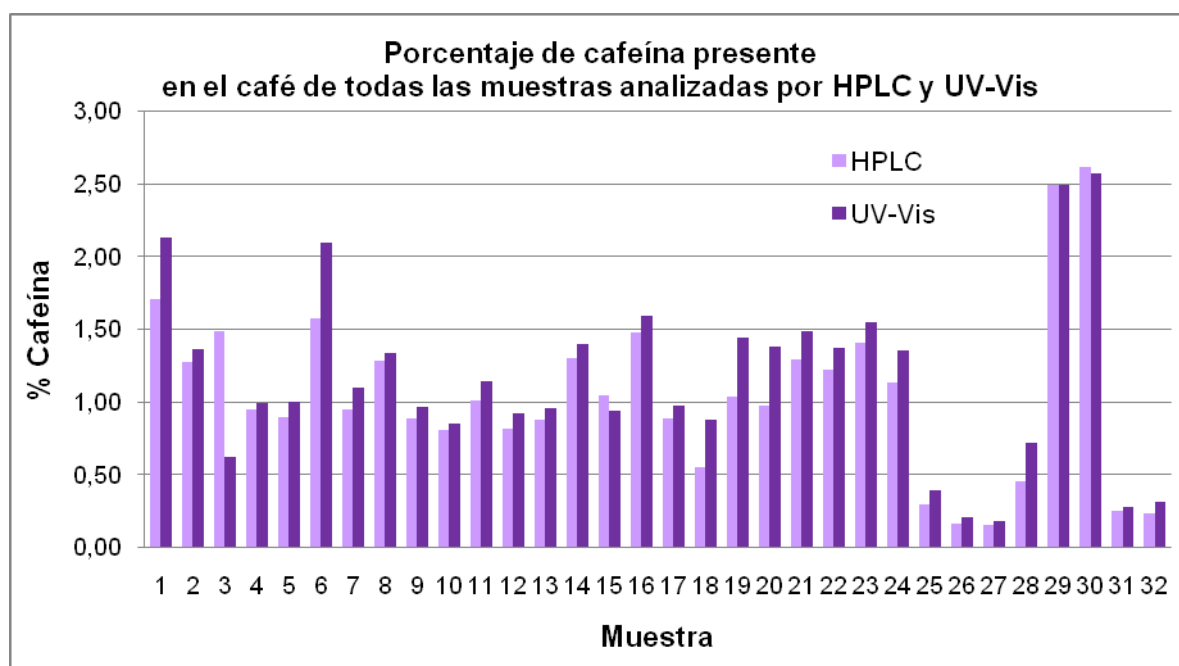
A continuación, se observan los diferentes tipos de café analizados en el laboratorio con país de origen Brasil. Estos valores están indicados gráficamente por un eclipse de color rojo. Estas muestras son: el café Brasil de tostadero Bon Mercat, el café Brasil de la marca Senseo y el café Brasil de la marca Saimaza. El tanto por ciento de cafeína presente en estos cafés presentan similitud, ya que los valores hallados son de 1,00%, 0,94% y 0,96%.

Finalmente, hay otros 4 tipos de cafés diferentes que coinciden en el país de procedencia. Se trata del café de Colombia que está indicado en la representación gráfica rodeado por un símbolo circular de color azul. Entre ellos tenemos muestras de café de Colombia del tostadero Bon mercat, Carrefour Colombia, Bonka Colombia y Saimaza Colombia. Como puede verse, los valores son bastante equivalentes, a excepción del café del tostadero que se diferencia mucho de los otros tres tipos. Los cafés de marca comercial, se encuentran entre un rango de valores comprendido entre 0,97%-0,92%.

## Comparación de los resultados por HPLC y Espectrofotometría UV

Para cuantificar el contenido de cafeína presente en las soluciones obtenidas por la extracción de las muestras de los diferentes tipos de café se han utilizado dos técnicas: HPLC y espectrofotometría UV.

