

50
29.



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

FACULTAD DE QUIMICA

"DESARROLLO DE UN METODO DE CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA MEDIR
CAFEINA, TEOBROMINA Y TEOFILINA EN CAFES
COMERCIALES"

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

SAUL MIRANDA ROSAS



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
1.-Introducción	1
2.-Objetivo	2
3.-Generalidades	3
3.1.-Historia del café	3
3.2.-Leyendas sobre el origen del café	6
3.3.-Planta y clasificación botánica del café	8
3.4.-Cultivo del café	10
3.5.-Enfermedades y plagas del café	11
3.6.-Descripción y composición química del fruto	13
3.7.-Procesamiento del fruto del café	17
3.8.-Torrefacción	23
3.9.-Calidad del café	24
3.10.-Molido del café	25
3.11.-Teobromina, teofilina y cafeína	25
3.12.-Propiedades físicas de teobromina, teofilina y cafeína	28
3.13.-Propiedades farmacológicas de teobromina, teofi- lina y cafeína	30
3.14.-Métodos empleados en la medición de la concen- tración de teobromina, teofilina y cafeína	32
4.-Cromatografía de líquidos	34
4.1.-Cromatografía de líquidos de alta resolución --- (HPLC)	35
4.1.1.-Aparatos para la HPLC	36
4.1.2.-Gradiente de elución	37
4.1.3.-Fase móvil	37
4.1.4.-Bombas	38
4.1.5.-Inyectores	38

	Pag.
4.1.6.-Columnas	39
4.1.7.-Columnas reusables	40
4.1.8.-Detectores	40
4.1.9.-Sensibilidad	40
4.1.10.-Manejo de datos	41
4.1.11.-Velocidad	41
4.1.12.-Resolución	41
4.1.13.-Ventajas de la HPLC	42
4.1.14.-Modo de selección de la HPLC	43
4.1.15.-Selección de la columna	46
5.-Material y reactivos	47
5.1.-Material	47
5.1.1.-Cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC)	47
5.1.2.-Columna	47
5.1.3.-Muestras de café	47
5.2.-Reactivos	48
5.2.1.-Disolventes	48
5.2.2.-Estandar interno	48
6.-Parte experimental	49
6.1.-Condiciones del aparato	49
6.1.1.-Fase móvil	49
6.1.2.-Velocidad de flujo y longitud de onda	49
6.2.-Tiempo de retención	49
6.3.-Estandar interno	50
6.4.-Curva estandar	55
6.5.-Método de extracción	56
6.6.-Calculos para sacar el % de recuperación por --- efecto de tiempo y temperatura	65
6.7.-Calculos para la concentración de teobromina, - teofilina y cafeína en muestras de café	66

	Pag.
7.-Resultados y discusión	67
7.1.-Condiciones establecidas en el instrumento(HPLC)	67
7.2.-Curva estándar	68
7.3.-Método de extracción	72
7.4.-Discusión de resultados obtenidos en los cafés comerciales empleando el método desarrollado...	73
8.-Conclusiones	76
9.-Bibliografía	77

1.-INTRODUCCION

El café es uno de los productos más conocidos y que se consumen diariamente en casi todas las partes del mundo, por ésta razón, su comercio es muy importante para la economía nacional e internacional. A nivel nacional participa como -- primer producto de exportación agropecuaria, segundo producto de exportación superado solo por el petróleo, tercer generador de divisas después del petróleo y el turismo y México es el quinto país productor de café en el mundo (1).

Otro aspecto importante del café es la pureza de los -- componentes que lo forman, esto ha hecho que se desarrollen muchas formas para determinar si el café ha sido adulterado.

Entre los componentes principales del grano del café -- tenemos a los alcaloides y su determinación siempre ha sido un problema y una necesidad, ya que con esto se puede determinar si un café ha sido adulterado.

En este trabajo se desarrollará un método de identificación y cuantificación de los alcaloides del café, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) utilizando -- muestras de café comerciales. Pretendiéndose con este trabajo mejorar los métodos hasta ahora realizados en cuanto a rá pidez, reproducibilidad, utilización de reactivos, solventes, tiempo, etc.

2.-OBJETIVO

Desarrollar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) rápido y reproducible para la identificación de los alcaloides del café, utilizando muestras de café comerciales.

3.-GENERALIDADES

3.1.-HISTORIA DEL CAFE.

El café es originario de Africa, fue introducido en -- Etiopía alrededor del año 1200, difundiéndose rápidamente -- por todo el mundo intertropical a lo largo del Mar Rojo, la Meca, El Cairo y por toda Asia, gracias a la intervención de los peregrinos que lo llevaron a sus respectivos países. Por el año 1300 se conoció en Persia y por el año 1500 en Tur--- quía, poco tiempo después, su comercio fue introducido al -- Mediterráneo por Venecia cuando los turcos la invadieron y -- si bien al principio se le dió un uso médico, gradualmente -- fue imponiéndose como bebida corriente, aunque su elevado -- costo lo conservó mucho tiempo entre los consumidores más -- ricos.

En la India, Moslem Pilgrims comienza el cultivo de café hacia el año 1600. Por primera vez se comercia con café en Amsterdam en 1640 y ya con mucha frecuencia en 1663.

Se sabe que en el siglo XVI en Constantinopla (Estambul) se inauguraron los primeros cafés cantantes, donde los bailarines entretenían a los ricos clientes que degustaban el café.

En esa época de grandes viajes comerciales, de Occidente a Oriente, los viajeros que regresaban traían consigo entre otras cosas el café, llegando por las costas de Italia. En Inglaterra apareció en 1652, llevado por un comerciante griego y contrariamente a lo que suele creerse, este país se convirtió en uno de los de donde más se le apreciaba, ya que pronto empezaron a establecerse cafés, proliferando y llegando a sumar más de dos mil, se dice que el Rey Carlos II ---

intentó cerrarlos porque creía que los clientes se dedicaban ha hablar en ellos de política y esparcían rumores falsos, - que perjudicaban el buen desempeño del gobierno de su majestad. Esta situación duro muy poco, ya que los lugares eran - tan populares que tuvo que reabrirlos nuevamente.

A Francia llegó el café en 1669 por medio de Solimán -- Aga, embajador del sultán de Constantinopla, quien lo llevó en la valija diplomática. Francia decidió adoptar esta bebida y a causa de su imperio colonial lo hizo llegar hasta Holanda, de donde alcanzó los países escandinavos y Suiza, con ellos, Europa entera quedó prendada del café.

Más tarde, los emigrantes que fueron a poblar América - del Norte llevaron consigo su nuevo tesoro, así, las trece - colonias cultivaron café en el nuevo continente y Estados -- Unidos se convirtió rápidamente en el primer consumidor mundial de café. La entrada del mismo al resto del continente - fue de una forma distinta.

A principios del siglo XVIII, los holandeses decidieron cultivar café en su colonia americana, la Guyana, hoy Suri-- nam. Desde allí los misioneros aproximadamente en 1729 lo -- llevaron a Brasil, donde se aclimató muy pronto, con lo que su producción aumentó grandemente, tanto que actualmente con trola el 50 % de la producción mundial de aproximadamente de 20 a 30 millones de sacos al año.

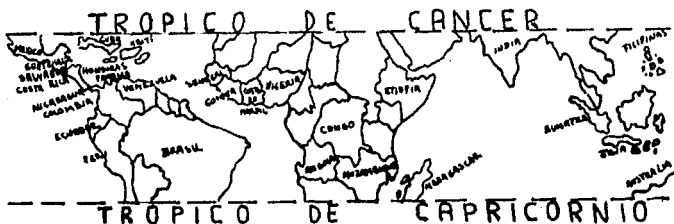
Francia lo introdujo a finales de 1800 en Haití, de ahí fueron los misioneros nuevamente quienes lo introdujeron hag ta Centroamérica y finalmente los ingleses lo llevaron a Jam aica, pasando más tarde a Colombia, México y Costa Rica.

Actualmente, se puede decir que existe un cinturón de -

cultivo de café entre los dos trópicos que envuelven al mundo cubriendo sobretodo a Centro y Sudamérica, así como parte de Indonesia, como se observa en la figura N° 1.

Figura N° 1

MAPA DE ZONAS DE CULTIVO DE CAFE EN EL MUNDO.



El café dentro del comercio internacional continúa siendo uno de los diez primeros productos de intercambio.

En México las primeras plantaciones de café se establecieron en la región de Acoyucan Veracruz, probablemente en el año 1795 con semillas introducidas de Cuba o las antillas, estas plantaciones no prosperaron porque se descuidaron durante el movimiento de independencia. Fue hasta 1817, cuando su cultivo se inició formalmente con plantas que el señor Juan Antonio Gómez trajo de Cuba.

Con el tiempo, el cultivo se extendió hacia el Norte de Veracruz y después a la Sierra Norte de Oaxaca y a algunas regiones de Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí. Actualmente el cafeto se cultiva en 3736 comunidades de 370 municipios,

ocupando una superficie de 497 456 hectáreas que pertenecen a trece estados, los que se dan a continuación y enlistados de mayor a menor capacidad en cuanto a su producción (2,3).

- | | |
|-------------|--------------------|
| 1.-Chiapas | 7.-San Luis Potosí |
| 2.-Veracruz | 8.-Nayarit |
| 3.-Oaxaca | 9.-Jalisco |
| 4.-Puebla | 10.-Tabasco |
| 5.-Guerrero | 11.-Colima |
| 6.-Hidalgo | 12.-Michoacán |
| | 13.-Querétaro |

3.2.-LEYENDAS SOBRE EL ORIGEN DEL CAFÉ.

Existen muchas leyendas sobre el origen del café, se --
mencionan algunas de ellas a continuación:

Leyenda Divina.-Recibe este nombre por los personajes --
que intervienen en ella. Cuentan que mientras el profeta ---
Mahoma, enfermo, sufría de debilidad y de agotamiento, vino
en su auxilio el arcángel Gabriel (reconocido tanto por árabes
como por cristianos) y le ofreció una bebida reconfortante,
que no solo le devolvió la salud sino también la fuerza viril.
Dicha bebida se dice, era tan negra como la piedra negra
de la Kaaba de la Meca, por lo que se le llamó desde entonces
Kawah y por haber sido conocida gracias a la mediación divina,
se le utilizó a menudo.

Otra leyenda dice que Kaldi un pastor árabe, cuidaba --
sus cabras en una altiplanicie de Etiopía llena de matorrales
y que un día las cabras encontraron y comieron sin que nadie
se percatase, unas plantas hasta entonces desconocidas. Esa

noche las cabras no durmieron, por el contrario se pusieron a danzar y a brincar hasta el alba, Kaldi sin comprender lo sucedido decidió vigilar al día siguiente cada movimiento de los animales y así descubrió que comían las frutillas de un arbusto raro. Intrigado probó también este misterioso fruto obteniendo un resultado igual al de las cabras de su rebaño, no concilió el sueño durante la noche. Más tarde, un religioso escuchó de Kaldi el relato, lo encontró maravilloso y le pidió que le mostrase tan útil regalo de la naturaleza y con él confeccionó bolitas que al masticarlas le permitieron al igual que sus colegas prolongar la oración y la meditación - nocturnas.

Según cuenta otra leyenda, en una comunidad religiosa - llamada Chehodet, una noche las cabras de los monjes, en lugar de dormir pasearon por los montes. Aquellos pensaron que un Chotocabras, ave nocturna que merodea los rebaños andaba alborotándolas, más al salir a poner orden vieron que la causa eran las frutas de cierto arbusto que los animales habían comido.

Azorados tomaron algunas cerezas e hicieron con ellas - una decocción que más tarde incluyeron en su dieta. Cuentan que para obtener la infusión, el jefe de la comunidad secó - los granos al fuego haciendo sin saberlo el primer tueste.

La bebida recién descubierta recibió el nombre de Kawah apelativo que parece guardar alguna relación con la provincia de Kafa de la que el café procede. También se ha encontrado que Kawah significa lo que maravilla y da vuelo al pensamiento (4).

3.3.-PLANTA Y CLASIFICACION BOTANICA DEL CAFE

El cafeto pertenece a la orden de las Rubiaceas la que está dividida en once familias, en las que se agrupan los numerosos géneros de esta importante orden. En la familia Coffeaceas se encuentra el género Coffea, que da nombre a la familia y algunas de cuyas especies producen el café.

La clasificación bótanica del café es la siguiente:

REINO : VEGETAL
DIVISION : ESPERMAFITAS O PANEROGAMAS
SUBDIVISION : ANGIOSPERMAS
CLASE : DICOTILEDONEAS
ORDEN : RUBIACEAS
FAMILIA : COPPEA
ESPECIE : SON 66 ESPECIES.

Desde el punto de vista económico la de mayor importancia es la especie Coffea arábica, originaria de Etiopía, --- aportando el 75 % del café que se produce en el mundo y es prácticamente la única que se cultiva en América Latina.

Las variedades más importantes que se cultivan de esta especie son las siguientes:

TYPICA.-Es la más conocida de todas y se llama así por tomarla como patrón cuando se compara con otras variedades para evaluaciones de anatomía y genética. Es un arbusto de mas de tres metros de altura, con ramificaciones secundarias y terciarias poco abundantes, con entrenudos largos. Las hojas son de color bronceado cuando estan nuevas y son verdes al madurar; de flores blancas que dan frutos elípticos cuyas semillas son de color verde oscuro.

BOURBON.--Las plantas de esta variedad son de forma más cilíndricas que la *Typica* y de ramificaciones más intensas, las hojas son un poco más cortas y con bordes más ondulados; los frutos son de menor tamaño y las semillas tienen una proyección más circular, esta variedad es la segunda como productora de café en el mundo.

