



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

Desarrollo y validación de un método para la  
determinación de cafeína en alimentos mediante el  
uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución,  
CLAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ALCALÁ SILVA ERANDI



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Ernestina Cervera Flores
Vocal	Prof. María del Carmen Durán Domínguez
Secretario	Prof. María de Lourdes Osnaya Suárez
1er sup.	Prof. Iliana Elvira González Hernández
2do sup.	Prof. Marisela Bernal González

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Edificio E,  
Lab. 302, Facultad de Química

Asesor del tema

María del Carmen Durán Domínguez \_\_\_\_\_

Supervisor técnico

Marisela Bernal González \_\_\_\_\_

Sustentante

Erandi Alcalá Silva \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a mi hermosa familia por su apoyo incondicional

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme

A la Dra. Carmen Durán de Bazúa por su apoyo durante este trabajo

A la M en C Marisela Bernal por su apoyo, paciencia y comentarios a lo largo de este trabajo ¡Gracias!

Al Dr José Luz González por sus comentarios acertados

A las profesoras del jurado por sus observaciones

A Argelia Sánchez por su apoyo

A Frida Alcalá por mostrarme la química de otra manera

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Sara y Macedonio por haberme dado la vida, por su amor, por su confianza, por hacerme una persona de bien, por su apoyo y comprensión ¡Gracias! ¡Mejores imposible! ¡Los amo!

A mi hermano Camilo por su amor y apoyo incondicional

A mis abuelos María y Samuel por su amor, por estar siempre pacientes

A José Cravioto por ser mi amor, por estar y compartir este ciclo de la vida

A mis amigas Brenda, Berenice, Paloma, Laura, Karina por crecer conmigo, por ser mis hermanas, por su amor y su apoyo

A mis amigos de la Facultad Israel Mena, Víctor Suárez, Mayel Soto, Moisés Solano, Juan Carlos Orejel, David Prato, Anayely Monroy, Isaura Hernández, Amanda Ochoa, Helena García, Ana Martínez, Alicia Méndez por compartir alegrías, tristezas, sueños, enojos, ideas ... en fin la vida en la UNAM

A mis compañeros del PIQA y QA, Laura Espinosa, Otilia Cruz, Liliana Torres, Leonardo Tenorio, Ronny Flores, Benjamín Ramírez, por compartir largos días de trabajo, por su apoyo ¡Mil gracias!

A todos los amigos y compañeros dentro y fuera de la Facultad por los buenos momentos

## Índice

	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
1.1 INTRODUCCIÓN	12
1.2 OBJETIVO GENERAL	13
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES	13
<b>CAPÍTULO II ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
2.1 CAFEÍNA	
2.1.1 <i>Propiedades físicas y químicas</i>	14
2.1.2 <i>Alimentos y cafeína</i>	15
2.1.3 <i>Determinación</i>	17
2.1.4 <i>Propiedades fisiológicas y farmacéuticas</i>	22
2.1.5 <i>Toxicología</i> (Arnaud, 1993)	23
2.2 TÉ NEGRO	
2.2.1 <i>Breve historia</i> (Balentine y col., 1998)	24
2.2.2 <i>Descripción</i> (Balentine y col., 1998)	25
2.2.3 <i>Cosecha</i> (Anónimo, 2007a)	26
2.2.4 <i>Producción</i> (Balentine y col., 1998; Iciar, 2000; Robinson y col., 1993)	26
2.2.5 <i>Composición química</i>	28
2.3 CAFÉ	28
2.3.1 <i>Breve historia</i>	29
2.3.2 <i>Descripción</i>	30
2.3.3 <i>Cosecha</i>	31
2.3.4 <i>Producción</i> (Anónimo, 2006a; Clarke y Macrae, 1993; Spiller, 1998a)	32
2.3.5 <i>Composición del café</i>	34
2.4 PULPA DE CAFÉ	35
2.5 LOS RESIDUOS EN LA AGROINDUSTRIA (Solís-Fuentes y col., 1998)	39
2.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS	40
2.6.1 <i>Validación de métodos cromatográficos</i>	40
2.6.2 <i>Parámetros para la validación de métodos cromatográficos evaluados en esta investigación</i> (Anónimo, 1994; 1998; 2001)	41
2.7 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	43
2.7.1 <i>Instrumentación</i>	46
2.8 SONIFICACIÓN (ULTRASONIDO)	50
2.8.1 <i>Extracción de cafeína asistida por ultrasonido</i>	51

<b>CAPÍTULO III METODOLOGÍA</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Muestras</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Reactivos</b>	<b>54</b>
<b>3.4 Equipo</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Condiciones cromatográficas</b>	<b>55</b>
<b>3.6 Elección de la composición de la fase móvil</b>	<b>55</b>
<b>3.7 Elección de la longitud de onda</b>	<b>56</b>
<b>3.8 Linealidad</b>	<b>56</b>
<b>3.9 Precisión y exactitud</b>	<b>56</b>
<b>3.10 Determinación de la estabilidad de cafeína</b>	<b>56</b>
<b>3.11 Determinación del límite de detección y cuantificación</b>	<b>57</b>
<b>3.12 Desarrollo de la metodología de extracción por baño ultrasónico</b>	<b>57</b>
<b>3.12.1 Concentración óptima</b>	<b>57</b>
<b>3.12.2 Volumen óptimo</b>	<b>57</b>
<b>3.12.3 Tiempo óptimo</b>	<b>58</b>
<b>3.13 Determinación de cafeína por CLAR en muestras de café, té negro y pulpa de café</b>	<b>58</b>
<b>3.14 Cuantificación de cafeína en las muestras de café, té negro y pulpa de café por el método AOAC Método Bailey-Andrew (Horwitz, 2000)</b>	<b>58</b>
<b>3.14.1 Café y pulpa de café (960.25)</b>	<b>58</b>
<b>3.14.2 Té negro (925.17)</b>	<b>59</b>
<b>3.15 Extracción de cafeína por método AOAC Método Bailey-Andrew y su cuantificación por medio de un analizador elemental</b>	<b>59</b>
<b>3.16 Recobro</b>	<b>60</b>
<b>3.16.1 Recobro en CLAR</b>	<b>60</b>
<b>3.17.2 Recobro por el método AOAC y con el analizador elemental</b>	<b>60</b>
<b>3.17 Análisis estadístico</b>	<b>60</b>
<b>3.17.1 Linealidad</b>	<b>61</b>
<b>3.17.2 Precisión y exactitud</b>	<b>63</b>
<b>3.17.3 Estabilidad en disolución</b>	<b>64</b>
<b>3.17.4 Recobro</b>	<b>66</b>