Seguidamente, se representan los porcentajes de cafeína presentes en los diferentes tipos de cafés analizados en el laboratorio, con la idea de elaborar una comparación sobre la proporción de este principio activo.



**Figura 98.** Representación de la concentración de cafeína en todas las muestras analizadas por HPLC y Espectrofotometría UV

Como se observa en el diagrama de barras, las dos técnicas utilizadas para cuantificar la cafeína de los diversos cafés, presentan resultados bastante concordantes. En las muestras 1, 3, 6, 18, 19 y 20 se observa una ligera diferencia lo que puede ser debido a algún error experimental. Para ver las tablas con todos los resultados ver Anexo 1.



# **CAPÍTULO 7:**

## **CONCLUSIONES**

En este apartado de conclusiones del presente proyecto se pretende comprobar que se han conseguido los objetivos marcados al principio de éste. Además de cualquier otra información que se haya considerado interesante de mencionar.

Los objetivos marcados al principio del proyecto se han logrado de manera parcial. Es decir, hemos obtenido resultados favorables en las técnicas estudiadas para intentar establecer una comparación entre la cafeína y las diferentes características del café (variedad del café, el país de origen, procesado), pero todavía quedarían muchos ensayos que realizar y muestras que analizar.

Una de las mayores dificultades con la que nos encontramos en este proyecto, es la utilización de una metodología de extracción eficaz. Durante este proceso puede perderse una cantidad de cafeína considerable, por lo que durante su separación el procedimiento debe ser muy riguroso.

Este proyecto nos ha servido para darnos cuenta del enorme trabajo y la cantidad de horas que supone lograr las condiciones necesarias para la puesta a punto de un método. También nos ha permitido el aprendizaje de dos técnicas analíticas que desconocíamos.

Las soluciones se analizan por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y por espectrofotometría UV, hallándose de esta manera la concentración de cafeína presente en cada una de las muestras de café.

A continuación se expondrán una serie de conclusiones que en ningún caso son concluyentes.

Ambas técnicas utilizadas para la cuantificación de cafeína presente en los diferentes cafés analizados en el laboratorio, presentan una gran exactitud. Los resultados son bastante concordantes, excepto en algunos resultados en los que se haya podido producir algún error aleatorio. También se ha podido producir algún error sistemático que se podría haber producido debido a una mala técnica extractiva o un error en la inyectada, en los que se podría haber minimizado ese error haciendo más repeticiones de las muestras, aunque en nuestro caso, debido al gran número de muestras y el tiempo limitado, no se pudo realizar.

Como se ha podido comprobar, hay una gran similitud de concentración de cafeína presente en los diferentes tipos de cafés analizados en el laboratorio. En ambas técnicas estudiadas, se ha observado que el café soluble es el tipo de café que contiene mayor contenido de cafeína. Sin embargo, los cafés descafeinados naturales y solubles naturales contienen una proporción de cafeína inferior a los demás. Estos resultados hallados son bastante evidentes, ya que los cafés solubles están elaborados en la industria alimentaria con granos de café de variedad robusta, que contienen una cantidad de cafeína comprendida entre 2% y 3,5%. En el caso de los cafés descafeinados, presentan una insignificante cantidad de cafeína, ya que como su nombre indica, son cafés elaborados eliminando casi por completo el principio activo.

Los cafés de tostadero y comerciales, presentan resultados variables según el país y continente del que proceden. Los países africanos contienen cafés con un nivel de proporción de cafeína mayor que los demás, seguido de los cafés del continente suramericano. Finalmente, observamos como los cafés que proceden del continente asiático son los que contienen una proporción de cafeína inferior a los demás.

A continuación, hemos podido observar como los cafés mezcla (cafeinados y descafeinados) presentan una desigualdad significativa en función del método de tueste, ya que a medida que aumenta la proporción de café tostado al natural, aumenta también la concentración de cafeína.