CATURRA.--Esta variedad se considera como una mutación de la Bourbon condicionada por un factor dominante, se descubrió en Minas Gerais, Brasil. Su porte es menor que el de la Bourbon, la planta es más redonda y los entrenudos tanto del tallo como de las ramas son muy cortos, esta característica hace que la planta sea más baja que la Bourbon y presente una apariencia de alta producción, su ramificación es abundante y sus hojas son más largas y anchas que la de Bourbon.

MUNDO NOVO.--Originada probablemente de la cruce natural entre la variedad Bourbon con una selección de *Typica* llamada Sumatra; es originaria de Brasil. Su porte es alto y sus hojas son semejantes a las de Bourbon, su ramificación secundaria es abundante, sus frutos y semillas son parecidos a la variedad *Typica*.

GARNICA.--Con este nombre se ha designado a ciertas variedades derivadas de la cruce entre selecciones de Caturra Amarillo 13 y Mundo Novo 15, la finalidad de crear este híbrido entre estas variedades fue la de sintetizar en un solo cultivo el porte bajo del Caturra y el gran vigor y alta producción del Mundo Novo.

Otras variedades de esta especie son: Tchertcher, Sidama, Gimma, Local Bronze, Bronze Tip, Kents, Blawan Pasomach, Bourbon Vermelho y Bourbon Amarilla.

Otras especies de café utilizadas para la producción comercial son: *Coffea Canephora* cuya variedad Robusta es la más cultivada y la especie *Coffea Liberica* que aportan el 24 y 1 % respectivamente (2,5,6,7).

3.4.-CULTIVO DEL CAFE.

El café se obtiene de una planta denominada cafeto, que se cosecha en lugares que se localizan geográficamente entre el trópico de cáncer y el trópico de capricornio. Las plantas son pequeños arbustos que llegan a crecer hasta siete metros de altura, pero nunca se les deja llegar a ese nivel, sino sólo hasta los dos metros para que los recolectores los alcancen.

Son árboles de hojas persistentes opuestas, oblongo-acovadas, coriáceas, glabras, brillantes y acuminadas. Forman racimos axilares de flores blancas, tubulares y fragantes y frutos en baya de color rojo o púrpura, del tamaño de una cereza, cada flor está constituida por un cáliz de cinco dientes, una corola tubular de cinco lóbulos, cinco estambres, un ovario bilocular y un estilo bifido.

El fruto consiste en un pericarpio bilocular que rodea a dos semillas plano-convexas, cada una con un surco longitudinal en su superficie plana y están rodeadas por un delgado endocarpio membranoso y una membrana fibrosa que se denomina pergamino.

El cafeto se desarrolla entre los 305 y 2745 metros de altura sobre el nivel del mar, pero es común y práctico su cultivo entre los 1830 y 2135 metros de altura sobre el nivel del mar.

Los suelos no deben ser secos y duros sino mas bien flojos y profundos, deben tener una acidez apropiada, así como elementos minerales necesarios e indispensables como nitratos, nitritos, fósforo y potasio. Otros menos indispensables son el magnesio, calcio, azufre, fierro, manganeso, cinc y -cobre, los suelos volcánicos son ricos en estos minerales.

El clima incluye temperatura media de aproximadamente - 20 °C con una variación de 7 u 8 °C y entre 150 y 200 cm³ de precipitación.

La sombra tiene un efecto equilibrante en el árbol de -café, parece guardar un balance en la floración con la potencia del árbol y la capacidad del medio ambiente, protegiéndolo se del viento y de la sequedad. La frescura ocasionada por -la sombra en el día reduce la transpiración de hojas y raíz, la luz del sol directa a la base de las plantas puede secar o inhibir su crecimiento. El crecimiento del café en el mundo es bajo la sombra de los árboles, que también se puede -- utilizar para controlar la erosión de pendientes inclinadas, una tendencia actual es utilizar menos sombra incrementando mayores cantidades de fertilizantes y agua (2,5,8,9,10).

3.5.-ENFERMEDADES Y PLAGAS DEL CAPE.

Las plagas son un factor que reduce la producción cafetalera y su intensidad está en función de las condiciones -- ambientales de las plantaciones. Se estima que se pierde de 1 a 2 % de la producción anual por este concepto, las plagas más importantes son los insectos como la broca del café, minador de la hoja, barrenador del tronco y ramas, piojo harinoso, palomilla blanca, araña roja, pulgones, chacuatete, --

hormigas, gorgojos, grillos, chapulines, gallina ciega y -- otros animales como babosas y roedores. Por otra parte las enfermedades del cafeto pueden producir grandes pérdidas que van del 25 al 30 % de una cosecha, dependiendo del clima, -- suelo y prácticas de cultivo de cada región. Las partes afectadas por las enfermedades son; la raíz, tallo, ramas, brotes, flores y los frutos verdes y maduros.

Muchos de los organismos causantes de estas enfermedades son microscópicos y se agrupan en colonias, formando lamas o mohos en manchas de colores que se observan a simple vista -- apreciando la extensión y magnitud de los daños.

Las enfermedades principales del cafeto son; en primer lugar el hongo causante de la Roya o Herrumbre (*Hemilea Vastatrix* Verk y Br) que es la que produce grandes pérdidas a -- nivel mundial, si no se le controla ya sea con sustancias -- químicas o bien desarrollando variedades resistentes. Otras enfermedades son el Dampingoff (tardío) que destruye total-- mente la planta; el Mal de Negro de los tallos que destruye totalmente a las plantas; Mancha de Hierro, ataca las hojas defoliándolas; Antracnosis ataca hojas, ramas y frutos; Nema todos atacan sistema radicular; Mal de Hilachas o Koleroga -- daña tallo, ramas, hojas y fruto; Ojo de Gallo o Gotera produce defoliación; Requemo o Derrite ataca brotes, hojas tier-- nas y cerezas; Mal Rosado o Salmonicolor ataca tallos, ramas, hojas y fruto; Fumagina produce debilitamiento de la planta; otras enfermedades son producidas por hongos, bacterias y -- virus (9,11).

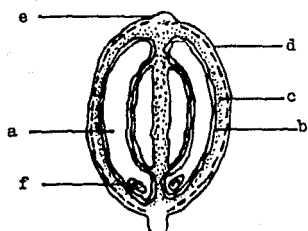
3.6.-DESCRIPCION Y COMPOSICION QUIMICA DEL FRUTO.

La maduración del fruto del café, en la mayoría de las zonas productoras, se presenta después de 7 a 8 meses de la floración, en regiones de temperaturas bajas tarda un poco más y en lugares cálidos la maduración se efectúa un poco antes. En México la recolección se efectúa de octubre a febrero.

Los frutos se cosechan al llegar a la madurez y se hace grano por grano cuando llegan a la madurez completa, que se observa por un color marrón intenso, aunque hay variedades de color amarillo cuando están maduros.

En la figura N° 2 se ve un corte longitudinal del fruto de café mostrando las partes anatómicas del fruto. La semilla de café presenta una superficie plana que se encuentra con otra igual dentro del fruto, cada mitad está recubierta por un delicado tejido llamado película. Estas dos fracciones se sostienen dentro del endocarpio por una membrana conocida con el nombre de pergamino o cascarilla de café, que es duro y quebradizo cuando se seca, el cual rodea individualmente a cada una de las partes que constituyen el grano. La cascarilla en cambio está cubierta por una gruesa capa de células esponjosas que forman la pulpa, teniendo un espesor de 5 mm. Debido a la consistencia viscosa del mucílago, una leve presión sobre el fruto es suficiente para expulsar de él las dos mitades que constituyen el grano.

Figura N° 2.-CORTE LONGITUDINAL DE UNA CEREZA DE CAFE.



- a) ENDOSPERMO O GRANO DE CAFE
- b) ENDOCARPIO O CASCARA
- c) MESOCARPIO O MUCILAGO
- d) ESOCARPIO O PULPA
- e) DISCO U OMBLIGO
- f) EMBRION.

La composición química de las diferentes partes que forman el fruto del café son las siguientes:

a) Endospermo o Grano de Café.-Tiene una composición química compleja.

En base seca contiene:

Azúcares Reductores	1.5 %
Sacarosa	7.0 %
Almidón	10.0 %
Pentosanas	5.0 %
Hemicelulosa	15.0 %
Holocelulosa	18.0 %
Lignina	2.0 %
Aceites	13.0 %
Proteína	13.0 %
Cenizas como Oxidos	4.0 %
Acidos no Volátiles como:	
Acido Clorogénico	7.0 %
Acido Oxálico	0.2 %

Acido Málico	0.3 %
Acido Cítrico	0.3 %
Acido Tartárico	0.4 %
Trigonelina	1.0 %
Cafeína	1 a 2 %

b) Endocarpio o Cáscara.-Es la parte anatómica que envuelve al grano después de la capa mucilaginosa y representa aproximadamente el 12 % del grano en base seca.

Químicamente contiene:

Humedad	7.6 %
Carbohidratos	92.8 %
Grasas	0.6 %
Proteína	0.39%
Cenizas	0.5 %
Extracto Libre de Nitrógeno	18.9 %

c) Mesocarpio o Mucílago.-Está localizado entre la pulpa y la cáscara del grano de café, representa el 5 % del peso seco, es una capa de 0.5 - 2 mm. de espesor fuertemente adherida a la cáscara, físicamente es un sistema coloidal líquido, hiofílico e insoluble en agua.

Químicamente contiene:

Agua	84.2 %
Proteína	8.9 %
Azúcares	4.1 %
Acido Pécico	0.9 %
Cenizas	0.7 %

Esta fracción aparentemente no contiene taninos ni cafe

ina, pero contiene enzimas pectinolíticas.

d) Esocarpio o Pulpa de Café.-Representa alrededor del 29 % en base seca del fruto y tiene la siguiente composición química:

Proteína	9.2 - 11.2 %
Fibra Cruda	13.2 - 27.6 % con promedio de 18.1 %
Carbohidratos	57.8 - 66.1 % con promedio de 43.0 %
Grasas	2.3 - 2.7 %
Cenizas	8.0 %
Cafeína	0.51- 1.3 %
Taninos	1.44- 4.5 %
Acido Clorogénico	2.6 - 2.7 %
Acido Cafeico	0.31- 1.6 %

Estos valores pueden cambiar de acuerdo a la variedad - del café, localidad, prácticas agrícolas o técnicas de procesamiento.

Los minerales de la fracción de las cenizas son:

Potasio	1.765 mg %
Calcio	0.554 mg %
Fósforo	0.116 mg %
Sodio	0.100 mg %
Fe, Mg, Zn, Cu, Mn y B	Trazas.

Los principales constituyentes de la porción de los carbohidratos son:

Celulosa	27.65 %
Azúcares Reductores como Glucosa	12.4 %
Azúcares No Reductores	2.02 %
Substancias Pécicas	6.52 %

**Policaridos en la Pared Celular, Lignocelulo-
sa, Hemicelulosa, y Lignina.**

Con respecto a la fracción proteínica, contiene niveles similares o más altos de aminoácidos que otros productos -- como la harina de soya o de algodón, pero es deficiente en -- aminoácidos azufrados. Tiene contenido alto de lisina, tanto como la harina de soya. Alrededor del 40 % del nitrógeno -- total, determinado por el método de Kjeldahl, es nitrógeno -- no proteico que incluye cafeína, trigonelina, niacina, purinas, pirimidinas, nitrógeno inorgánico y otras fracciones no identificadas y la suma de todos los aminoácidos representa el 60 % de la concentración del nitrógeno total en la pulpa del café (2,7,12).

3.7 .--PROCESAMIENTO DEL FRUTO DEL CAFE

Después de cosechados los granos de café son llevados a los beneficios para obtener los granos comerciales, consistiendo básicamente en dos operaciones que son:

A) Beneficio Húmedo.--Es el proceso o beneficiado del -- café cereza que se realiza por la vía húmeda, es determinante para la calidad intrínseca del grano y su sabor como bebida.

Requiere un consumo de agua más o menos grande en sus diferentes etapas y tiene por objeto separar las envolturas que cubren al grano de café, el agua sirve como vehículo o conductor del fruto y de sus residuos hasta la obtención del café pergamino.

El proceso tiene las siguientes etapas:

- a) Recibo de café cereza
- b) Despulpe
- c) Fermentación
- d) Lavado
- e) Escurrido
- f) Oreado
- g) Secado
- h) Reposo
- i) Envasado
- j) Almacenamiento.

a) Recepción.-Después de la recolección, los frutos se sumergen en un tanque al que se le dá forma de pirámide invertida, en el fondo del tanque, un tubo como sifón transporta los frutos a los pulperos.

b) Depulpado.-Es la primera operación, por medio de un mecanismo de fricción se separa la pulpa del grano del café, las máquinas despulpadoras se pueden ajustar de acuerdo con el tamaño del café cereza que se vaya a despulpar, si no se corre el riesgo de que se rompan los granos grandes y no se despulpen los granos chicos. La pulpa se transporta por agua hacia un sistema de recolección de desperdicios, ésta se puede utilizar como abono orgánico en los cafetos y para ensilados en la alimentación del ganado vacuno.

c) Fermentación.-Después que se ha efectuado el despulpe, los granos de café se transportan por agua a tanques donde se lleva a cabo la fermentación, que consiste en la transformación de las substancias insolubles del mucílago a otras solubles que sean fácilmente movibles por el agua, actuando -

enzimas propias del fruto y/o de microorganismos del fruto, del aire, agua, etc. que se encargan de desdoblar principalmente los azúcares.