<b>CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
4.1 Determinación de condiciones cromatográficas óptimas (fase móvil, $\lambda_{\max}$ , disolvente)	67
4.2 Validación	68
4.2.1 Linealidad	68
4.2.2 Límite de detección y cuantificación	70
4.2.3 Precisión y exactitud	71
4.2.4 Estabilidad de la cafeína	71
4.3 Desarrollo de la metodología de extracción por baño ultrasónico	75
4.3.1 Concentración óptima	75
4.3.2 Volumen óptimo	76
4.3.3 Tiempo óptimo	77
4.4 Determinación de cafeína por CLAR en muestras de café, té negro y pulpa de café y evaluación del porcentaje de recobro en cada etapa	77
4.5 Cuantificación de cafeína en las muestras de café, té negro y pulpa de café por el método AOAC y porcentaje de recobro	80
4.6 Extracción de cafeína por método AOAC, cuantificación de cafeína por medio del analizador elemental, AE, y porcentaje de recobro	82
4.7 Comparación de las tres metodologías	86
<b>CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>89</b>
5.1 CONCLUSIONES	89
5.2 RECOMENDACIONES	90
<b>ANEXO 1 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO 2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b>	<b>97</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>105</b>



## Índice de tablas

	<b><i>Página</i></b>
Tabla 2.1 Solubilidad de la cafeína en diferentes disolvente (Tarka y Hurst, 1998)	<b>14</b>
Tabla 2.2 Punto de sublimación y de fusión de la cafeína (Tarka y Hurst, 1998)	<b>15</b>
Tabla 2.3 Composición del té negro (Iciar, 2000)	<b>29</b>
Tabla 2.4 Composición química del grano de café (Iciar, 2000)	<b>35</b>
Tabla 2.5 Composición química de la pulpa de café (Solís, 1995)	<b>36</b>
Tabla 2.6 Efectos del ultrasonido en alimentos (Manson y col., 1996)	<b>52</b>
Tabla 4.1 Curva estándar de cafeína	<b>69</b>
Tabla 4.2 Prueba de hipótesis para la ordenada al origen	<b>70</b>
Tabla 4.3 Prueba de hipótesis para la pendiente	<b>70</b>
Tabla 4.4 Estabilidad de la cafeína en agua y metanol	<b>72</b>
Tabla 4.5 Prueba de hipótesis para metanol (°C)	<b>73</b>
Tabla 4.6 Prueba de hipótesis para agua (°C)	<b>73</b>
Tabla 4.7 Prueba de hipótesis para el metanol (días)	<b>74</b>
Tabla 4.8 Prueba de hipótesis para el agua (días)	<b>75</b>
Tabla 4.9 Porcentaje de recobro y de cafeína para las muestras en cada etapa del proceso	<b>78</b>
Tabla 4.10 Porcentaje de recobro y de cafeína para las muestras por el método AOAC	<b>81</b>
Tabla 4.11 Porcentaje de recobro y de cafeína para las muestras analizadas con el AE	<b>83</b>
Tabla 4.12 Comparación de los porcentajes de recobro para las muestras con los diferentes métodos	<b>85</b>
Tabla 4.13 Comparación de los porcentajes de cafeína para las muestras con las diferentes metodologías	<b>86</b>

## Índice de figuras

	<b><i>Página</i></b>
Figura 2.1 Estructura química de la cafeína	<b>14</b>
Figura 2.2 Diagrama de extracción de cafeína por el método AOAC (960.25) para café y pulpa de café	<b>20</b>
Figura 2.3 Diagrama de extracción de cafeína por el método AOAC (925.17) para té negro	<b>21</b>
Figura 2.4 Diagrama de la producción del té negro	<b>26</b>
Figura 2.5 Diagrama de la producción del café	<b>34</b>
Figura 2.6 Diagrama esquemático de las fracciones obtenidas del café cereza (Solís-Fuentes y col., 1998)	<b>37</b>
Figura 2.7 Posibles usos de la pulpa y pericarpio del café (Solís-Fuentes y col., 1998)	<b>38</b>
Figura 2.8 Clasificación de la cromatografía (Skoog, 2001)	<b>44</b>
Figura 2.9 Esquema general de un cromatógrafo de líquidos	<b>46</b>
Figura 4.1 Tiempo de retención de la cafeína a diferente composición de la fase móvil	<b>67</b>
Figura 4.2 Curva de calibración de cafeína	<b>69</b>
Figura 4.3 Estabilidad de la cafeína en agua y metanol	<b>72</b>
Figura 4.4 Determinación de la concentración óptima de cafeína	<b>76</b>
Figura 4.5 Determinación del volumen óptimo de cafeína	<b>76</b>
Figura 4.6 Determinación del tiempo óptimo de cafeína	<b>77</b>
Figura 4.7 Porcentajes de recobro para cada una de las etapas del proceso	<b>78</b>
Figura 4.8 Porcentaje de cafeína de las muestras por el método CLAR	<b>79</b>
Figura 4.9 Porcentaje de recobro para la muestras por el método del AOAC	<b>81</b>
Figura 4.10 Porcentaje de cafeína en las muestras por el método	<b>82</b>