Atendiendo la normativa española y europea, así como datos bibliográficos, encontramos que algunos de los resultados hallados mediante las diferentes técnicas utilizadas, no se encuentran en el intervalo estimado por la legislación en función del tipo de café. Principalmente, queremos destacar los cafés descafeinados, ya que en estos tipos de café hemos encontrado diferencias significativas. Los cafés descafeinados 100% naturales y los mezcla descafeinados superan el 0,12% de porcentaje máximo de cafeína declarado por la legislación. Esto puede ser debido a que a menor concentración de cafeína se produce un mayor porcentaje de error o a un mal proceso de extracción de la cafeína de los cafés. Sin embargo, los valores de cafeína obtenidos en los cafés solubles descafeinados no exceden del 0,3% máximo legislado.

Finalmente, queremos destacar que estas conclusiones no son determinantes, ya que los resultados dependen, en gran medida, de la exactitud con el que se elabore el proceso de extracción. También, cabe destacar, que sería necesario analizar más muestras de café de los diferentes tipos utilizados para corroborar las conclusiones descritas.

# **CAPÍTULO 8: EVALUACIÓN ECONÓMICA**

Para asegurar la viabilidad de cualquier proyecto experimental se debe hacer una evaluación económica.

El coste total del proyecto se ha dividido en cinco partes:

- Costes energéticos (electricidad y agua)
- Coste en material y reactivos
- Amortizaciones
- Costes personales
- Coste total

## 8.1. Costes energéticos

En este apartado se detalla la parte de electricidad y agua. Se ha estimado el consumo en el laboratorio para calcular los costes aunque el cálculo del coste energético es aproximado.

Para calcular el gasto de electricidad se han de tener en cuenta los siguientes conceptos:

- **Potencia:** es el resultado de multiplicar la potencia contratada por la duración del proyecto, en este caso en meses, y por el precio (kW).
- **Consumo:** es el resultado de multiplicar el consumo del periodo por el precio en kW·h.
- **Impuesto eléctrico:** es la suma de la potencia y el consumo multiplicado por el coeficiente establecido por la ley.
- **Conservación del aparato:** es el resultado de multiplicar el precio del alquiler de los equipos por el número de meses que cubre la factura.

Para calcular este gasto se ha estimado una potencia de 4,4 kW, teniendo en cuenta que el proyecto dura 4 meses y que se ha trabajado con una dedicación de 8 horas por día, se obtiene el coste total de electricidad del proyecto. Para calcular el coste total de electricidad se tiene que aplicar un 18% de IVA.

**Tabla 13.** Gastos de electricidad

Concepto	Cálculos	Importe (€)	18 % IVA	Total (€)
Potencia	4,4 kW/mes x 4 meses x 1,581887 €/kW	2,7841	0,5011	3,2853
Consumo	1 kW x 8 h/sesión x 55 sesiones x 0,16 €/kWh	23,4667	4,2240	27,6907
Impuesto sobre electricidad	33,78 € x 1,05113 x 4,864 %	1,7271	0,3109	2,0379
Conservación del aparato	4 meses x 0,27 €/mes	1,0800	0,1944	1,2744
		<b>Total</b>		<b>34,2883</b>

En la tabla se ha calculado la potencia suponiendo que el laboratorio es utilizado por unos 10 estudiantes y se ha considerado en el consumo que al menos 3 estudiantes a la vez utilizan el laboratorio.

Para calcular los gastos en agua se ha decidido fijar el consumo en 0,01 L/h de agua de la red, ya que se utiliza para realizar experimentos y para limpiar el material antes y después de su uso. Se obtiene una estimación del coste total del agua del proyecto durante estos 4 meses (440h) aplicando un 8% de IVA al consumo de agua.