Se desarrollan cuatro tipos de fermentación durante la remoción del mucílago, que son:

- Fermentación Alcohólica
- Fermentación Láctica
- Fermentación Acética
- Fermentación Butírica.

Generalmente la fermentación se para cuando se desarrolla la fermentación acética donde se lleva a cabo en un tiempo de 24 a 36 hrs. si se produce la fermentación butírica -- ésta imparte sabor agrio o a cuero al grano y olor putrefacto a la masa de café en fermentación, daño que es el de mayor castigo o es rechazado por los catadores.

Hay otros procedimientos que aceleran la fermentación o remoción del mucílago y que son los sistemas: mecánico, químico y bioquímico.

El fruto maduro reduce el tiempo de fermentación y --- aumenta la uniformidad de la misma.

d) Lavado.-Inmediatamente después del proceso de fermentación el café es lavado, para lo cual se necesita contar -- con agua necesaria y que sea suficientemente limpia para no dar al café ningún olor o sabor extraño o desagradable.

El lavado se puede hacer utilizando las mismas tinajas o pilas de fermentación, agitando o desprendiendo el mucílago y dejando escurrir el agua sucia por una coladera hasta dejar el pergamino limpio, utilizando el agua del último lavado -- como transporte a las tinajas de escurrimiento.

Otros procedimientos de lavado similares son: el tanque lavador, canal de correteo o caño lavador y otros que utilizan máquinas y bombas lavadoras.

e) Escurrido.-Una vez lavado el grano de café, pasa a unas tolvas para ser escurrido, lo cuál consiste en eliminar la mayor cantidad posible de agua sin utilizar maquinaria.

f) Oreado.-Es la eliminación de la humedad de café escurrido con el fin de dejarlo en un grado de humedad que facilite el secado final y se puede llevar a cabo mediante máquinas oreadoras o patios de asoleo. El tiempo de secado en las máquinas oreadoras es de cuatro a seis horas y en los patios de dos días aproximadamente de asoleo constante.

g) Secado.-Posteriormente el café pasa a su secado final, hasta quedar en un estado de pergamino seco y quitándole aproximadamente el 47.9 % de agua con relación al peso total de café lavado, ya en este estado de pergamino seco contiene un 12 % de humedad promedio. Los procedimientos que se utilizan son el asoleadero o patio, que va desapareciendo -- con rapidez, utilizando cada vez más máquinas secadoras del tipo "Guardiola" horizontales y verticales, en las cuales el secado es por medio de aire caliente. El tiempo de secado de estas máquinas es de 18 a 24 hrs.

h,i,j) Reposo, Envasado y almacenamiento.-El café secado correctamente se deberá tener en reposo, con el objeto de que la humedad del ambiente sea compatible y uniforme con la humedad del café, se envasa a granel en sacos de malla abierta; de aproximadamente 50 Kg. de acuerdo con la producción -- de cada beneficio se calcula que su capacidad de almacenamiento debe ser de 15 días aproximadamente (2,9,13).

B) Beneficio Seco.-Consiste en desprender y eliminar -- las envolturas que cubren al café pergamino, conocidas como pajilla o cascabillo, así como la película plateada para preparar el grano para su comercialización. Las distintas operaciones para obtener café verde o café oro se realizan con el uso de maquinaria especializada para manejar grandes volúmenes de café y obtener un producto uniforme y reducir los costos. Al igual que en el proceso del beneficio húmedo, en el beneficio seco se realizan una serie de operaciones tales -- como:

- a) Recepción y pesado
- b) Separación de Impurezas
- c) Morteado
- d) Clasificación y Desmanche
- e) Pulido
- f) Graneleo
- g) Envasado
- h) Taxeo y Estiva.

a) Recepción y Pesado.-Su finalidad es controlar las entradas de las distintas clases de café, conocer el peso bruto y neto del café recibido y producido y determinar el contenido de humedad, daños e impurezas.

b) Separación de Impurezas.-Consiste en la separación de materiales voluminosos como piedras, palos, basura, papeles, mecates, cafés machos (capulín, burras y elefantes) y otros como clavos, alambres y tornillos se separan por medio de una rejilla imantada que está colocada a la salida de la tolva, también se utiliza una máquina limpiadora de pergamino que funciona a base de tres zarandas que tienen movimientos--

de vaivén en sus discos con cuerdas excéntricas, del centro hacia la periferia. Limpio el café pasa al morteadado.

c) Morteado.-Tiene por objeto eliminar el pergamino, -- cascabillo o pajilla, así como la película del grano para obtener la almendra desnuda o café oro, para esto existen dos sistemas: 1) por desgarramiento que se realiza con máquinas llamadas morteadoras y se emplea para procesar café pergamino o café bola y 2) por fricción.

d) Clasificación.-Esta operación consiste en separar el café atendiendo a su tamaño, forma, peso y color. Se forman lotes uniformes de café oro.

e) Pulido de Café.-Se realiza por fricción mecánica a base de costillas pulidas y lisas de bronce, desprendiendo la película plateada adherida a la semilla dando brillo al grano, para mejorar la presentación especialmente al café de exportación.

f) Graneleo.-Se realiza para preparar café de calidad y marcas determinadas, consiste en la mezcla de café limpio y sano de diferentes tamaños y formas de acuerdo a especificaciones de los clientes.

g) Envasado.-Se realiza para facilitar el transporte -- del café, igualar el contenido neto en kilogramos y dar la presentación y garantía de la marca para su venta.

h) Taxeo y Estiba.-El taxeo es el movimiento de los sacos dentro del almacén, generalmente se hace utilizando pequeñas carretillas y la finalidad de la estiba es la de disponer oportunamente de café, listo para su venta al exterior o nacional, así como también facilitar la obtención de inven

tarios físicos de existencias por clases de café y consiste en acomodar unos sacos sobre otros en forma alternada o cruzada para que amarren debidamente (2,9,14)

3.8.-TORREFACCION

Es la operación que consiste en tostar el café por medio de calor. Las técnicas usadas tratan de que en este proceso se produzca el mínimo deterioro tanto en el aroma, como en la acidez y cuerpo del café.

Las temperaturas para tostar varían entre 200 y 250 °C dependiendo del tipo del tostador que se emplea. El tiempo promedio que se lleva en la tostación es de cinco minutos.

Al perderse la humedad por efectos del calor, los granos se hinchan por la liberación de gases y desarrollo de los aceites perdiendo de 14 a 16 % de su peso aproximadamente. Se le da mucha importancia a la torrefacción porque de ello depende que el catador dé un buen o mal dictamen. Siempre deberá tostarse a punto de prueba, de no ser así se lleva el riesgo de dejarlo falto de tueste, resultando en la prueba de la taza un sabor flojo, pajoso, falto de acidez, etc. en caso contrario, que se pasara de tueste, el resultado en la prueba de la taza será un sabor de café fuerte, que mado, sabor a cacahuete, etc.

Cuando la torrefacción ha sido normal, el resultado de la prueba de la taza puede ser excelente, bueno, regular, irregular, disparejo, claro, obscuro, opaco, parejo, etc. que son características que el catador tiene bien reconocidos.

3.9.-CALIDAD DEL CAFE.

Son las características físicas tanto en café verde como en café tostado, unidas a sus características intrínsecas de sabor suave y limpio, fino aroma, agradable acidez y cuerpo. Refiriéndose específicamente a la bebida estas cualidades organolépticas se determinan en la prueba de catación o prueba de la taza.

En la calidad del café también intervienen factores como los suelos, variedades de café, proceso de beneficiado y torrefacción.

Cada comprador o exportador tiene un equipo completo de catación, para cerciorarse de la calidad del grano y que consiste en clasificar los granos de un lote, muestra o embarque, en forma, tamaño, color y uniformidad del grano tal y como se obtiene.

Existen dos métodos para hacer la prueba en la taza. La prueba ciega en la cuál no hay ninguna referencia para indicar la clase y tipo de café y la prueba abierta donde el catador conoce el café que va ha clasificar; el método más correcto es el primero.

El procedimiento para hacer la prueba en la taza es el siguiente; de cada muestra de 250 a 300 g. de café oro (verde) ya tostado a punto de prueba y molido mediano, se pesan 10 g. por cada taza de 150 cc. se agrega agua hirviendo al ras, inmediatamente se huele la infusión o licor tomando el aroma desprendido, llamándosele a ésto prueba de la inhalación húmeda que es de gran ayuda al momento de la catación, posteriormente se van tomando sorbos y determinando las características del café por parte del catador.

3.10.-MOLIDO DEL CAFE.

Después del tostado a punto de prueba y enfriados adecuadamente los granos, puede decirse que cada uno de ellos tienen un contenido natural de aroma, acidez y cuerpo característico del buen café, cualidades contenidas en un 25 % -- del grano, ya que el 75 % restante es borra, tara o sedimento en forma de fibra. Inmediatamente después continúa la operación de molienda o trituración del café tostado a determinada graduación o finura, siendo estos: molido grueso, molido mediano y molido fino.

El molino ya sea de discos o de rodillos, debe cumplir los siguientes requisitos:

1.-Producir una completa línea de gránulos, desde el más fino hasta el más grueso.

2.-Controlar el calibre o grado de finura que se desea

3.-Evitar el calentamiento del café que produce la pérdida del aroma por el escape de las sustancias volátiles -- (9,10).

3.11.-TEOBROMINA, TEOPILINA Y CAFEINA.

La teobromina, teofilina y cafeína son tres alcaloides estrechamente relacionados entre sí, que provienen de plantas de amplia distribución geográfica como el café, té, cacao, mate, kola, guaraná, yoco, etc.

El café es la semilla madura desecada de la Coffea arabica una vez tostada origina el café, contiene como promedio 1 a 2 % de cafeína.

El té es la hoja desecada de la Camellia (Thea) sinensis estas hojas mediante fermentación dan origen al té negro común, contiene un promedio de 2.5 % de cafeína y pequeñas cantidades de teofilina.

El cacao es la semilla desecada y fermentada de la Theobroma cacao contiene 2.5 % de teobromina y 0.4 % de cafeína.

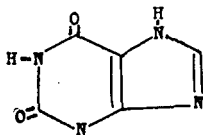
La kola es la semilla desecada de la Cola nitida contiene 2 % de cafeína y cantidades pequeñas de teobromina.

El guaraná es una pasta desecada y preparada con las semillas de la Paullinia cumana, contiene un 4 % de cafeína, siendo la planta más rica en este alcaloide.

La teobromina, teofilina y cafeína son compuestos derivados de la xantina, por lo que se denominan xantinas.

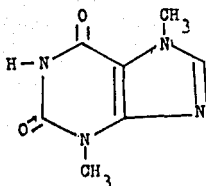
Las xantinas de importancia farmacológica resultan de la introducción de grupos metilo a nivel de los átomos de nitrógeno heterocíclico, originándose la teobromina y la teofilina que son dimetilxantinas y la cafeína que es una trimetilxantina. Estas xantinas pueden considerarse como alcaloides porque al solubilizarse en agua dan soluciones alcalinas.

Las fórmulas de las xantinas son:



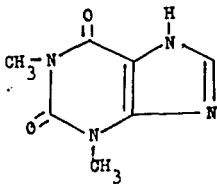
XANTINA

3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona.



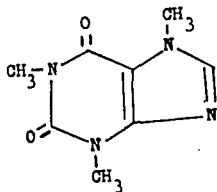
TEOBROMINA

3,7-dihidro-3,7-dimetil-1,H-purina-2,6-diona.



TEOFILINA

3,7-dihidro-1,3-dimetil-1,H-purina-2,6-diona.



CAFEINA

3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1,H-purina-2,6-diona.

3.12.--PROPIEDADES FISICAS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEINA.

TEOBROMINA

Nombre químico: 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1,H-purina-2,6-diona.

Fórmula química condensada: $C_7H_8N_4O_2$

Peso molecular: 180.17; C=46.66 %, H=4.48 %, N=31.1 %
y O=17.76 %.

También se le da el nombre de: 3,7-dimetilxantina.

Es el principal alcaloide del cacao, contiene de 1.5 a
3 %.

Cristaliza de sus soluciones acuosas en agujas monoclinicas.

Su punto de fusión es de 357 °C, sublima a 290-295 °C.

Un gramo de teobromina se disuelve en 2000 ml. de agua,
150 ml. de agua hirviendo, 2220 ml. en alcohol al 95 %.

TEOFILINA

Nombre químico: 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1,H-purina-2,6-diona.

Fórmula química condensada: $C_7H_8N_4O_2$

Peso molecular: 180.17; C=46.66 %, H=4.48 %, N=31.1 %
y O=17.76 %.

Se le da también los nombres de: 1,3-dimetilxantina; --
Teocina; Acurbron; Amorfilina.

Es un polvo blanco cristalino de sabor amargo, es isómero de la teobromina, existe en pequeña cantidad en el té. Su-

punto de fusión es de 270 a 274 °C, se sintetiza de dimetil urea y etilcianoacetato.

Un gramo se disuelve en 120 ml. de agua, 80 ml. de alcohol, 110 ml. de cloroformo. Soluble en agua hirviendo, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, ácido clorhídrico o ácido nítrico diluído.

CAFEINA

Nombre químico: 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1, H-purina-2,6-diona.

Fórmula química condensada: $C_7H_8N_4O_2$

Peso molecular: 194.19; C=49.48 %, N=28.25 %, H=5.19 % y O=16.48 %.