AOAC

Figura 4.11	Porcentaje de recobro para las muestras por el método AE	<b>83</b>
Figura 4.12	Porcentaje de cafeína en las muestras por el método AE	<b>84</b>
Figura 4.13	Comparación de los porcentajes de recobro entre las tres metodologías	<b>85</b>
Figura 4.14	Porcentaje de cafeína en las muestras analizadas para las metodologías comparadas	<b>86</b>

## RESUMEN

Desde hace más de dos siglos y hasta nuestros días, el café y el té negro se han mantenido como las bebidas más populares en el mundo, siendo éstas fuentes importantes de metilxantinas como la cafeína, la teobromina y la teofilina. Para corroborar la concentración de cafeína en los alimentos, la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, por sus siglas en inglés) publica métodos oficiales y estandarizados. Algunos de ellos requieren de tiempos largos, reactivos costosos, además de que generan residuos que afectan al ambiente. El propósito de esta investigación es el desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de cafeína en alimentos y compararlo con el que establece la AOAC y con los resultados de un analizador elemental (AE). Para este fin se tomaron como materiales de prueba el café, el té negro y la pulpa de café, así como un control de cafeína pura grado reactivo. Con base en los parámetros determinados en esta investigación, es posible afirmar que el método propuesto representa una buena alternativa para la cuantificación de cafeína en las muestras estudiadas de café, té negro y pulpa de café, con posibilidades de ser aplicado a otro tipo de alimentos como lo son: algunas bebidas con cafeína, hierba mate y productos de cocoa y chocolate.

Palabras clave: Cafeína, teofilina, teobromina, cromatografía de líquidos de alta resolución, análisis elemental.

## ***CAPÍTULO I***

### ***INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS***

#### **1.1 Introducción**

Desde hace más de dos siglos y hasta nuestros días, el café y el té negro se han mantenido como las bebidas más populares en el mundo, siendo éstas fuentes importantes de metilxantinas como la cafeína, la teobromina y la teofilina. Estos alcaloides tienen efectos estimulantes sobre varios sistemas del cuerpo humano, como el nervioso, el gastrointestinal, el cardiovascular, el renal y el respiratorio.

En años recientes, la cafeína ha despertado un mayor interés debido a la proliferación en el mercado de productos que la contienen; además, se han revalorado las fuentes naturales de ésta como los son: el café y el té negro. Es por ello que resulta importante determinar cuantitativamente la cafeína en diferentes muestras de alimentos y, por ende, proteger al consumidor.

Para corroborar la concentración de cafeína en los alimentos, la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, publica métodos oficiales de análisis, establecidos y estandarizados. Algunos de ellos requieren de tiempos largos, así como de reactivos costosos, además de que generan residuos que afectan al ambiente.

El propósito de esta investigación es el desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de cafeína en alimentos y compararlo con el que establece la AOAC, lo cual permitirá realizar su seguimiento de manera más efectiva. También se comparará con los resultados de un analizador elemental (AE). Para este fin, se tomarán como materiales de prueba el café, el té negro y la pulpa de café, así como un control de cafeína pura grado reactivo.

La determinación en la muestra de pulpa de café se hace con el propósito de permitir su uso en investigaciones posteriores, ya que es un subproducto del beneficio del café, del cual se generan cantidades importantes, lo que tiene un

impacto ambiental considerable en las regiones productoras. Este subproducto se acumula en los alrededores de las plantas procesadoras esperando su degradación o son arrojados a los ríos. Es por ello que resulta importante determinar sus concentraciones de cafeína y eliminarla lo mejor posible con objeto de darle un uso o aprovechamiento en piensos para animales monogástricos o poligástricos.

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Validar un método cromatográfico para determinar cafeína en alimentos, comparando sus resultados con los obtenidos con la metodología actualmente estandarizada (AOAC) y los resultados de un analizador elemental (AE)

## **1.3 OBJETIVOS PARTICULARES**

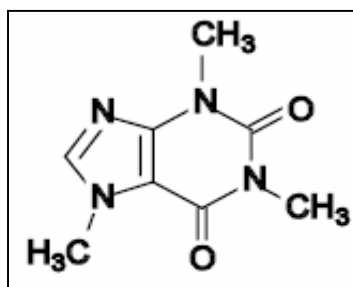
- ✓ Probar la metodología validada con tres productos: café, té negro y pulpa de café.
- ✓ Determinar las condiciones óptimas para la determinación de cafeína en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) considerando las variables fase móvil, longitud de onda, disolvente.
- ✓ Estudiar la estabilidad de la cafeína en metanol y agua a temperatura ambiente y 4°C.
- ✓ Determinar condiciones óptimas para la extracción con ultrasonido (concentración, volumen, tiempo).

## **CAPÍTULO II**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1 CAFEÍNA**

La cafeína es un alcaloide clasificado como una purina metilada, estructuralmente conocida como 1,3,7-trimetilxantina ó 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina ó metilteobromina. Su peso molecular es de 194.20 g/mol; su estructura química se muestra en la Figura 2.1.



**Figura 2.1 Estructura química de la cafeína**

##### **2.1.1 Propiedades físicas y químicas**

La cafeína en solución es incolora e inodora con un sabor amargo. Es un polvo blanco, soluble en disolventes orgánicos y agua. En las Tablas 2.1 y 2.2 se muestran sus propiedades de solubilidad en diferentes disolventes y sus puntos de sublimación y de fusión.