**Tabla 14.** Gastos de agua

Servicios de agua	Volumen (L)	Sesiones (días)	Volumen proyecto (L)	Precio unitario (€/L)	Importe (€)
Consumo	35	55	1925	0,00400 €	7,7000
Canon	35	55	1925	0,00039 €	0,7508
Alcantarillado	35	55	1925	0,00014 €	0,2695
			<b>Total servicios</b>		<b>8,7203</b>

En la tabla se ha calculado el consumo de agua estimado de unos 35 litros de agua gastados por sesión, multiplicado por unas 55 sesiones de trabajo. Estos cálculos han dado un resultado de 8,7203 € que aplicando el correspondiente 8% de IVA da un total de 9,42 €.

**Tabla 15.** Coste total de electricidad y agua

Coste electricidad	9,42 €
Coste de agua	34,29 €
<b>Coste total energético</b>	<b>43,71 €</b>

El coste total de electricidad y agua es de 43,71 €.

## 8.2. Costes de material y reactivos

En este apartado se tiene en cuenta todo el material utilizado en el proyecto y todos los productos y reactivos necesarios para la realización de los experimentos.

En la siguiente tabla se detallan los precios del material de vidrio utilizado:



**Tabla 16. Costes de material**

Material	Características	Cantidad	Precio unitario (€)	Precio material (€)
Cubeta espectrofotómetro		1	70,23	70,23
Cuentagotas	5 mL	2	0,13	0,26
Desecador vidrio	grande	1	83,73	83,73
Embudo alemán	mediano	1	1,66	
Embudo Büchner	mediano	2	8,46	16,92
Embudo decantación	250 mL	2	18,82	37,64
Embudo pesar sólidos		2	10,71	21,42
Equipo de filtración HPLC		1	150,00	150,00
Equipo de reflujo		1	11,57	11,57
Espátulas		2	1,45	2,90
Filtros de jeringa HPLC		4	0,50	2,00
Jeringa plástico		1	0,12	0,12
Jeringa Hamilton HPLC		1	34,22	34,22
Matraz aforado	25 mL	2	2,07	4,14
Matraz aforado	50 mL	2	2,09	4,18
Matraz aforado	100 mL	2	2,37	4,74
Matraz erlenmeyer	100 mL	2	8,27	16,54
Matraz kitasato	1000 mL	1	12,73	12,73
Matraz redondo fondo plano	250 mL	2	2,10	4,20
Matraz redondo fondo redondo	250 mL	2	2,10	4,20
Papel de filtro		40	0,07	2,80
Pera de goma		2	4,29	8,58
Pipetas aforadas	2 mL	1	1,54	1,54
Pipetas aforadas	5 mL	1	1,54	1,54
Pipetas aforadas	10 mL	1	1,76	1,76
Pipetas aforadas	20 mL	1	2,17	2,17
Pipetas graduadas	1 mL	1	1,43	1,43
Soportes		2	8,35	16,70
Probeta graduada	100 mL	1	3,85	3,85
Tubos de ensayo		32	0,03	0,96
Tubos eppendorf		150	0,01	1,50
Vaso de precipitados	50 mL	2	0,81	1,62
Vaso de precipitados	100 mL	1	0,85	0,85
Vaso de precipitados	500 mL	1	1,37	1,37
			<b>Total</b>	<b>530,45 €</b>

Hay que señalar que estos gastos son amortizables a unos 4 años así que el gasto real queda reducido a:

$$\frac{530,45 \text{ €}}{4 \text{ años} \cdot 12 \text{ meses}} \cdot 4 \text{ meses} = 44,20 \text{ €} \quad (34)$$

En la siguiente tabla se detallan los costes de los productos y reactivos utilizados:

**Tabla 17.** Coste de reactivos

Producto	Cantidad	Precio unitario (€)	Precio productos (€)
Agua Mili-Q	5000 mL	0,13	67,00
Acetato de plomo	25 mL	1,35	1,35
Acetona	250 mL	3,00	3,00
Acetonitrilo grado HPLC	2,5L x 2	32,50	65,00
Ácido clorhídrico	10 mL	1,60	1,60
Ácido nítrico	20 mL	1,92	1,92
Ácido sulfúrico	25 mL	1,50	1,50
Cafeína anhidra	100 g	22,24	22,24
32 Cafés	30 g	55,00	55,00
Carbonato de sodio	150 g	3,68	3,68
Cloroformo	1500 mL	59,55	59,55
Cloruro de amonio 0,25M	25 g	0,69	0,69
Isopropanol	500 mL	12,15	12,15
Sulfato de sodio	150 g	3,83	3,83
Tampón acetato 0,2 M pH5	500 mL	5,22	5,22
Vaselina		1,56	1,56
		<b>Total</b>	<b>305,28 €</b>

El coste total de material y reactivos es de:

**Tabla 18.** Coste total de material y reactivos

Coste de material	44,20 €
Coste de reactivos	305,28 €
<b>Coste total</b>	<b>349,48 €</b>

### 8.3. Amortizaciones

Se debe tener en cuenta que al utilizar los aparatos en el laboratorio, sufren un desgaste. Hay que considerar este desgaste como parte del coste del proyecto. El método de cálculo es el siguiente:

$$Cuota\ anual = \frac{Valor\ amortizable(\text{€})}{Tiempo\ de\ vida\ útil(\text{año})} \quad (35)$$

Se adapta la definición al ámbito del proyecto y se tiene en consideración que un año tiene dos cuatrimestres útiles, por lo tanto:

$$Cuota\ cuatrimestral = \frac{Valor\ adquisición(\text{€})}{2 \bullet Tiempo\ de\ vida\ útil(\text{año}) \bullet N^{\circ}\ proyectos} \quad (36)$$

En la tabla siguiente se muestra el material amortizable para este proyecto:

**Tabla 19.** Gastos de amortización

Material	Precio (€)	Años amortización	Precio Amortización anual (€)	Precio amortización cuatrimestral (€)
Cromatógrafo HPLC	30.000,00	24	1.250,00	312,00
Columna	900,00	10	90,00	22,00
Espectrofotómetro	11.600,00	10	1.160,00	290,00
Balanza analítica	950,00	20	47,00	11,00
Ultrasonidos	385,71	10	38,00	9,00
Purificador de agua Mili-Q	890,00	10	89,00	22,00
Vitrina extractora	1.800,00	20	90,00	22,00
Manta calefactora	314,00	10	31,00	7,00
			<b>Total</b>	<b>695,00 €</b>

Los costes de amortización de los aparatos utilizados en el laboratorio hacen un total de 695,00 €.

## 8.4. Costes de personal

En este proyecto se han dedicado unas 300 horas de laboratorio y unas 140 de oficina para la teoría y la redacción del proyecto

Los costes de personal han sido calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Costes personales}(\text{€}) = RH \cdot \frac{SBA + SS \left( \frac{\text{€}}{\text{año} \cdot \text{persona}} \right)}{\frac{\text{horas trabajadas}}{\text{año}}} \quad (37)$$

Donde:

RH: recursos humanos asignados al proyecto (hora · persona)

SBA: salario bruto anual

SS: cuota de empresa de la seguridad social, es un 32% sobre el SBA

$$\text{Costes personales}(\text{€}) = 440 \cdot \frac{12000 + 3840}{1320} = 5.280 \text{ €} \quad (38)$$

Los costes de personal también se han calculado como si el proyecto fuera realizado por una empresa. Se ha considerado un total de horas anuales de 1320 y una categoría profesional de personal de laboratorio.

**Tabla 20.** Cálculo del SBA + SS

Cargo	Salario bruto anual (SBA) (€)	SS=32% SBA (€)	SBA + SS (€)
Personal de laboratorio	12.000	3.840	15.840

**Tabla 21.** Cálculo del personal en una empresa

Categoría	Horas/año	RH (h)	SBA + SS(€)	Coste total (€)
Personal laboratorio	1.320	440	15.840	5.280

## 8.5. Coste Total

En la siguiente tabla se muestra la suma de todos los costes realizados anteriormente.