Otros nombres de la cafeína que se conocen son: 1,3,7-trimetilxantina; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina; teína, guaranina, metil teobromina.

La cafeína se encuentra en las plantas de café, té, hojas de mate, pasta de guaraná y nueces de kola.

Es un polvo blanco, poco coloroso, de sabor amargo. Por cristalización de sus soluciones acuosas se forman agujas blancas largas, finas y flexibles de un brillo sedoso, que pertenecen al sistema monoclinico con una molécula de agua en su molécula.

Sublima de 178 a 180 °C a presión atmosférica formando prismas hexagonales en forma de agujas incoloras. Su punto de fusión es de 238 °C, hierve a 348 °C con vapor incoloro y descomposición parcial. Gradualmente pasa de la forma cristalina a polvo a temperatura ambiente, rápidamente a 80 °C y-

completamente a 100 °C. Una cantidad considerable de cafeína se recupera de los productos sublimados del colector en las chimeneas de los tostadores de café. El pH de una solución - al 1 % es igual a 6.9. Las soluciones acuosas de cafeína son neutras al papel tornasol y ópticamente inactivas, sin embargo, se considera una base monodécido débil. La cafeína es descompuesta por álcalis calientes y reactivos clorados, el agua de cal no hace efecto en la cafeína y esto se usa en algunos procesos de extracción. Las sales de cafeína en solución se disocian cuando son evaporadas, estas sales con ácidos no -- son estables.

Un gramo de cafeína se disuelve en 46 ml. de agua, 5.5 ml. de agua a 80 °C, 1.5 ml. de agua hirviendo, 66 ml. de alcohol, 122 ml. de alcohol a 60 °C, 50 ml. de acetona, 5.5 ml. de cloroformo, 530 ml. de éter, 100 ml. de benceno, es poco soluble en alcohol absoluto, sulfuro de carbono, benzol, --- éter de petróleo y se absorbe de sus soluciones ácidas por -- carbón activado. El ácido sulfúrico y el ácido nítrico la di suelven sin decolorar.

3.13.-PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEINA.

La teobromina, teofilina y cafeína tienen en común varias acciones farmacológicas de interés terapéutico, en este orden creciente en potencia, estimulan al sistema nervioso central (SNC), primero en la corteza cerebral, luego en bulbo raquídeo y finalmente en la médula espinal. Avivan la actividad mental, el rendimiento físico y la asociación de --- ideas, quitan la fatiga y la somnolencia.

Estos efectos pueden producirse con 85 a 250 mg. de cafeína o la cantidad contenida en una a tres tazas de café. Son estimulantes del músculo cardíaco y relajan el músculo liso, son estimulantes respiratorios, actúan sobre el centro bulbar respectivo, aumentando frecuencia, amplitud y volumen por minuto respiratorio y como consecuencia una disminución de dióxido de carbono del aire alveolar.

Por la vía oral o parenteral provocan un aumento prolongado de la secreción gástrica, son irritantes para la mucosa gástrica y pueden provocar náuseas y vómitos, lo que limita su administración por vía oral.

En este sentido, la teofilina se libera fácilmente en el estómago cuando se administra, es la más irritante y es capaz de provocar erosiones hemorrágicas.

Las xantinas son diuréticos aumentando el volumen urinario, así como la excreción de iones de sodio (saluresis), -- disminuyen la reabsorción tubular del sodio. Aumentan la capacidad funcional del músculo estriado, haciendo más potente la contracción, mientras la fatiga disminuye, aumentan el metabolismo basal. Producen fácilmente tolerancia, aumentando la dosis al cabo de pocos días.

Las xantinas se absorben por todas las vías que se administran (bucal, rectal, intramuscular), siendo los derivados solubles los que se absorben mejor, hay que señalar que las xantinas liberadas a nivel del estómago se comportan como bases sumamente débiles, la cafeína y la teofilina se encuentran parcialmente ionizadas en el jugo gástrico e intestinal absorbiéndose también parcialmente.

Una vez absorbidas, las xantinas se distribuyen por ---

todos los órganos, sufriendo luego una biotransformación sobre todo en el hígado, se desmetilan y oxidan parcialmente, transformándose en monometilxantinas y ácidos mono y dimetilúricos; no se produce la desmetilación total, de manera que no se produce ácido úrico.

Todos los metabolitos son excretados por el riñón, así como una pequeña cantidad de xantinas no transformadas.

La intoxicación aguda con alcaloides es extremadamente rara y no se han descrito intoxicaciones mortales con cafeína, ya que se necesitarían dosis mayores de 10 gramos, la cafeína y las bebidas que la contienen son capaces de crear -- cierta dependencia, no adición, sino que se considera como -- una hábitud sin mucha trascendencia (15,16,17).

3.14.-METODOS EMPLEADOS EN LA MEDICION DE LA CONCENTRACION DE TEOBROMINA, TEOPILINA Y CAFEINA.

El método del A.O.A.C. (Official Methods Of Analysis) - Nº 15.019 de Bailey-Andrew se basa en la determinación del nitrógeno total de la muestra, este método aunque es el oficial, solo determina la cafeína, presentando además el inconveniente de que el nitrógeno determinado puede provenir de las proteínas y de otras sustancias nitrogenadas no proteicas, que se encuentren presentes en el grano de café.

Otro método del A.O.A.C. es el cromatográfico-espectrofotométrico Nº 15.020, que consiste en la separación del compuesto por medio de columnas cromatográficas (una ácida con ácido sulfúrico y Celite 545 y una básica con hidróxido de potasio y Celite 545). Se pasa una muestra de café, primero

por la columna básica y luego por la columna ácida, se colecta la muestra en un matraz volumétrico que se afora con agua y luego se lee en un espectrofotometro a 276 nm contra un estandar de cafeína. Este método basado en la absorción de luz ultravioleta por los alcaloides es muy complicado, tiene muchas manipulaciones debido a la preparación de las columnas y a la separación y obtención de las muestras en las columnas.

Existen otras técnicas para el análisis de estos alcaloides en diversos productos alimenticios y que utilizan el método de Kjeldahl, espectrofotometría ultravioleta, cromatografía en capa fina, cromatografía de gas, cromatografía en papel, titulaciones potenciométricas, cartucho sep-pak, etc. Estos métodos requieren tratamientos largos, lentos y a veces complicados o bien no permiten la separación y cuantificación de los tres alcaloides al mismo tiempo.

La utilización de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para realizar este trabajo, se escogió de entre las demás técnicas por: su alta resolución, rapidez, sensibilidad y operación automática. Y al mismo tiempo detectar, separar y cuantificar los tres alcaloides que se analizan en el café (18,19,20).

4.-CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

La cromatografía es un término aplicado a una amplia variedad de técnicas de separación de una sustancia, donde se emplea una fase móvil que puede ser un gas o un líquido y -- una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

Los componentes de una mezcla se transportan a través de la fase estacionaria por medio de la fase móvil que fluye, las separaciones se basan en las diferentes velocidades de migración de los componentes de la muestra.

Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil, capaces de interaccionar con la fase estacionaria, ya sea disolviéndose, adsorbiéndose o reaccionando químicamente con ella, como consecuencia durante la separación los componentes se distribuyen en esta fase.

El descubrimiento de la cromatografía se acredita a Mijail Tswet, cuando en 1903 describe un trabajo donde utiliza una columna de yeso para separar pigmentos de hojas verdes. La palabra cromatografía proviene de dos raíces griegas ---- "CHROMA"= color y "GRAPHOS"= escritura, este término fue --- puesto por el mismo Tswet para describir el color que se mueve en la columna.

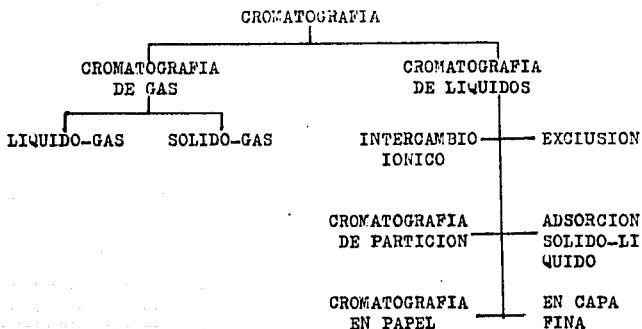
A partir de los años de 1960 se desarrolló rápidamente la cromatografía de líquidos en columna, como una técnica -- complementaria a la cromatografía de gas.

La cromatografía de adsorción, partición, de intercambio iónico, de capa fina y cromatografía en papel, son algunos ejemplos de la cromatografía de líquidos.

En el cuadro N^o1 se ve la clasificación de los tipos de

cromatografía existentes.

CUADRO N° 1.-LAS RAMAS DE LA CROMATOGRAFIA.



4.1.-CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

El término de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se define como la técnica de cromatografía de líquidos que emplea en su operación alta presión en la fase móvil, también se le puede llamar cromatografía de líquidos de alta velocidad o cromatografía de líquidos moderna.

La HPLC se basa en los mismos principios de la cromatografía de gas.

La HPLC tiene muchas ventajas sobre la cromatografía de gas, algunas de ellas son: no está limitada por la estabilidad térmica y volatilidad de las muestras, es ideal para la separación de especies iónicas, productos lábiles, compuestos estables y/o de peso molecular alto, tiene una gran va--

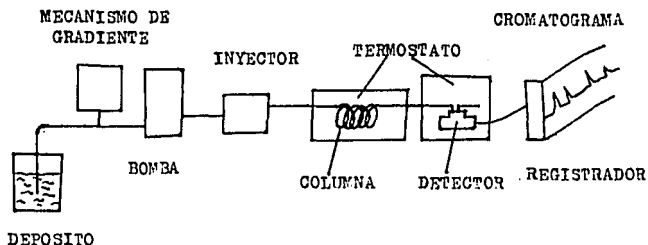
riedad de empaques que pueden ser utilizados como fase estacionaria en la columna, la separación de los componentes de una muestra se puede llevar a cabo a temperaturas bajas, sus fases cromatográficas entran en interacción con las moléculas de la muestra, y las muestras se pueden recuperar.

La HPLC, emplea columnas reusables, que pueden ser usadas en diferentes tipos de muestra, la inyección se lleva a cabo fácil y rápidamente usando una jeringa de inyección o una valvula de muestra, el flujo de solventes se produce por bombas de alta presión, la detección y cuantificación se lleva a cabo en detectores continuos de varios tipos y los resultados son registrados automaticamente de la separación de los componentes de la muestra.

4.1.1.-APARATOS PARA LA HPLC.

Las partes fundamentales de un cromatógrafo básico de líquidos se muestran en la figura N° 3.

Figura N° 3.-ESQUEMA DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS.



Cada uno de estos componentes funciona con características propias de la capacidad de cada instrumento particular.

4.1.2.-GRADIENTE DE ELUCION.

El gradiente de elución se define como el incremento de fuerza de la fase móvil, durante un análisis cromatográfico.

Dos solventes miscibles por separado o juntos, se unen provenientes de dos bombas de alta presión. En la práctica - el gradiente se puede formar antes o después de las bombas.

Con el manejo de el gradiente de elución se puede lograr que:

- a) El tiempo de análisis se reduzca significativamente.
- b) La resolución por unidad de tiempo para una mezcla - se incremente.
- c) La forma del pico se mejore.
- d) La sensibilidad efectiva se incremente cuando hay poca variación en la forma del pico.

4.1.3.-FASE MOVIL.

En la cromatografía de líquidos la composición del solvente o fase móvil es una de las variables que ejercen la separación, hay una amplia variedad de solventes usados en todas las formas de cromatografía de líquidos de alta resolución.

La fase móvil debe:

- a) Ser pura; no contaminada.

- b) Que no reaccione con el empaque
- c) Ser compatible con el detector
- d) Disolverse en la muestra.
- e) Tener baja viscosidad
- f) Permitir la recuperación fácil de la muestra, si se desea.
- g) Obtenerse comercialmente a un precio razonable.

En general, el solvente se desecha después de su uso,-- porque su procedimiento de limpieza es costoso y tedioso. De los requerimientos arriba mencionados los cuatro primeros -- son los más importantes.

4.1.4.-BOMBAS.

A la fase móvil en la HPLC, líquida se le da propulsión a través de la columna con bombas que pueden ser de dos tipos, las de presión constante y las de desplazamiento constante. Las de desplazamiento constante se dividen en bombas recíprocantes y de jeringa.

4.1.5.-INYECTORES.

La muestra puede ser introducida en la cabeza de la columna sin afectar el empaque.

Hay dos modos generales de inyección:

- a) Flujo suspendido y b) Solvente fluido.

Hay tres tipos básicos de inyectores:

- a) Flujo Suspendido.-El flujo es suspendido, y la inyección se hace a presión atmosférica en un sistema cerrado y -

posteriormente el flujo es reiniciado.

b) Septum.-Estos inyectores son usados a presiones de 60 a 70 atmósferas, desafortunadamente no son compatibles -- con todos los solventes de cromatografía de líquidos.

c) Valvula de llave.-Se emplean para inyecciones con -- volúmenes más grandes de 10 microlitros y comúnmente se usa en sistemas automáticos.

4.1.6.-COLUMNAS.

El éxito o fracaso de un análisis depende de la selección de la columna y las buenas condiciones de operación.

Las columnas se dividen en dos grupos:

a) Analíticas.-De diámetro interno de dos a seis milímetros, el largo depende del tipo de empaque. Para empaques de películas, el largo usual es de 50 a 100 centímetros. Para empaque de micropartículas porosas el más común es de 10 a 30 centímetros.

b) Preparativas.-Generalmente tiene diámetro de seis milímetros y de longitud de 25 a 100 centímetros.