**Tabla 2.1 Solubilidad de la cafeína en diferentes disolventes (Tarka y Hurst, 1998)**

Disolvente	Agua 20°C	Agua 100°C	Éter	Alcohol	Cloroformo	Acetona	Benceno
Cafeína (%)	2.2	66.7	0.2	1.5	18.2	2.0	1.0

**Tabla 2.2 Punto de sublimación y de fusión de la cafeína (Tarka y Hurst, 1998)**

	Punto de sublimación (°C)	Punto de fusión (°C)
Cafeína	178	238

En disolución acuosa, la cafeína se asocia en forma de dímeros y probablemente de polímeros. La cafeína también se va a asociar con las purinas y/o pirimidinas como bases libres o como nucleósidos. La cafeína cristaliza en el agua como monohidrato. Los ácidos clorogénicos forman complejos 1:1 con la cafeína. Otros compuestos con los que la cafeína forma complejos son: isoeugenol, cumarinas, y antocianinas (Tarka y Hurst, 1998).

En la extracción con cloroformo, los complejos formados por los ácidos clorogénicos y la cafeína (1:1) hacen que sólo existan pequeñas proporciones de cafeína libre (Tarka y Hurst, 1998). La cafeína tiene una base débil y reacciona con ácidos y las sales que producen son muy hidrolizables (Tarka y Hurst, 1998).

Las metilxantinas muestran una alta absorción en el ultravioleta entre 250 y 280nm. La cafeína tiene una absorción máxima en 274nm. Su cromóforo dominante es la purina (Popl y col., 1990).

En la naturaleza, la cafeína suele estar acompañada por la teofilina y la teobromina, metilxantinas que aparecen en pequeñas cantidades y no alcanzan a producir efectos fisiológicos (Iciar, 2000).

### **2.1.2 Alimentos y cafeína**

La cafeína se consume ampliamente y se encuentra en forma natural en las hojas, semillas y frutos de más de 60 plantas, entre las que se pueden mencionar, hojas de té, nueces de cola, café y granos de cacao. Más recientemente, han aparecido en el mercado bebidas con cafeína ("bebidas energéticas").



La cafeína está presente en el fruto del cafeto en concentraciones de 0.9 -1.8% en los granos de café tostado (Sawyer y Kirk, 1991) y en la pulpa de café en concentraciones de 0.6-1.3% en base seca (Solís, 1995).

Tanto en la pulpa como en el café, la cafeína se encuentra en forma libre y en la forma de un complejo, clorogenato de potasio. Este complejo es poco soluble, por lo que dificulta la libre movilidad de la cafeína por los distintos tejidos (Iciar, 2000).

En el té negro, la cafeína constituye entre el 2.5 y el 5.5% del extracto seco (Sawyer y Kira, 1991). El contenido de cafeína no disminuye significativamente durante el proceso de la fabricación del té negro.

A diferencia del café y del té negro, el cacao constituye un caso particular, ya que no se consume en forma de infusión acuosa si no como producto sólido. Las metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) también se encuentran en los productos derivados de los granos de cacao, predominando la teobromina, la cafeína se encuentra en concentraciones menores (1/8 de la concentración de teobromina) y la teofilina se encuentra en trazas (Iciar, 2000).

En general el cacao es consumido ya procesado (chocolate), es decir ya se le han agregado diferentes ingredientes, con lo cual la concentración de metilxantinas disminuye. Al contrario de lo que sucede con el café y el té, hace falta consumir grandes cantidades de productos de cacao para lograr la acción estimulante.

En el cacao natural la teobromina está en concentraciones de 2.5% y la cafeína de 0.26%; en el cacao comercial los valores disminuyen, 1.89% de teobromina y 0.21% de cafeína; en bebidas de chocolate el porcentaje de teobromina varía desde 0.015 hasta 0.44% y el de cafeína de 0.001 a 0.003% ; en pasteles de chocolate el porcentaje total de metilxantinas es de 0.178%; en un helado es de 0.65% (Apgar y Tarka, 1998).

Otro alimento con metilxantinas es el mate, una bebida preparada con las hojas de *Ilex paraguariensis*. Constituye la fuente primaria de metilxantinas en la dieta de algunas personas en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Chile (Graham, 1998).

La cantidad de cafeína en el mate va de 0.9 a 2.2%, siendo las hojas más jóvenes las que contienen mayor cantidad de cafeína. La teobromina y teofilina se encuentran en concentraciones más bajas 0.3 y 0.004% respectivamente (Graham, 1998).

### **2.1.3 Determinación**

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas analíticas para la determinación de cafeína en alimentos (Saag, 1992). Algunas de éstas son:

- Procedimiento tradicional con nitrato de plata, desarrollado en 1953,
- Método basado en la determinación de nitrógeno por Kjeldahl en 1976,
- Espectrofotometría de ultravioleta en 1979,
- Método gravimétrico de la AOAC en 1980,
- Cromatografía en capa fina,
- Cromatografía de gases,
- Electroforesis capilar
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (1980)

En muchos casos, estos métodos se ven sujetos a interferencias originadas por otros compuestos y requieren una preparación previa de la muestra, que toma tiempo y requiere de reactivos específicos, por lo que no son viables para su uso rutinario.

Los métodos modernos de cromatografía de líquidos de alta resolución son específicos, precisos y permiten hacer las determinaciones más rápidamente (Saag, 1992), ya que el análisis cuantitativo incluye extracciones relativamente simples; por ejemplo, el calentamiento con agua, seguido de una filtración y la inyección en la columna de CLAR. Cabe señalar que durante la cuantificación mediante CLAR, no solamente se cuantifica cafeína, sino también teobromina y teofilina, pero debido a que estas dos últimas se encuentran en muy bajas concentraciones se consideran como nulas.