**Tabla 22.** Coste totales del proyecto

Costes energéticos	44 €
Costes material y reactivos	349 €
Amortizaciones	695 €
Coste de personal	5.280 €
<b>Subtotal</b>	6.368 €
10% Imprevistos	637 €
<b>Total</b>	<b>7.005 €</b>

El coste total del proyecto suma 7.005 €

# **CAPÍTULO 9:**

# **SEGURIDAD Y MEDIO**

# **AMBIENTE**

En el laboratorio estamos sometidos a riesgos constantemente por eso hay que prevenirlos y llevar a cabo las medidas de seguridad en el laboratorio.

Referente a la seguridad en el laboratorio:

- Se debe utilizar bata, guantes, gafas de seguridad, calzado cerrado y llevar el pelo recogido en el caso de llevarlo largo.
- Se deben realizar los experimentos en el laboratorio y en el caso de emanar gases se debe utilizar la campana extractora.
- Hay que llevar cuidado con el agua ya que en contacto con aparatos eléctricos puede inutilizarlos en caso de vertido o puede provocar cortocircuitos.
- Hay que tener el lugar de trabajo limpio y ordenado para evitar riesgos de vertidos y llevar cuidado con el material de vidrio y no influir en su rotura.

Referente a la seguridad con los productos químicos:

- Antes de usar un producto químico se debe leer la etiqueta observando el pictograma de peligrosidad, hacer uso de las fichas de seguridad y de las frases R y S. Toda esta información está ampliamente detallada en el Anexo 6.
- En cuanto a los residuos generados al finalizar los experimentos se deben clasificar según su contenido.

### **Medio ambiente**

En el laboratorio se generan residuos líquidos y sólidos que se deben separar y clasificar según sus componentes para después poder gestionarlos según su peligrosidad y no contaminar el medio ambiente.

La cafeína no se degrada así que puede contaminar ríos y el mar si llega a través de los desagües.



***Figura 99.** Soluciones de cafeína de café*

Se habilitó un bidón donde se contenían los residuos de la extracción de cafeína de café (café, cafeína, carbonato de sodio, cloroformo) debidamente señalizados con la etiqueta correspondiente.



***Figura 100.** Bidón de residuos de café y cloroformo*

Los residuos procedentes de la salida del detector del HPLC (acetonitrilo, agua, metanol) se habilitaron en un bidón etiquetado como mezclas de disolventes no halogenados de HPLC.



**Figura 101.** Bidón de residuos del HPLC

Los demás productos con los que se ha trabajado deben ser depositados en los bidones del laboratorio para después ser procesados según la normativa vigente de gestión de residuos (ver anexo X Gestión de residuos).



**Figura 102.** Garrafas y bidones de residuos de laboratorio





# **CAPÍTULO 10:**

# **BIBLIOGRAFÍA**

## **10.1. Bibliografía de Consulta**

- Adams, Don, and Arlene Goldbard. *Creative community: the art of cultural development*. New York, NY: Rockefeller Foundation, Creativity & Culture Division, 2001.
- Alfredo Ara Roldán. *100 plantas medicinales escogidas*. Madrid, Editorial EDAF S. A., 1997.
- Alberto Ibarz Ribas. *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Madrid, Editorial Mundi-Prensa Libros, 2005.
- Alicia Lamarque. *Fundamentos teorico-practicos de quimica organica/ theoretical and practical organic chemistry*. Argentina, Editorial Brujas, 2008.
- Andrés Herrán Gómez. *Las fases tempranas de la ansiedad*. Barcelona, Editorial Elsevier Masson, 2007.
- Antonio Fuster Ortigosa. *Prácticas de química general*. Murcia, Editorial Universidad de Murcia, 1996.
- Astrid Nehlig. *Coffee, tea, chocolate, and the brain*. Philadelphia, Taylor & Francis, 2004.
- Barry D. Smith, Uma Gupta, Bhupendra S. Gupta. *Caffeine and activation theory: effects on health and behavior*. CRC Press; 1ª Edición, 2006.
- Bernat Cañigual, Salvador Vanaclocha. *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. Barcelona, Editorial Masson, 4ª Edición, 2003.
- Brown, Cecelia M., and Lina Ortega. "Information-seeking Behavior of Physical Science Librarians: Does Research Inform Practice?" *College & Research Libraries* 66 (2005): 231-247.
- Carbado, Devon W. "Black Male Racial Victimhood." *Callaloo* 21, no. 2 (1998): 337-361. <http://www.jstor.org/> (accessed July 8, 2005).
- Carl L. Keen. *Theobroma Caco: Biology, Chemistry, and Human Health*. New York, Editorial John Wiley & Sons Incorporated, 2009.