Las columnas invariablemente son de acero inoxidable, son operadas a temperatura ambiente o a temperaturas altas. En intercambio iónico y cromatografía de exclusión, el empaque depende de la forma de cromatografía de líquidos de alta resolución que vaya a ser realizado (cromatografía sólido-líquido, de intercambio iónico o exclusión estérica).

4.1.7.-COLUMNAS REUSABLES.

En contraste con la cromatografía de líquidos clásica, las columnas en la cromatografía de líquidos de alta resolución son reusables, pueden llevarse a cabo muchos análisis en una columna antes de que sea reemplazada. Sin embargo, -- las columnas se degradan debido al tipo de muestra inyectada, o a la limpieza y tipo de solventes empleados.

4.1.8.-DETECTORES.

Se requiere de un detector para indicar la presencia y medir la cantidad de los componentes de una muestra, que salen de la columna.

Los buenos detectores tienen alta sensibilidad, bajo ruido, un rango de respuesta lineal amplio y respuesta para todo tipo de compuestos.

Los detectores se dividen en destructivos y no destructivos, los no destructivos permiten usar la muestra en investigaciones posteriores, entre estos están:

a) De absorción de luz ultravioleta y visible.--Estos -- son muy precisos y sensibles debido a que existen muchos disolventes transparentes en estas longitudes de onda.

b) De índice de refracción.--Estos detectan la presencia de la muestra por un cambio en el índice de refracción.

Otros detectores que también se emplean son: Fluorómetros de calor, ionización a la flama, electroquímicos, etc.

4.1.9.-SENSIBILIDAD:

Los detectores de absorción ultravioleta comúnmente empleados en cromatografía de líquidos pueden detectar nanogramos (10^9) de una amplia variedad de materiales. Los detectores electroquímicos y de fluorescencia pueden detectar cantidades en la región de picogramos (10^{12}). Los detectores que también se pueden emplear en cromatografía de líquidos son: espectrómetro de masas, índice de refracción, radiómetros, - etc.

4.1.10.-MANEJO DE DATOS.

Los resultados de la separación cromatografica generalmente se muestran en una carta, de donde se obtiene el volumen o el tiempo de retención, esto se puede usar si las condiciones se controlan apropiadamente, para identificar la cantidad de un componente. El área bajo el pico y su altura son proporcionales a la concentración y pueden ser usados para obtener los resultados cuantitativos.

4.1.11.-VELOCIDAD.

Los tiempos de análisis de menos de una hora son comunes, muchos análisis se realizan en 15 o 30 minutos. De hecho para análisis no complicados generalmente el tiempo de análisis es de menos de cinco minutos.

4.1.12.-RESOLUCION.

En contraste a la cromatografía de gas, la cromatografía de líquidos tiene dos fases cuando se presentan las interacciones selectivas.

En la cromatografía de gas, el flujo de gas tiene poca interacción con los solutos; la separación primero se lleva a cabo solo en la fase estacionaria.

La capacidad del soluto para interactuar selectivamente con la fase estacionaria y móvil en cromatografía de líquidos produce parámetros adicionales para llevar a cabo una separación.

4.1.13.-VENTAJAS DE LA HPLC.

La cromatografía de líquidos de alta resolución puede ser considerada complementaria a la cromatografía de gas. En muchos casos las dos técnicas se usan para efectuar la misma separación. En la cromatografía de gas es necesaria la formación de derivados, en cambio en la cromatografía de líquidos de alta resolución esto puede ser o no factible. Para los materiales que son termolábiles o no volátiles la cromatografía de líquidos de alta resolución es una selección lógica. La formación de derivados se está haciendo más común en la cromatografía de líquidos, para incrementar la sensibilidad del detector visible-ultravioleta.

La cromatografía de líquidos de alta resolución ofrece muchas ventajas sobre la cromatografía de líquidos tradicional como:

- a) Rapidez
- b) Resolución
- c) Sensibilidad; detector único
- d) Columnas reusables
- e) Ideal para grandes moléculas y especies no iónicas
- f) Fácil recuperación de la muestra.

4.1.14.-MODO DE SELECCION DE LA HPLC.

Como fue mencionado previamente, hay cuatro formas básicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), es importante tener una referencia para seleccionar la forma conveniente para ver la capacidad de la separación efectuada. En estos casos el análisis debe hacerse para decidir cuál es la mejor forma para obtener la información deseada.

En la tabla N° 1 se muestra una forma sistemática de aprovechamiento para la selección de la cromatografía de líquidos. Esta información combinada con aquella obtenida de otras fuentes, permiten el análisis para decidir cuál forma es la más probable de llevar a cabo en la separación deseada, esto puede ser el caso de que fuera una muestra desconocida o raramente encontrada. La información para solubilidad, grupos funcionales presentes, variación del peso molecular es muchas veces obtenida de información previa.

El suministro de datos de las muestras tales como RMN, RI, UV y espectrofotometría de masas se pueden usar para guiarse en el análisis para la selección apropiada de la forma de la cromatografía de líquidos.

Refiriéndose nuevamente a la tabla N° 1 rápidamente podemos ver que cuando el peso molecular es más grande de 2000 se usa cromatografía de exclusión. El solvente que se usa es agua si la muestra es soluble en agua; si es soluble en solventes orgánicos, estos se usan como la fase móvil; el empaque es Sephadex (dextranos), Bondagel (sílica) serie E para fases móviles acuosas y Styragel (poliestireno-divinilbenceno) o Gel Micropak TSK (poliestireno-divinilbenceno) para fase móvil orgánica.

Si el peso molecular es abajo de 2000, primero se determina si la muestra es soluble o poco soluble en agua, y entonces puede usarse cromatografía de partición fase reversa o intercambio iónico. Si la solubilidad se realiza por la adición de ácidos o bases o si el pH de la solución varía por más de dos unidades de pH de 7, la técnica de selección es la de intercambio iónico.

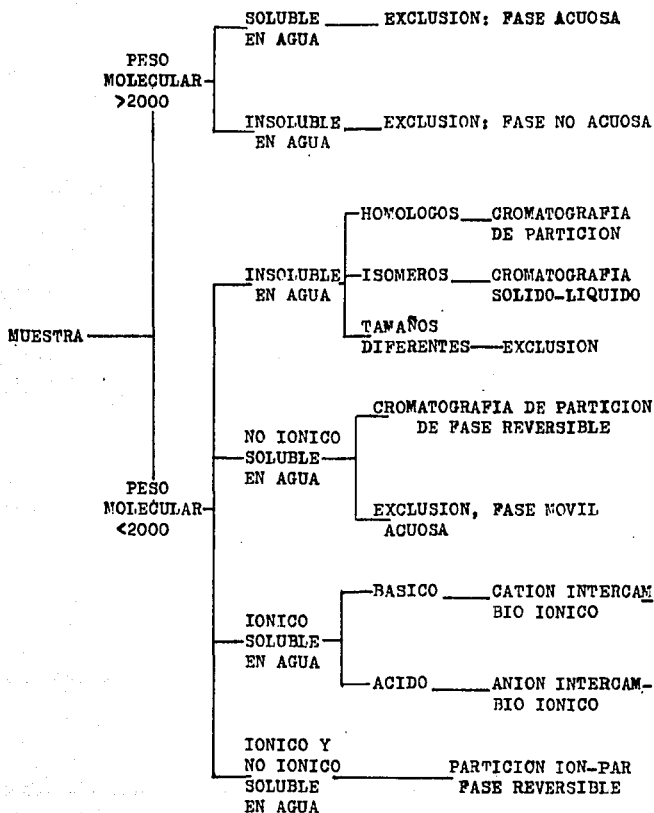
Si la solubilidad no se afecta por ácidos o bases y la solución acuosa es esencialmente neutra, la forma a seleccionar es la cromatografía de partición de fase reversa. También se puede probar la técnica de exclusión cuando se usan tamaños pequeños de poros de la fase estacionaria y fase acuosa.

Si la muestra es insoluble en agua, la selección apropiada es la cromatografía sólido-líquido o de partición.

Para el trabajo de rutina es conveniente el uso normal de cromatografía de partición fase-ligada, puesto que estas columnas requieren poco cuidado en su uso.

Para muestras isoméricas puede probarse cromatografía sólido-líquido como la forma más útil; si hay diferentes tamaños en la muestra, la exclusión estérica con fases móviles orgánicas también es útil.

TABLA Nº 1.-GUIA PARA LA FORMA DE SELECCION DE LA HPLC.



4.1.15.-SELECCION DE LA COLUMNA.

La selección de las columnas debe hacerse lo más eficiente posible (tabla N° 2), en todos los casos se recomienda el empaque con micropartículas porque en ellos es grande la eficiencia y capacidad de muestra (21).

TABLA N°2

INVENTARIO RECOMENDADO DE COLUMNAS PARA LA HPLC.

FORMA	EMPAQUE RECOMENDADO	LONGITUD
CSL	10 SILICA GEL	25 - 30 cm.
PARTICION		
a) FASE NORMAL	10 ALQUILONITRILO	25 - 30 cm.
	10 ALQUILAMINA	25 - 30 cm.
b) FASE REVERSIBLE	10 C ₁₈ (POLIMERICICO)	25 - 30 cm.
	10 C ₁₈ (MONOMERICICO)	25 - 30 cm.
	10 FENIL	25 - 30 cm.
INTERCAMBIO IONICO		
	10 INTERCAMBIO CATIONICO	
	a) SILICA GEL	25 - 30 cm.
	b) BASE POLIESTIRENO	25 - 30 cm.
	10 INTERCAMBIO ANIONICO	
	a) SILICA GEL	25 - 30 cm.
	b) BASE POLIESTIRENO	25 - 30 cm.
EXCLUSION	EMPAQUE RECOMENDADO COLUMNAS DE SERIE A CONTENIENDO LA VARIACION DEL TAMAÑO DE PORO DE MICRO-PAK TSK	25 - 30 cm.

5.-MATERIAL Y REACTIVOS.

5.1.-MATERIAL.

5.1.1.-CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

Se utilizó un aparato de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) Varian Modelo 5000, con un registrador de datos Vista 401 y un detector de luz ultravioleta de rango de 200 a 900 nm.

5.1.2.-COLUMNA.

La columna que se usó fue una de fase reversa Micro-Pak MCH-10 de 30 cm de largo por 4 mm de diámetro, empacada con octadecilsilanos.

5.1.3.-MUESTRAS DE CAFE.

Las muestras de café utilizadas para la realización de este trabajo se adquirieron en tiendas de autoservicio y --- tiendas de mercados de la ciudad de México. La muestra cruda de café se obtuvo de una planta cultivada en la ciudad de --- Cuernavaca.

Estas muestras fueron:

- Café en grano crudo
- Café en grano tostado
- Café en grano tostado Internacional
- Café en grano tostado con azúcar
- Café en grano tostado con azúcar Legal
- Café granulado soluble Internacional

- Café soluble Oro
- Café granulado soluble Nescafé
- Café soluble Diplomat (Nescafé)
- Café soluble Ristreto (Nescafé)
- Café soluble Decaf.

Las muestras no recibieron ningún tratamiento previamente porque venían molidas y/o en forma granulada, a excepción de la muestra de café cruda, que se molio en un molino Thomas Welhey en malla 40.

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y en recipientes cerrados.

5.2.-REACTIVOS.

5.2.1.-DISOLVENTES.

Los disolventes que se emplearon para formar la fase móvil de la columna fueron;

Agua Desmineralizada

Acido Acético de grado análitico de laboratorios Sigma

Metanol de grado análitico de laboratorios Sigma.

5.2.2.-ESTANDAR INTERNO.

La substancia que se utilizó como estandar interno para la realización de este trabajo fue la Cumarina.

6.-PARTE EXPERIMENTAL.

6.1.-CONDICIONES DEL APARATO.

Antes de empezar a trabajar con las muestras de café comerciales, se hicieron pruebas de la mezcla de disolventes de la fase móvil, velocidad de flujo y longitud de onda, que sirvieran para establecer las condiciones en las que trabajaría el aparato.

6.1.1.-FASE MOVIL.

Con base en el método oficial del A.O.A.C. y otros trabajos, se probaron las siguientes mezclas de disolventes para la fase móvil:

- Agua:Acetonitrilo (80:20)
- Agua-Ac.Acético(1 %):Metanol (80:20)
- Agua-Ac.Acético(1 %):Metanol (70:30).

6.1.2.-VELOCIDAD DE FLUJO Y LONGITUD DE ONDA.

Se varió la velocidad de flujo de la fase móvil en la columna desde 0,5 a 2 ml/min. y de igual forma la longitud de onda se fue variando de 274 a 290 nm.

6.2.-TIEMPO DE RETENCION.

Para determinar el tiempo de retención, así como el área bajo la curva para la teobromina, teofilina y cafeína, se tomaron sustancias puras de grado analítico (R.A.) de los laboratorios Sigma (San Luis Mo. USA).

Se hizo primero la determinación de los tiempos de re--

tención de cada uno de los alcaloides por separado y posteriormente, haciendo una mezcla de ellos, se observó que eran los siguientes:

- Teobromina: 5.8 ± 0.3 mín.
- Teofilina: 7.2 ± 0.5 mín.
- Caféina: 9.8 ± 0.5 mín.

Las figuras 4 y 5 muestran los cromatogramas obtenidos con los tiempos de retención de un estandar de alcaloides y de una muestra de café con su estandar interno respectivamente.

6.3.-ESTANDAR INTERNO.