Kreiser y Martin (1980) proveyeron las condiciones típicas para este análisis. En sus estudios la extracción se realiza con agua caliente. Se filtra y se inyecta el líquido filtrado al cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas son: Columna "bondapak" C<sub>18</sub>, fase reversa y una fase móvil de agua:metanol:ácido acético (74:25:1). La detección se hace a 280 nm. Este método es exacto, preciso y rápido. Fue adoptado por la AOAC como un método oficial para la determinación de teobromina y cafeína en productos de cocoa y chocolate (Hurst y col., 1998).

Para el desarrollo del método propuesto en esta investigación se tomo como base el método AOAC 980.14, teobromina y cafeína en productos de cacao.

El método desarrollado en este trabajo fue comparado con:

#### **a) Método de Bailey-Andrew de la AOAC**

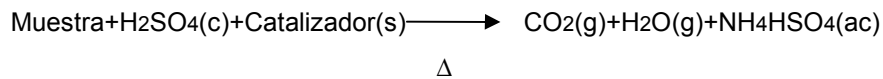
##### ***Fundamento (Sawyer, 1991)***

Se describe en forma de diagrama de bloques en las Figuras 2.2 y 2.3. Este método se puede dividir en tres etapas; la primera que es la etapa de extracción, en la cual la muestra con agua es calentada con el fin de extraer la cafeína y otros compuestos solubles en agua; la segunda etapa, purificación del extracto, en donde se realizan una serie de extracciones con cloroformo. De esta manera y con base en la solubilidad de la cafeína en cloroformo se logra separar la cafeína de los demás componentes solubles en agua; y la tercera etapa que es la determinación de cafeína por el método de Kjeldahl. Este método consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración ácido base. En la primera etapa, toda la materia orgánica de la muestra es oxidada hasta dióxido de carbono y agua, mientras que el nitrógeno es convertido en sulfato de amonio, por la acción del agente oxidante en medio ácido y con la ayuda de un catalizador. En la etapa siguiente, la destilación, mediante la acción de una base fuerte, generalmente hidróxido de sodio, se libera el amoníaco (hidróxido de amonio), el cual es atrapado por una disolución de ácido bórico, de tal manera que se forma borato de amonio. En la

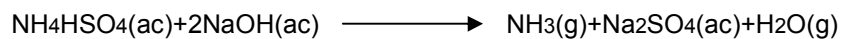
etapa final, se hace la valoración del borato de amonio que se forma, con un ácido estándar.