- Daniel C. Harris. Análisis Químico Cuantitativo. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 2007.
- Daniel J. Pasto, Carl R. Johnson. Determinación de estructuras orgánicas. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1ª Edición, 1981.
- Diego Redolar Ripoll. Cerebro y adicción. Barcelona, Editorial UOC S.L., 1ª Edición, 2005.
- Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz, Randall G. Engel, Fort Worth. Introduction to Organic Laboratory Techniques: Small-Scale Approach. Saunders College Publishers, 1998.
- Dueñas Laita. Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos. Barcelona, Editorial Masson, 1999.
- Eduardo Primo Yúfera. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1991.
- Encarna Castillo García, Isabel Martínez Solís. Manual de fitoterapia. Barcelona, Editorial Elsevier Masson, 2007.
- Ellison, Jim. "Assessing the accessibility of fifty United States government Web pages: Using Bobby to check on Uncle Sam." First Monday, volume 9, number 7 (July 2004). <http://www.firstmonday.org> (accessed June 16, 2005).
- Eugene D. Olsen. Métodos ópticos de análisis. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1990.
- Frederic Rosengarten, Jr. The book of edible nuts. New York, Editorial Dover Publications, Inc., 2004.
- Francis Rouessac, Annick Rouessac. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. Francia, John Wiley and Sons, 2ª Edición, 2007.
- Marie-Pierre Arvy, François Gallouin. Especies, Aromatizantes y Condimentos. Madrid, Editorial Mundi-Prensa libros S.A., 1ª Edición, 2006.
- Luis Bravo. Farmacognosia especial. Madrid, Editorial Elsevier España, 1ª Edición, 2003.
- Gabriel Rubio Valladolid, Mario Martínez Ruiz. Manual de drogodependencias para enfermería. Madrid, Editorial Díaz de Santos, 1ª Edición, 2002.
- Gibaja Oviedo, Segundo. Pigmentos naturales quinónicos. Lima, Editorial Fondo, 1998.
- International Plant Genetic Resources Institute. Descriptores para el té (Camellia sinensis). Roma, Editorial IPGRI, 1997.
- H.P. Rang. Farmacología. Barcelona, Editorial Elsevier España, S.A., 6ª Edición, 2008.
- Inmaculada Julián. Diccionario de química. Madrid, Editorial Complutense, 1999.
- Isidora Sanz Berzosa. Prácticas de química orgánica Experimentación y desarrollo: experimentación y desarrollo. Valencia, Editorial Politècnica de València, 1ª edición, 2002.
- Kenneth A. Connors. Curso de análisis farmacéutico. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1ª Edición, 1980.
- Jorge León. Botánica de los cultivos tropicales. Costa Rica, Editorial Rosa Varas, 1ª Edición, 1987.
- Jordi Carvajal, Manel Esteller, Pere Gil, Olga Manrúbia, Jordi Salvador, Guzmán Sevilla. Carvajal. La Cafeína. Barcelona, 1988.
- José Costa López. Curso de ingeniería química: introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1991.
- José Bello Gutiérrez. Calidad de vida, alimentos y salud humana: fundamentos científicos. Madrid, Editorial Díaz de Santos, 1ª Edición, 2005.
- Manuel González de Buitrago. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. Barcelona, Masson S.A., 2ª Edición, 2004.
- Margarita Barretto. El mate : su historia y cultura. Buenos Aires, Ediciones del Sol S.R.L., 2006.
- María J. Climent Olmedo. Experimentación en química: química orgánica, ingeniería química. Valencia, Editorial de la UPV, 2005.
- María L. Marín García. Bases químicas del medio ambiente: manual de laboratorio. Valencia, Editorial de la UPV, 2004.