El estandar interno es una sustancia seleccionada, con estructura parecida con los compuestos a investigar, que no se encuentra de manera natural en el material de estudio.

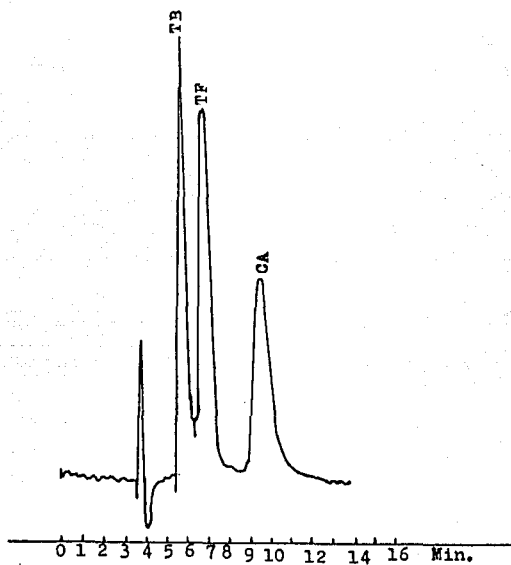
El estandar interno debe ser agregado a la solución que contiene el o los compuestos que se desean determinar, preferentemente debe aparecer en una posición no muy alejada de los compuestos de la muestra que se analiza.

Por medio del estandar interno se corrigen las variaciones de color, de rendimiento, velocidad de flujo y probablemente otros parametros de operación de la columna y del sistema analítico que podría afectar el area del pico.

Con el objeto de determinar el compuesto a emplear como estandar interno, se hicieron pruebas con sustancias que tuvieran estructuras parecidas a los alcaloides que se estaban valorando y cuyas características fueran parecidas en el comportamiento cuando se trabajan en el HPLC, pero que el ----

Figura N° 4

CROMATOGRAMA DE UN ESTANDAR DE ALCALOIDEOS DEL CAFE.

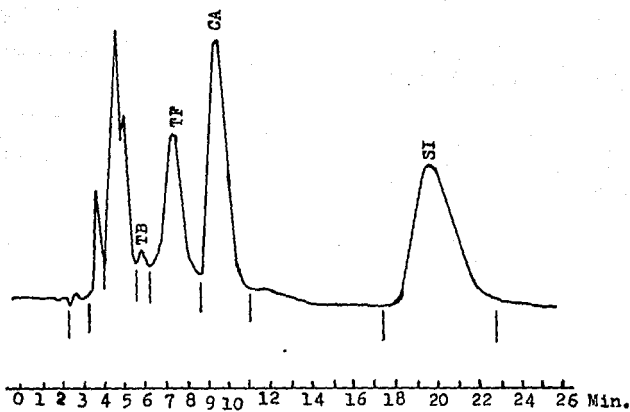


ALCALOIDE	TIEMPO DE RETENCION
TEOBROMINA	5.884 Min.
TEOFILINA	6.940 Min.
CAFEINA	9.695 Min.

Figura N° 5

CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE CAFE CON SU ESTANDAR

INTERNO



ALCALOIDE

TIEMPO DE RETENCION

TEOBROMINA(TB)

5.809 Min.

TEOFILINA(TF)

7.500 Min.

CAFEINA(CA)

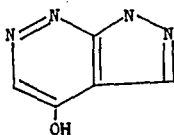
9.519 Min.

ESTANDAR INTERNO

19.905 Min.

tiempo de retención de estas sustancias no interfiriera con el tiempo de retención de los alcaloides y que tuvieran una área bajo la curva bien definida.

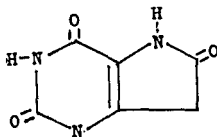
Las sustancias que se probaron para definir el estándar interno fueron las siguientes:



Allopurinol

Nombre químico: 4-hidroxipirazolon
(3,4-d), pirimidina.

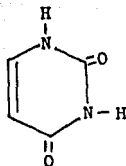
Peso molecular: 136.11



Acido Urico

Nombre químico: (7,9-dihidro-1,H-purina-
2,6,8 (3H))-triona.

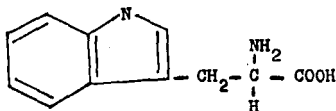
Peso molecular: 168.11



Uracilo

Nombre químico: 2,4 (1H,3H)-pirimidin-diona.

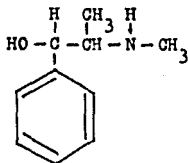
Peso molecular: 112.09



Triptofano

Nombre químico: Acido 1- α -aminoindole-3-propionico.

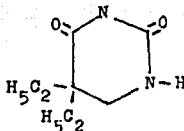
Peso molecular: 204.22



Efedrina

Nombre químico: (1-(metilamino)etil) bencenometanol.

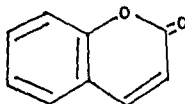
Peso molecular: 165.23



Phenobarbital

Nombre químico: 5,5-diethyl-2,4,6
(1H,3H,5H)pirimidinatriona.

Peso molecular: 184.19



Cumarina

Nombre químico: 2H-1-benzopiran-2-ona.

Peso molecular: 146.14

6.4.-CURVA ESTANDAR.

Se hizo la preparación de una curva estandar con la mezcla de los tres alcaloides, con el objeto de tener una referencia para cuando se hicieran las determinaciones de los alcaloides en las muestras de café.

Se preparó una solución a una concentración de 100 --- mcg/ml. de cada uno de los tres alcaloides y de esta solu---

ción se hicieron diluciones para tener concentraciones de: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 mcg/ml, se filtraron por membrana Millipore Tipo HVL P (para soluciones orgánicas y acuosas) con tamaño de poro de 0.47 mm y se inyectaron al HPLC, con los datos obtenidos de las concentraciones y áreas para cada uno de los alcaloides, se construyeron las gráficas de la curva estándar.

6.5.-METODO DE EXTRACCION.

Se procedió a elaborar un método de extracción de los alcaloides que fuera adecuado para las muestras de café.

Se probó primero el método para café tostado del ----- A.O.A.C. N° 15.019, modificándose a cantidades más pequeñas, pues el método de cuantificación por HPLC es mucho más sensible, también se probaron las condiciones de extracción propuestas en otros trabajos, en los cuales determinan alguno de los alcaloides en café o en otros productos alimenticios tales como chocolate, té, cola, etc.

Independientemente de la cantidad de muestra usada para la determinación, se tenían dos factores que eran temperatura y tiempo de extracción, los cuales había que establecer perfectamente para que la extracción fuera óptima, ya que la solubilidad de los tres alcaloides no es la misma.

La temperatura a la cuál se hizo el % de recuperación de los alcaloides, se determinó en base al comportamiento de una mezcla estándar de los tres alcaloides a una concentración de 10 mcg/ml, teniendo constante el tiempo del % de recuperación de 15 minutos y variando la temperatura de 20, 30, 40, 60, 80 y ebullición (93°C).

En la gráfica N° 1 se presentan los resultados obtenidos para teobromina, como se puede ver en la gráfica el % de recuperación máximo se tuvo a la temperatura de ebullición (93 °C).

Para teofilina se presentan los resultados en la gráfica N° 2 y como podemos ver también el % de recuperación máximo vuelve a ser la temperatura de ebullición (93 °C).

Los resultados para cafeína se dan en la gráfica N° 3 y se repite igual que para los alcaloides anteriores, nuevamente el % de recuperación máximo es la temperatura de ebullición (93 °C).

De acuerdo a las gráficas anteriores para teobromina, teofilina y cafeína se puede concluir que la temperatura donde hay mayor eficiencia en el % de recuperación para los tres alcaloides es la temperatura de ebullición (93 °C).

Por esta razón se tomó esta temperatura como parte del método de extracción de los alcaloides de las muestras de café estudiadas.

Por otra parte también se determinó el tiempo necesario en que el % de recuperación de los alcaloides fuera más eficiente, observando el comportamiento de la misma mezcla estando a una temperatura de ebullición (93 °C) y variando el tiempo de 0, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos.

En la gráfica N° 4 se dan los resultados para teobromina y como se puede ver, se tiene un lapso de tiempo en que el % de recuperación se mantiene constante y este es de 20 a 45 minutos.

Para teofilina los resultados los podemos ver en la grá

fica N° 5, en la cual se observa que se tienen dos puntos máximos del % de recuperación y estos son: uno a los 20 minutos y otro a los 60 minutos.

Con respecto a la cafeína los resultados los podemos observar en la gráfica N° 6 y podemos ver que el tiempo ideal de el % de recuperación a la temperatura de ebullición es a los 30 minutos.

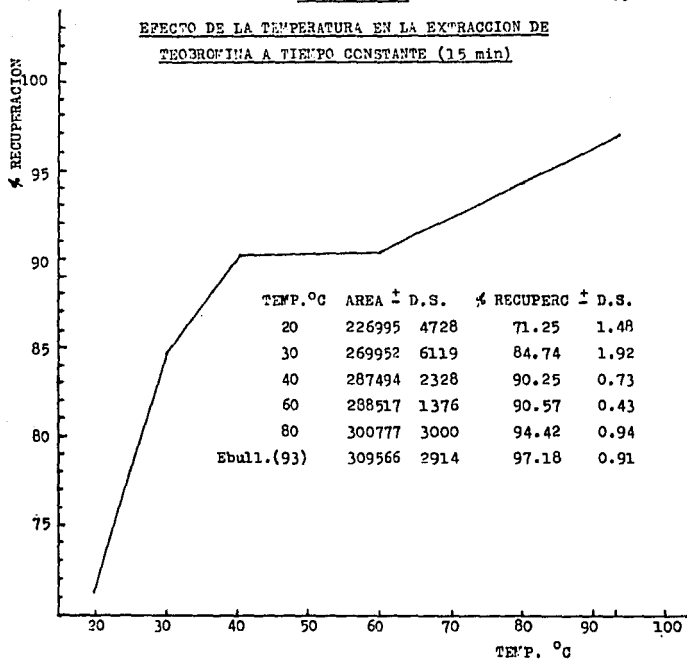
En estas gráficas, se observó que la mayor eficiencia en el % de recuperación de los alcaloides a la temperatura de ebullición es en el rango de 20 a 45 minutos,

Se decidió que el tiempo óptimo del % de recuperación de los alcaloides sería a los 25 minutos, ya que en ese momento se tendría un valor promedio para teofilina y cafeína y en el caso de la teobromina su valor fue constante desde los 20 minutos.

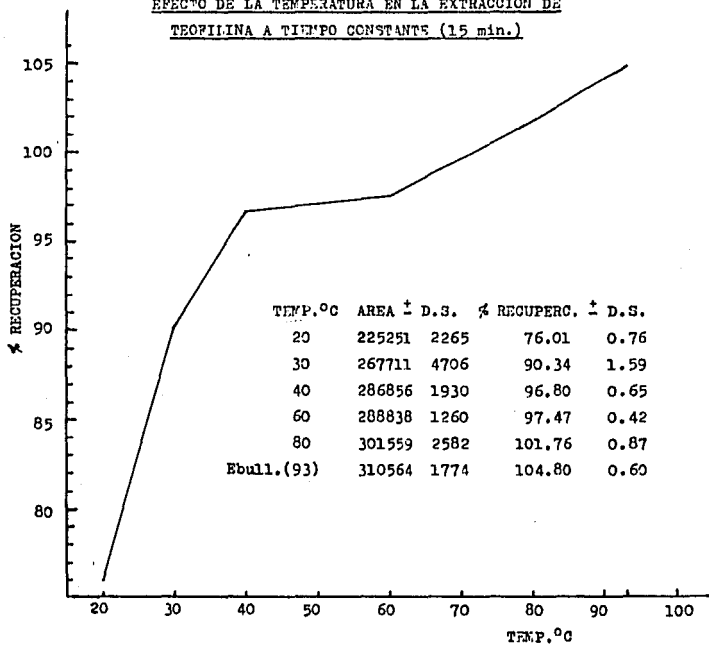
También se utilizó el procedimiento de digestión propuesto por otros autores empleando Oxido de Magnesio y se vio que los valores no mostraban diferencias significativas que cuando se hacia la extracción con agua caliente.

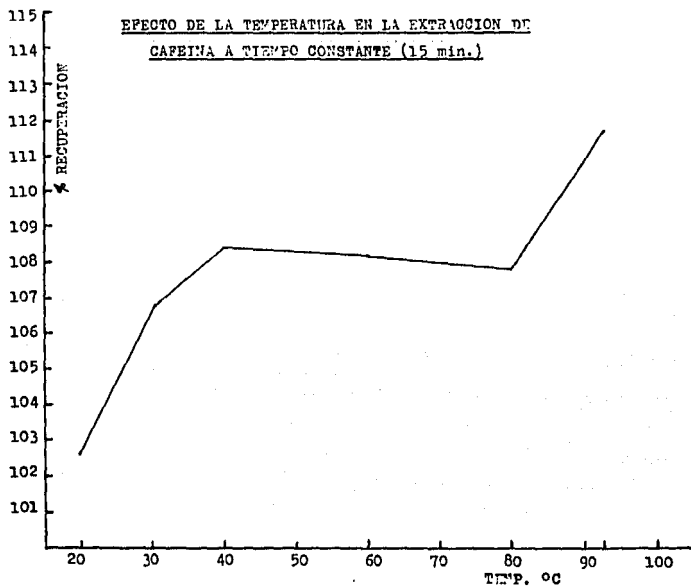
Basándonos en otro trabajo, se comparó el procedimiento que utilizan los cartuchos Sep-pak C₁₈ para purificación de la muestra y el empleo de membranas Millipore tipo HVLP (para soluciones orgánicas y acuosas) con tamaño de poro de 0.47 μ m. se encontró que filtrando por el cartucho Sep-pak C₁₈ se perdía la mayor parte de teobromina y parte de la teofilina. Como en este trabajo había interés en conocer el contenido de estos dos alcaloides, además de la cafeína, se decidió emplear únicamente membranas Millipore (22,23).

EPECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXTRACCION DE
TEOBROMINA A TIEMPO CCNSTANTE (15 min)



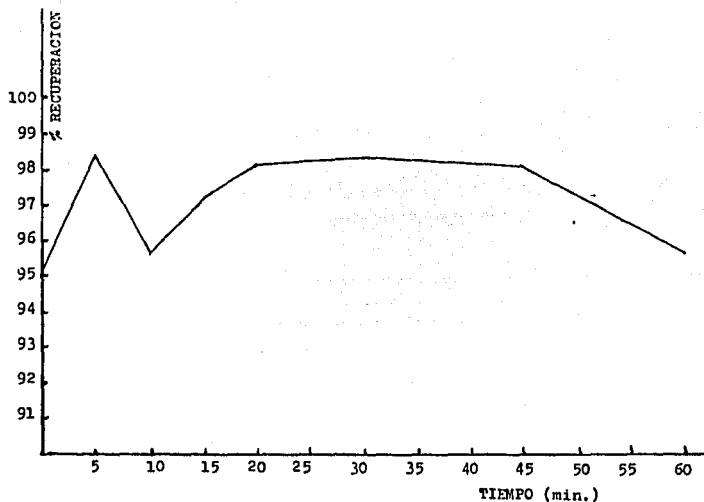
EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXTRACCION DE
TEOFILINA A TIEMPO CONSTANTE (15 min.)





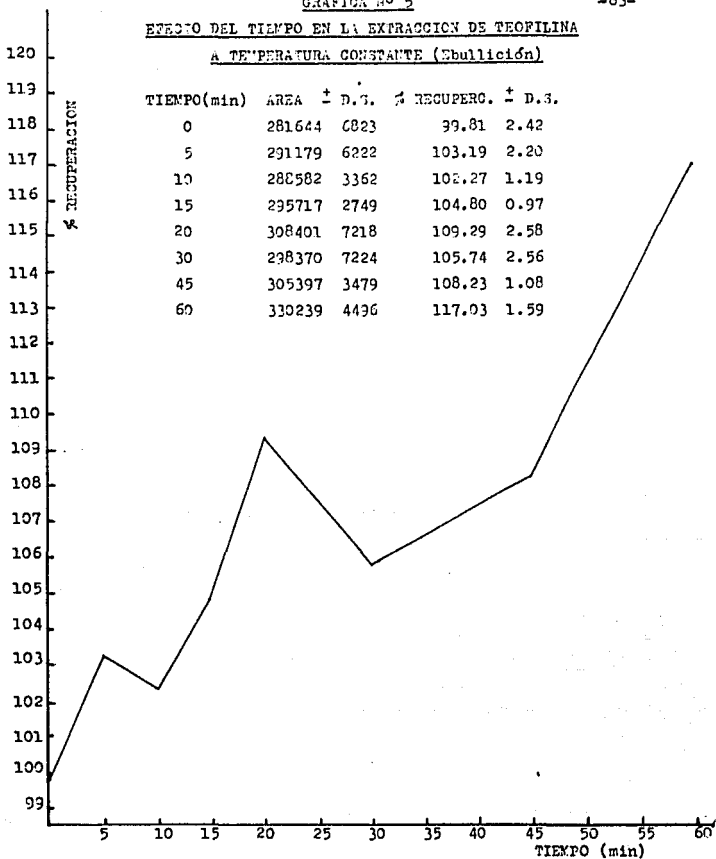
TEMP. °C	AREA † D.S.	% RECUPERC. † D.S.
20	279640 6872	102.68 2.52
30	290616 6385	106.71 2.34
40	295348 3695	108.44 1.36
60	294641 2281	108.18 0.84
80	293744 3794	107.85 1.39
Ebull.(93)	304419 5182	111.77 1.90

EPECTO DEL TIEMPO EN LA EXTRACCION DE
TROBONINA A TEMPERATURA CONSTANTE (Ebullicion)

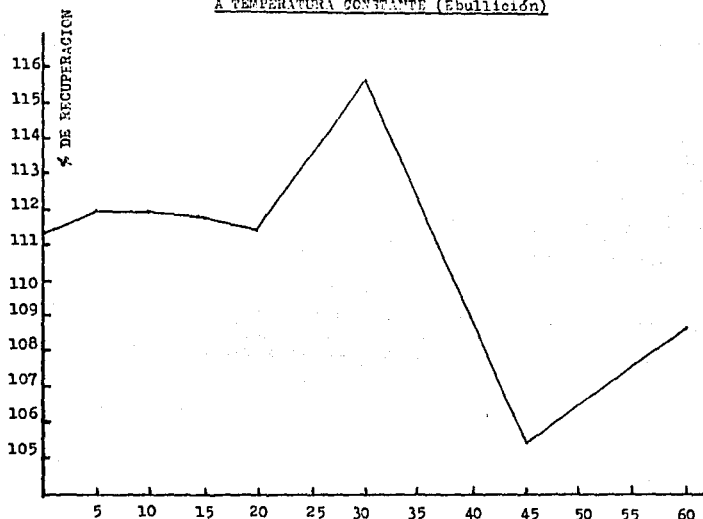


TIEMPO	AREA \pm D.S.	% RECUPERC. \pm D.S.
0	279422 2877	95.09 0.98
5	290604 5225	98.90 1.78
10	281326 1725	95.74 0.59
15	285557 1946	97.18 0.66'
20	288480 2678	98.17 0.91
30	288974 5313	98.34 1.81
45	288273 1688	98.10 0.57
60	281279 2865	95.72 0.97

EFECCO DEL TIEMPO EN LA EXTRACCION DE TEOPILINA
A TEMPERATURA CONSTANTE (Ebullición)



EFFECTO DEL TIEMPO EN LA EXTRACCION DE CASEINA
A TEMPERATURA CONSTANTE (Ebullición)



TIEMPO(min.)	AREA \pm D.S.	% RECUPERC. \pm D.S.	TIEMPO (min)
0	273012 4116	111.33 1.68	
5	274496 7523	111.94 3.07	
10	274532 3714	111.95 1.51	
15	274091 1079	111.77 0.44	
20	273298 1727	111.45 0.70	
30	283547 2037	115.63 0.83	
45	258670 5681	105.48 2.32	
60	266773 5422	108.74 2.21	

6.6.-CALCULOS PARA SACAR EL % DE RECUPERACION POR
EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA.

CUANDO NO SE UTILIZA ESTANDAR INTERNO.

Area de una conc. de
curva estandar extraido _____ 100 %
sin tratamiento.

Area de la misma conc.
de estandar después del _____ x
tratamiento.

x = % de recuperación.

CUANDO SE UTILIZA ESTANDAR INTERNO.

E.Q. = $\frac{\text{Area del estandar interno}}{\text{Area del alcaloide (conc. de trabajo)}}$

E.Q. = Equivalente de alcaloide.

% de Recuperación = Conc. de trabajo del alcaloide x

E.Q. x $\frac{\text{Area del alcaloide con tratamiento}}{\text{Area del estandar interno con tratamiento.}}$

Nota.- En este trabajo se encontró que el estandar interno
no se modificaba por efecto del tiempo y temperatura.

6.7.-CALCULOS PARA LA CONCENTRACION DE TEOBROMINA,
TEOFILINA Y CAFEINA EN MUESTRAS DE CAPE.

Con los cromatogramas obtenidos, se obtuvieron las ---
áreas de concentración correspondiente para cada alcaloide y
se compararon con la curva estandar, obteniendose una concen-
tración para cada compuesto.

Para la obtención de la concentración de cada alcaloide
en 100 gramos de muestra se usó la siguiente fórmula.

$$\text{mcg/100 g.} = \frac{\text{C} \times \text{A}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$\frac{\text{mcg/100 g.}}{1000} = \frac{\text{mg}}{100 \text{ g.}}$$

Donde;

C = Concentración

A = Aforo.

7.-RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1.-CONDICIONES ESTABLECIDAS EN EL INSTRUMENTO (HPLC)

Después de probar las mezclas propuestas para la fase móvil, se observó que la que dió mejores resultados en cuanto a separación de los compuestos y a resolución de los picos, fue la mezcla Agua-Ac.Acético(1 %):Metanol (70:30).

Con la fase móvil definida se determinó la velocidad de flujo a 0.8 ml/min, ya que con esta velocidad se definió una mejor separación de los picos.

La longitud de onda con la que se tuvo mejor resolución fue de 280 nm.

Ya con estos datos bien definidos, se estableció el programa de trabajo para el HPLC, quedando de la siguiente forma:

Columna: Micro-pak MCH-10 (30 cm x 4 mm)

Flujo: 0.8 ml/min.

Fase móvil: Agua-Ac.Acético(1 %):Metanol (70:30)

Detector: Ultravioleta

Longitud de onda: 280 nm.

De los compuestos que se probaron para usarlos como estandar interno, se vió que el Alopurinol, Acido úrico, Uracilo, Triptofano y el Fenobarbital, daban tiempos de retención muy parecidos a los compuestos de interés o salían muy cercanos a ellos, lo que hacía que se presentara interferencia. El único compuesto que tenía un tiempo de retención más alejado: de 19.1 a 19.3 minutos era la Cumarina, lo que resultaba lógico pues su estructura química no era tan parecida a la de las xantinas, por lo que se decidió usar este compuesto como estandar interno.

7.2.-CURVA ESTANDAR.

Para la obtención de la curva estandar, se graficó Concentración (mcg/ml) Vs. Area y se obtuvieron las gráficas -- N^os. 7, 8 y 9 de teobromina, teofilina y cafeína respectivamente.

En la tabla N^o 3 se ven los resultados de la curva estandar.

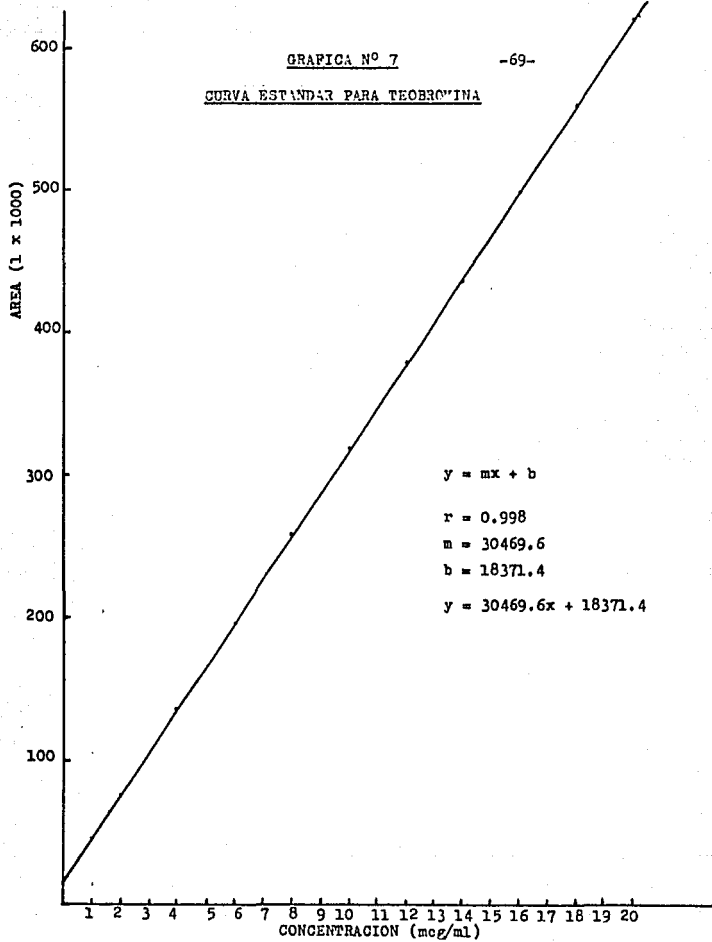
TABLA N^o 3
RESULTADOS DE LA CURVA ESTANDAR.