Reacciones método Kjeldahl

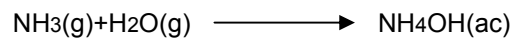
Digestión



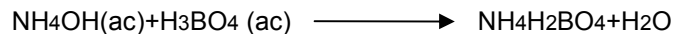
Liberación del  $\text{NH}_3$



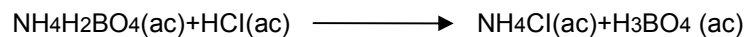
Arrastre con vapor



Recolección



Titulación

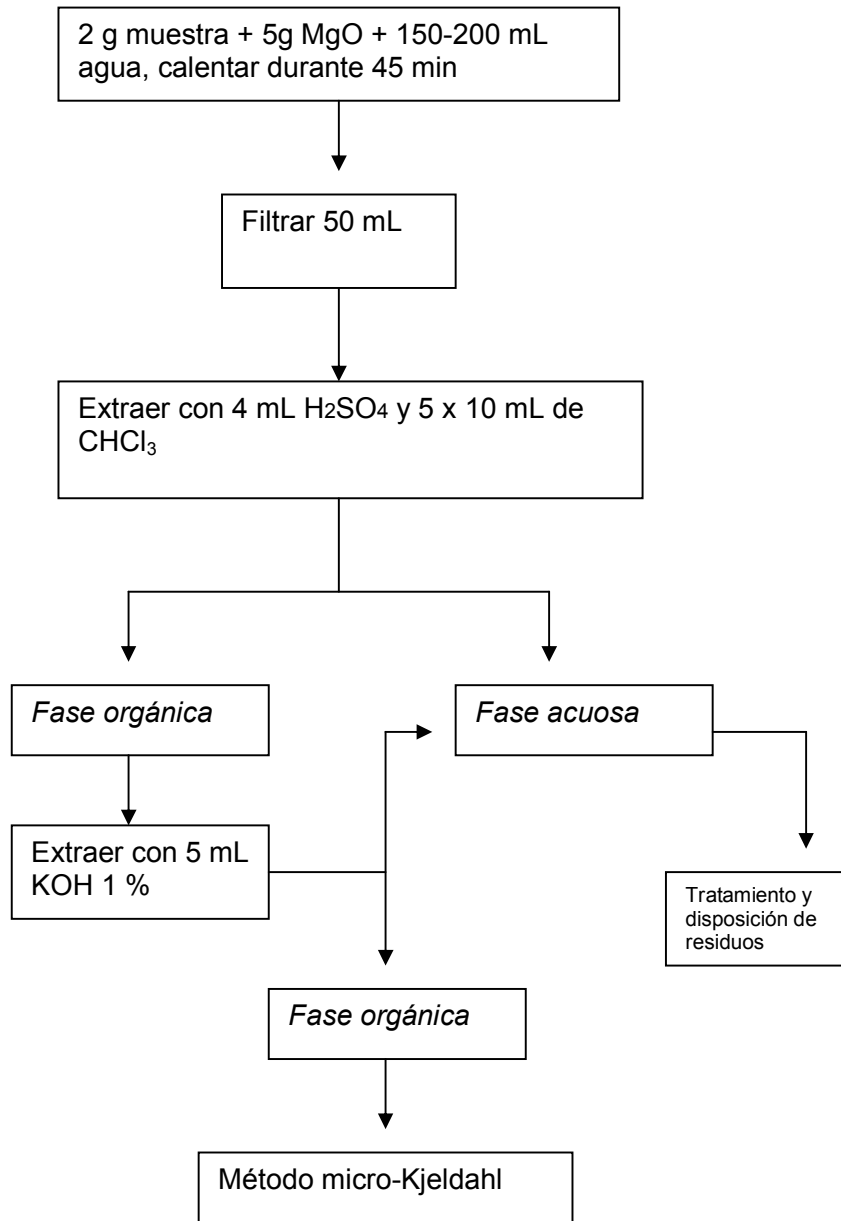


## b) Análisis elemental

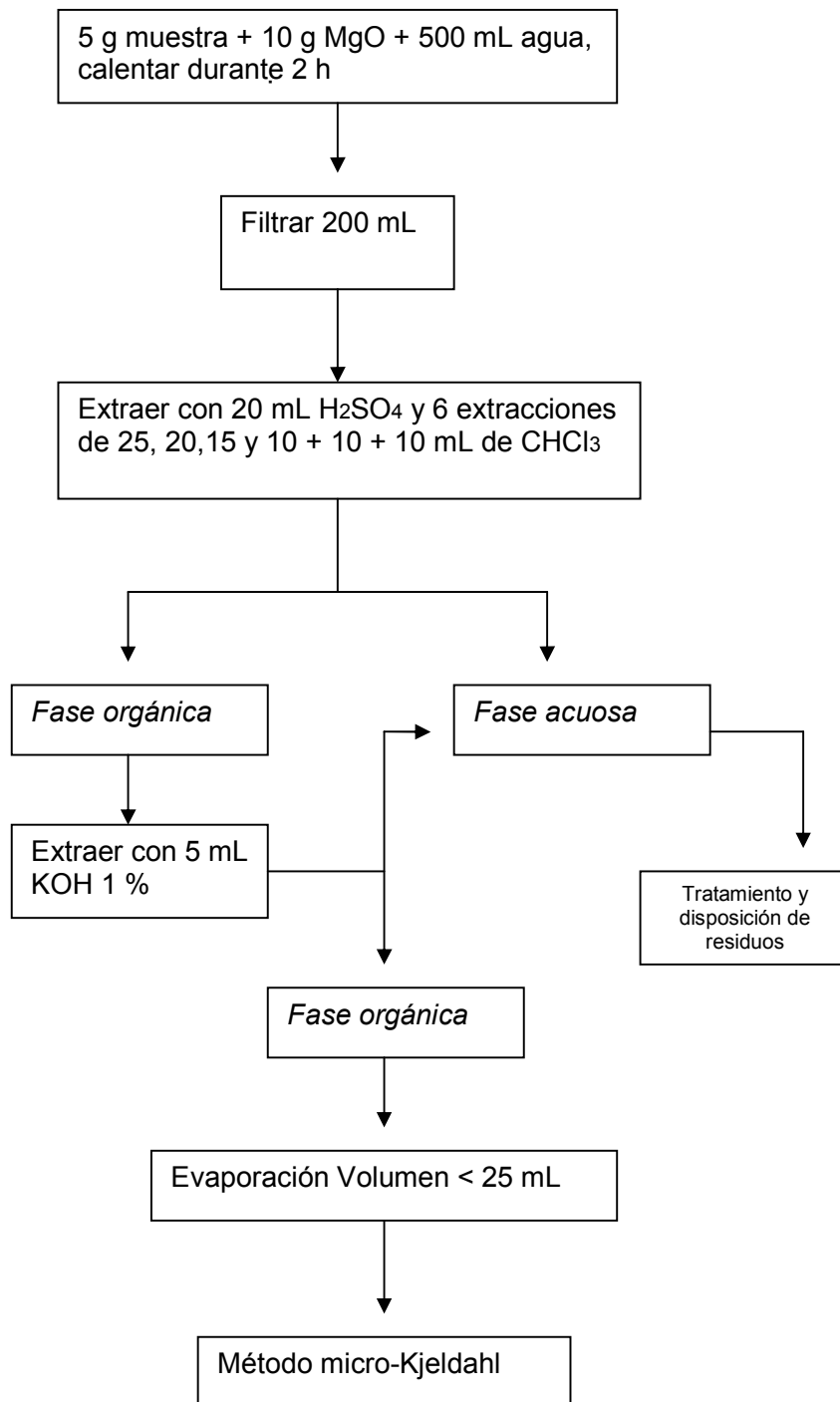
### ***Fundamento (Skoog, 2001)***

Es una técnica instrumental que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. Se basa en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{NO}_2$ , son transportados por una corriente de helio a un horno de reacción, en donde se completa la oxidación y reducción simultánea de los gases de la muestra.

La separación de los gases es a través de una columna cromatográfica empacada y son medidos por un detector de conductividad térmica. Al final de la determinación se obtiene un cromatograma.



**Figura 2.2 Diagrama de extracción de cafeína por el método AOAC (960.25) para café y pulpa de café**



**Figura 2.3 Diagrama de extracción de cafeína por el método AOAC (925.17) para té negro**

### **2.1.4 Propiedades fisiológicas y farmacéuticas**

Las propiedades fisiológicas y farmacológicas de la cafeína representan la acumulación de los efectos no solamente del compuesto en sí, sino también de sus metabolitos (Spiller, 1998b).

Después de la ingesta, la cafeína es rápidamente absorbida del tracto gastrointestinal al torrente sanguíneo y después llega al cerebro (Arnaud, 1993).