- Mary E. O'Brien, Arthur J. Roberts, Genell Subak-Sharpe. *Nutricéuticos: suplementos nutricionales, vitaminas, minerales oligoelementos, alimentos curativos*. Barcelona, Editorial Robinbook, 2003.
- Marvin C. McMaster. *HPLC, a practical user's guide*. New Jersey, A John Wiley & Sons, Inc., 2ª Edición, 2007.
- Michael E. Aulton. *Farmacia: Ciencia y diseño de formas farmacéuticas*. Madrid, Editorial Elsevier España, S.A., 6ª Edición, 2004.
- M. W. Dong. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC Volume 6*. Amsterdam. Elsevier B.V., 2005.
- Nydam, Ronald J. *Adoptees Come of Age: Living Within Two Families*. Louisville, KY: Westminster John Knox Press, 1999. <http://www.netlibrary.com> (accessed July 8, 2005).
- Owen R. Fennema. *Introducción a la ciencia de los alimentos, Volumen 1*. Barcelona, Editorial Reverte, 2ª edición, 1982.
- Oberlin College. Conservatory of Music. Library. Mr. and Mrs. C. W. Best Collection of Autographs, in the Mary M. Vial Music Library of the Oberlin College Conservatory of Music. Oberlin, OH: Oberlin College Library, 1967.
- Ralph E. Tarter, Robert T. Ammerman, Peggy J. Ott. *Handbook of substance abuse: neurobehavioral pharmacology*. New York, Editorial Springer, 1998
- R.E. Dodd. *Química inorgánica experimental: una guía de trabajo de laboratorio*. Barcelona, Editorial Reverte, 1965.
- Rogelio Ocampo, Luz A. Ríos, Luz A. Betancur, Diana M. Ocampo. *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*. Editorial Universidad de Caldas, 2008.
- Sharon M. Lewis. *Enfermería medico quirúrgica*. Madrid, Editorial Elsevier España, 6ª Edición, 2004.
- Shawn M. Talbott, Kerry Hughes. *The Health Professional's Guide to Dietary Supplements*. Philadelphia, Editorial Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Stavros Kromidas. *HPLC made to measure: a practical handbook for optimization*. Weinheim, Wiley-VCH, 2006.
- T.A. Geissman. *Principios de química orgánica*. Barcelona, Editorial Reverte, 2ª Edición, 1973.
- Víctor Manuel Rodríguez Rivera, Edurne Simón Magro. *Bases de la alimentación humana*. España, Editorial Gesbiblo, S.L., 2008.
- Víctor Manuel Rodríguez Rivera, Edurne Simón Magro. *Bases de la alimentación humana*. España, Editorial Gesbiblo, S.L., 2008.

## 10.2. Páginas web de consulta

[www.federacioncafe.com](http://www.federacioncafe.com)  
[www.nestle.es](http://www.nestle.es)  
[www.saralee.com](http://www.saralee.com)  
[www.carrefour.es](http://www.carrefour.es)  
[www.saimaza.es](http://www.saimaza.es)  
[www.mercadona.es](http://www.mercadona.es)  
[www.dia.es](http://www.dia.es)  
[www.alcampo.es](http://www.alcampo.es)  
[www.panreac.com](http://www.panreac.com)  
[www.jpselecta.es](http://www.jpselecta.es)  
[www.mt.com](http://www.mt.com)  
[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)  
[www.agilent.es](http://www.agilent.es)