CONCENTRACION mcg/ml	AREA		
	TEOBROMINA	TEOFILINA	CAFEINA
1	45679	23287	31924
2	75999	53625	58638
4	136640	114303	112068
6	197280	174980	165494
8	257920	235657	218922
10	318561	296334	272350
12	379201	357011	325778
14	439841	417689	379205
16	500482	478366	432633
18	561122	539043	486061
20	621763	599720	539471

GRAFICA Nº 7

-69-

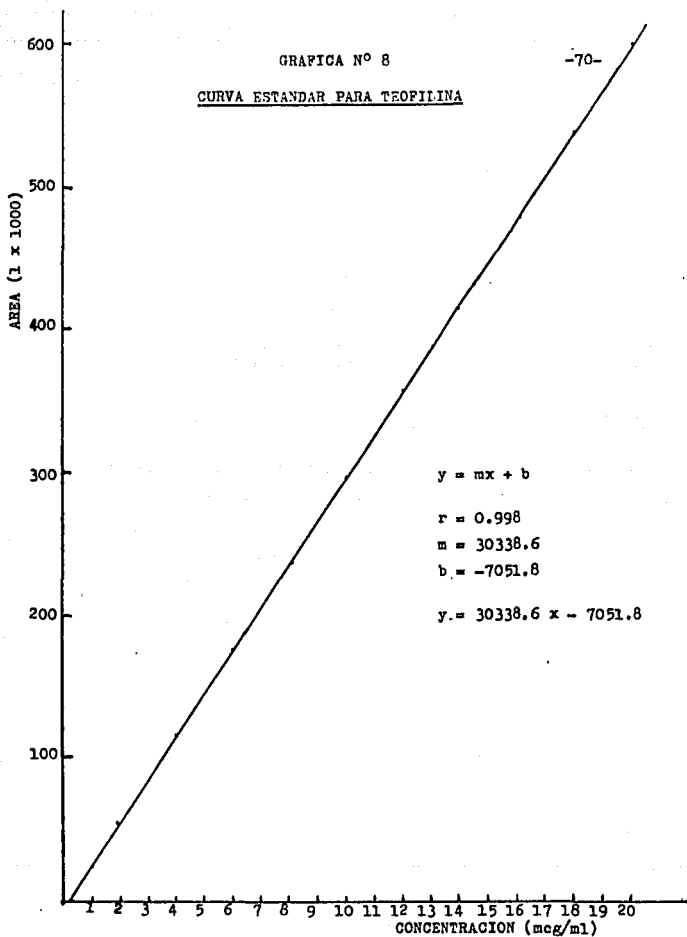
CURVA ESTANDAR PARA TEOBROMINA



GRAFICA N° 8

-70-

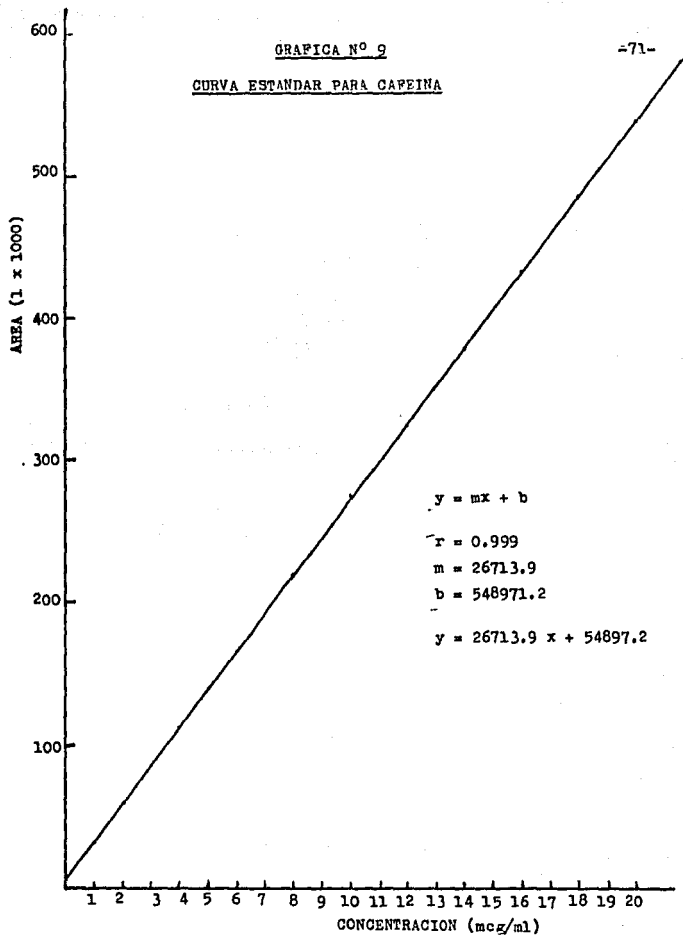
CURVA ESTANDAR PARA TEOPILINA



GRAPICA N° 9

=71-

CURVA ESTANDAR PARA CAPEINA



7.3.-METODO DE EXTRACCION.

A continuación se da el método de extracción que sirvió para la preparación de las muestras de café comerciales.

Se pesa una muestra de café de 100 a 300 mg, se coloca en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan piedras de ebullición, se agregan aproximadamente 50 ml de agua desmineralizada hirviendo y se sigue con la ebullición durante 25 minutos; al terminar este tiempo, se enfría el matraz inmediatamente al chorro de agua hasta temperatura ambiente,

Después se pasa el contenido a un matraz aforado de 100 ml, lavando el matraz original con agua desmineralizada, se agrega un mililitro de estándar interno de Cumarina de una concentración de 1000 mcg/ml y se afora con agua desmineralizada, se homogeniza perfectamente, se filtra en papel de filtración rápida (Watman N° 5) y de esta solución se toma un volumen de aproximadamente 10 ml, la cuál se filtra por membrana Millipore tipo HVLP (para soluciones orgánicas y acuosas) con tamaño de poro de 0.47 mm y de este filtrado se inyecta al aparato HPLC una alícuota de 10 microlitros.

El área obtenida para cada muestra problema se interpola en la curva estándar correspondiente para cada alcaloide, obteniendo la concentración de cada muestra.

7.4.-DISCUSION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CAFES
COMERCIALES EMPLEANDO EL METODO DESARROLLADO.

Los resultados de la concentración de teobromina, teofila y cafeína de las muestras de cafés comerciales se dan a continuación en la tabla N° 4.

TABLA No 4.

CONTENIDO DE LOS ALCALOIDES EN CAFES COMERCIALES.

MUESTRA	ALCALOIDES		
	mg/100 g. de muestra de café		
	TEOBROMINA	TEOFILINA	CAFEINA
- Café en grano crudo	Trazas	2064.1	1620.1
- Café en grano tostado	-----	388.0	1234.7
- Café en grano tostado Internacional	-----	720.5	1320.0
- Café en grano tostado con azúcar.	-----	199.9	862.9
- Café en grano tostado con azúcar Legal	-----	183.4	639.6
- Café granulado soluble Internacional	-----	-----	795.6
- Café soluble Oro	-----	418.4	2191.3
- Café granulado soluble Nescafé.	-----	956.7	2435.1
- Café soluble Diplomat (Nescafé)	-----	1706.3	2899.5
- Café soluble Ristreto (Nescafé)	-----	377.4	3306.3
- Café soluble Decaf	-----	1528.8	599.8

en la tabla anterior se observa, que la teobromina no se detectó en ninguna de las muestras analizadas de cafés -- tostados e instantáneos comerciales, solo se encontró muy pequeña cantidad en el grano crudo, que no se tomó en cuenta.

La teofilina que en el grano crudo se encuentra en mayor proporción que la cafeína, se ve disminuída notablemente en todos los cafés tostados, manteniéndose una relación inversa a la que se presenta en el café en grano crudo.

Unicamente en el café Ristreto se mostró una relación -- tan desproporcionada entre cafeína y teofilina de 1:8, podría pensarse que se le ha agregado cafeína o se emplearon para su preparación variedades de cafés con mayor contenido de cafeína. Un resultado contrario se observó en el café Decaf, -- donde se ve una relación inversa de cafeína y teofilina.

En los cafés tostados con azúcar se observa un efecto -- de simple dilución lógica por la adición de azúcar.

No se encontró ninguna explicación al resultado obtenido en la muestra de café granulado soluble Internacional donde no se detectó teofilina, aunque podría pensarse en una -- destrucción de este alcaloide por un tratamiento drástico de calentamiento.

En el café en grano tostado se podría decir que disminuye la cafeína aproximadamente 20 %, sin embargo esta diferencia podría ser mayor porque la humedad del café tostado es -- menor que el crudo.

En el análisis de resultados de los cafés tostados en -- grano, no se encontró diferencia para cafeína entre el café

Internacional comparándolo con uno a granel, sin embargo en el café Legal y el café a granel en grano con azúcar se encontró que el contenido de cafeína fué aproximadamente el 50 % del encontrado en los anteriores, esto es debido a la dilución con azúcar.

En cuanto a los cafés instantáneos, el café Oro y las cuatro presentaciones de la compañía Nestle, resultaron lógicas siendo el café Ristreto el de mayor contenido en cafeína y el café Decaf el de más bajo contenido.

8.-CONCLUSIONES.

- 1.-Se simplificó el método de extracción, no utilizando -- Oxido de Magnesio pues se obtuvieron resultados semejantes empleando el método de extracción con agua desmineralizada en ebullición durante 25 minutos.
- 2.-No se detectó teobromina en ninguna de las muestras tanto de cafés tostados como de cafés instantáneos, no obstante que en una prueba preliminar realizada con granos de cafés verdes se encontraron pequeñas cantidades de este alcaloide, junto con otros picos no identificados.
- 3.-Otro aspecto de importancia en este método, es el tiempo razonablemente pequeño en relación con los métodos -- hasta ahora presentados y que en una sola determinación se cuantifica a los tres alcaloides, y por los otros métodos solo se determina uno o dos de los tres alcaloides.
- 4.-Aunque los cromatógrafos de líquidos de alta resolución (HPLC) son muy costosos, cuando se tienen resultan muy convenientes pues se necesitan cantidades muy pequeñas de muestra, así como reactivos de fácil acceso.

9.-BIBLIOGRAFIA.

- 1.-INMECAFE. Datos Relevantes Del Café Mexicano. México, 1987.
- 2.-Sivetz, M. And Desrosier, N.W.: Coffe Technology. Avi Publishing Company. Westport, Connecticut. 1968. Cap. 1 y 2.
- 3.-Licona Franco R.: Algunos Datos Sobre la Caficultura Mexicana. Boletín Técnico Del Café, Epoca II, año 1, N° 2. Julio de 1985, Xalapa Ver. México.
- 4.-Goodman Gilman A. S., Goodman L. W. Rall y Murad F. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Séptima Edición Editorial Panamericana. México 1986. p. 551-552.
- 5.-Chavez Salomon F.: Estudio Analítico de la Pulpa de la Cereza de Café. Tesis UNAM México 1957.
- 6.-Rivera Fernandez A.: Principales Variedades del Café. Boletín Técnico del Café, Año 1, Vol. 1, N° 8. Marzo de 1982. Xalapa Ver. México.
- 7.-Corlay Perez C.: Anteproyecto de una Planta Semicomer---cial para la Obtención de Café Preparado y Aprovechamiento del Café Agotado por Desdoblamiento Hidrolítico. Tesis. UNAM. México, 1955.
- 8.-Youngken W. H.: Tratado de Farmacognosia. Editorial Atlante, p. 1073 - 1078. México D. F. 1951.
- 9.-INMECAFE: Conceptos Basicos de Café. Primer Curso: Auxiliar Técnico de Catador. Centro de Adiestramiento y Preparación de Café. México D.F. 1980 p. 33 - 73.

- 10.- INMECAFE: Resúmenes de Material Informativo Sobre el Cultivo de Café. Dirección Adjunta de Producción y Mejoramiento del Café. Xalapa Ver. México 1984.
- 11.- Villaseñor Luque A.; La Cafeticultura Mexicana Ante la Royá del Café. INMECAFE. Departamento de Divulgación -- Agrícola.
- 12.- Braham, J. E. y Bressani, R. (Eds): Pulpa de Café, Composición, Tecnología y utilización. INCAP Publ. N° IDRC 1089. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID). Bogotá, Colombia. 1978. p. 9 - 29.
- 13.-INMECAFE; El Beneficiado Humedo del Café. Boletín Técnico del Café. Año 1, N° 5, Vol. 1. Dic. 1981. Xalapa Ver.
- 14.- INMECAFE; El Beneficiado Seco del Café. Boletín Técnico del Café. Año 1, N° 6, Vol. 1. Enero 1982. Xalapa -- Ver. México.
- 15.- Litter M.; Farmacología Experimental y Clínica. Quinta Edición. Editorial "El Ateneo". Buenos Aires, Argentina. p. 414 - 422. 1977.
- 16.- Bowman W.C. y Rand N. J.; Farmacología; Bases Bioquímicas y Patológicas, Aplicaciones Clínicas. Segunda Edición. Editorial Panamericana. México, D. F. p. 35 - 37. 1984.
- 17.- Windholz M And Budavaris (Eds); The Merck Index. Merck & Co. Inc. 10th Ed. Rahway. N. Y. USA. 1983 p. 225, 1327 y 1328.
- 18.- A.O.A.C. Official Methods Of Analysis Of The Association Official Analytical Chemist. 14 th Ed. Arlington, Virginia. 1984 p. 272.

- 19.- Sjöberg A. M. And Rajama J.: Simple Method for the Determination of Alkaloids in Cocoa Using Paper Chromatography and UV Spectrometry. *J. Chromatogr.* 295; 291 - 294, 1984.
- 20.- Senanayake U. M. And Wijesekera R. O. B.: A Rapid Micromethod for the Separation, Identification and Estimation of the Purine Bases; Caffeine, Theobromine and Theophylline. *J. Chromatogr.* 32: 75 - 76, 1968.
- 21.- Johnson L. E. And Stevenson R. (Eds): Basic Liquid Chromatography. Varian Associates. Inc. Palo Alto, California. 1978. p. 1 - 14.
- 22.- Terada H. And Sakabe Y.: High Performance Liquid Chromatographic Determination of Theobromine, Theophylline And Caffeine in Food Products. *J. Chromatogr.* 291: 453-459, 1984.
- 23.- Dulitzky M., De la Teja E. And Lewis H. F.: Determination of caffeine in Tea by High Performance Liquid Chromatography and a Modified Digestion Procedure. *J. Chromatogr.* 318: 403 - 405, 1984.
- 24.- Hurst W. J., Snyder, K. P. And Martin R. A. Jr.: Use of Microbore High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Caffeine, theobromine and Theophylline in Cocoa. *J. Chromatogr.* 318: 408 - 411, 1984.