La cafeína puede describirse como un estimulante del sistema nervioso central, aumentando la formación y la liberación de neurotransmisores como catecolaminas, serotonina, ácido gamma-aminobutírico, noroepinefrina y acetilcolina.

El primer mecanismo de acción de la cafeína es bloquear los efectos del neuromodulador de adenosina. El cuerpo responde a la presencia crónica de la cafeína, aumentando el número de sitios de unión de la adenosina. Ésta puede ser la razón por la cual aumenta la tolerancia a la cafeína en cafés y tés saturados (Spiller, 1998b).

Los efectos en la conducta del ser humano pueden ser observados después de una dosis de cafeína de aproximadamente  $1\text{-}5\text{ mg kg}^{-1}$ . En estos casos, los sujetos suelen tener una sensación de alerta, de mayor claridad, velocidad de pensamiento, reducción de la fatiga. Por otro lado, también se ha descubierto que si se toman más de  $15\text{ mg kg}^{-1}$  de cafeína se pueden presentar otros efectos, tales como insomnio, dolor de cabeza, inquietud, irritabilidad y un ritmo cardíaco bastante acelerado (Arnaud, 1993).

La cafeína, como otras metilxantinas, tiene un efecto diurético. La causa principal de dicho efecto es que aumenta el flujo sanguíneo renal y la filtración glomerular. Se ha comprobado que la administración de  $4\text{ mg kg}^{-1}$  de cafeína en humanos aumenta la excreción del sodio, el potasio, cloruros y un mayor volumen de orina (Arnaud, 1993).

La eliminación de cafeína en un adulto ocurre entre 3 y 6 horas después de haberla ingerido y es expulsada por medio de la orina. Aproximadamente un 2% de ella sale intacta (Arnaud, 1993).

Algunos de los efectos de la cafeína en el sistema cardiovascular son: estimulación directa al miocardio, provocando un aumento en la presión sanguínea y una vaso dilatación (Spiller, 1998b).

A nivel respiratorio, la cafeína estimula la respiración; se ha sugerido que es por el aumento en el flujo sanguíneo pulmonar, provocando una relajación bronquial y alveolar (Arnaud, 1993).

La cafeína relaja el músculo liso del tracto gastrointestinal, aumenta las secreciones gástricas y tiene un efecto débil sobre el peristaltismo (Spiller, 1998b).

La administración aguda de cafeína produce un aumento de 5-25% en la tasa metabólica basal, debido al efecto termogénico que provoca. Estas modificaciones en el metabolismo energético están asociadas con el aumento de ácidos grasos libres en el suero, mientras los niveles de glucosa en sangre son inconsistentes. El efecto lipolítico es generalmente atribuido a la inhibición de la fosfodiesterasa, la liberación de receptores de catecolamina ó adenosina (Spiller, 1998b).

Dejar la cafeína en forma abrupta puede causar dolores de cabeza, somnolencia, irritabilidad, náuseas, vómitos y otros síntomas, por lo que se recomienda reducir gradualmente su consumo para prevenir cualquier síntoma a causa del síndrome de abstinencia.

### **2.1.5 Toxicología** (Arnaud, 1993)

La dosis letal media oral  $DL_{50}$  (la dosis necesaria para que la mitad de la muestra poblacional de prueba se muera) de cafeína es de alrededor de 200 mg  $kg^{-1}$  en ratas, 230 mg  $kg^{-1}$  en *hamsters* (*Cricetinae*) y 246 mg  $kg^{-1}$  en conejos. La sensibilidad de los efectos letales en las ratas aumenta conforme la edad y se observa una mayor toxicidad en ratas macho que en hembras.



En niños que han consumido  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de cafeína han sido descritos entre otros síntomas, el vómito, dolor abdominal, fotofobia, palpitaciones, temblor de músculos, convulsiones e inconciencia; la dosis equivalente en adultos es de 150-200  $\text{mg kg}^{-1}$ . La cafeína es considerada como no cancerígena.

## **2.2 TÉ NEGRO**

### **2.2.1 Breve historia (Balentine y col., 1998)**

El origen probable del té es en el sureste asiático: parte de China, India, Tailandia, Laos y Vietnam. Su consumo se remonta al III milenio A.C. En sus orígenes, en China, como en sus primeros pasos por Europa, fue considerado una bebida que aportaba múltiples propiedades benéficas para la salud, atribuyéndosele una gran diversidad de efectos medicinales. Es, quizás por ello, que rápidamente fue asimilada en los altos círculos cortesanos chinos y su comercio pasó a ser monopolio imperial. Según relatan algunos investigadores, en esa época llegó a ser tan apreciado que se le utilizó como moneda de pago de impuestos y tributos.

Desde China, la planta pasó al Japón, donde pronto se convertiría en parte del espíritu y la filosofía de vida del pueblo nipón, que desarrolló, en torno a él, una ceremonia muy especial ("Cha-no-yu") que une al anfitrión y al invitado en una armonía espiritual.

Si bien en un principio sufrió un cierto rechazo por parte de los europeos, reacios a lo desconocido y acostumbrados a otras bebidas como el café, el té se fue introduciendo paulatinamente entre las preferencias de algunos sectores de la sociedad de la época. El comienzo de la expansión de su consumo en Europa se puede ubicar en los primeros años del siglo XVIII, aunque no está claro si de la mano de navegantes holandeses o portugueses, ya que ambos países comerciaban en los mares de China. En Europa también llegó a convertirse en un ritual de uso de la buena mesa y de la buena sociedad. A partir del siglo XIX su plantación se extiende a diferentes regiones del mundo y su consumo se generaliza.

En la actualidad, el té se ha convertido en una bebida de uso cotidiano por sus cualidades refrescantes y estimulantes. Además vuelve a surgir con mucha fuerza la idea de que el té es una infusión con propiedades realmente benéficas para la salud.

El té, después del agua, es la bebida más consumida en el mundo. La producción anual es de 1.8 millones de toneladas de hoja seca; el consumo *per cápita* es de 40L. El interés científico es, en parte, por su composición química no común y por la serie de reacciones complejas que ocurren cuando es transformado a té seco para comercializar.

### **2.2.2 Descripción (Balentine y col., 1998)**

La clasificación botánica de la planta de té es *Camellia variedades: sinensis y assamica*.

- *Camellia sinensis*. Usualmente se refiere al tipo de té que crece en China; es un árbol pequeño, con una altura de 4 a 6 m, de crecimiento lento, con hojas erectas de 7 a 12 cm de largo, color verde oscuro, con flores blancas que crecen individualmente y es relativamente resistente al frío; se sabe que produce un delicado olor cuando crece a altitudes altas, pero su rendimiento es bajo.
- *Camellia assamica* es una planta más alta (12-15 m) que la variedad *sinensis*, de crecimiento rápido, con hojas elípticas, con flores blancas en racimos de 2 a 4. Esta variedad es menos resistente al frío y sólo sobrevive en altitudes altas cercanas al Ecuador. En general, su rendimiento es alto comparado con la variedad *sinensis*.

El cultivo del té se realiza en los climas tropicales y subtropicales, suficientemente húmedos (China, Japón, India, Indonesia, África Oriental).

La calidad del té es mejor en la medida en que las hojas sean más jóvenes.

### 2.2.3 Cosecha (Anónimo, 2007a)

La cosecha de té puede ser manual o mecánica; se recolectan los brotes y hojas situadas en la parte superior de la planta.

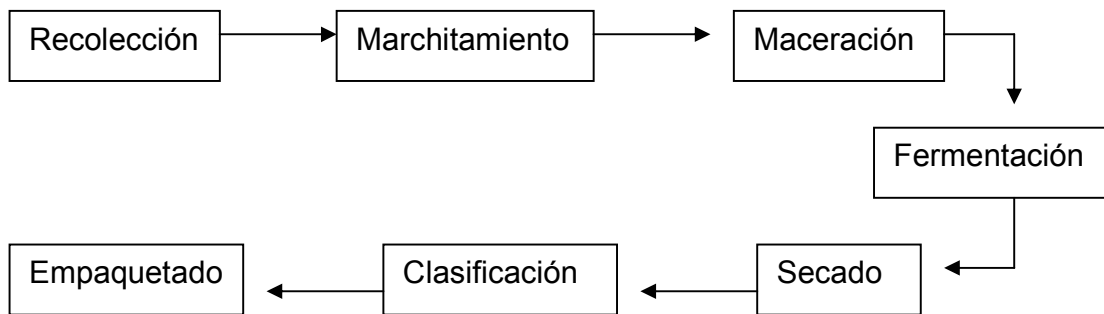
El proceso de fabricación del té pasa por varias fases, desde su recolección hasta su clasificación por grados. Se deben distinguir tres tipos de té básicos:

- el negro o fermentado
- el semifermentado
- el verde

La diferencia fundamental entre ellos es el grado de fermentación de las hojas. Para esta investigación sólo se hará referencia al té negro o fermentado.

### 2.2.4 Producción (Balentine y col., 1998; Iciar, 2000; Robinson y col., 1993)

A continuación se explican las etapas en la producción del té negro (Figura 2.4).



**Figura 2.4 Diagrama de la producción del té negro**

**Marchitamiento:** se inicia en el momento de la cosecha y tiene como finalidad reblandecer la hoja y hacerla maleable para poder enrollarla sin romperla. Las hojas se secan directamente al sol y los mejores brotes a la sombra, perdiendo entre un tercio y la mitad de su peso por la evaporación; la permeabilidad de las membranas celulares cambia, las hojas se vuelven blandas y expulsan un aroma frutal. El tiempo que dura esta etapa puede variar de 6 a 18h, dependiendo del

sistema utilizado. En las plantaciones donde se utilizan máquinas, las hojas se esparcen en cintas de avance continuo instaladas en túneles y se hace circular una corriente de aire a 20-22°C.

Se sabe que en este paso empiezan los cambios químicos favorables para la elaboración del té, como pueden ser los aumentos en los niveles de cafeína, aminoácidos y ácidos orgánicos. Dichos incrementos, especialmente el de cafeína se da como resultado del aumento en la permeabilidad celular.

**Maceración y/o enrollado:** las hojas se amasan con las palmas de las manos, con el objetivo de romper las células de las hojas y de liberar el jugo que contienen y las enzimas que se encargan de su fermentación, lo cual le da su aspecto característico. Esta operación se lleva a cabo mediante unas máquinas enrolladoras que rompen las células de las hojas.

**Fermentación:** la fermentación es definida como la transformación química que ocurre como resultado del rompimiento de las células durante la maceración.

Se colocan las hojas en capas de 2 cm de grosor sobre planchas inertes para que no se contaminen durante el proceso, con una atmósfera húmeda (90-95%) y a una temperatura constante de 22-28°C. La temperatura en el interior de la masa de fermentación sube hasta alcanzar un máximo y luego vuelve a bajar. Al alcanzar la temperatura máxima se debe detener el proceso de fermentación. Este proceso también se puede llevar a cabo utilizando fermentadores, con lo cual se obtiene un mayor control de la humedad y de la temperatura de fermentación.

Los cambios que ocurren son fundamentalmente oxidativos. De ellos resultan el color, aroma y demás características de la infusión. Los taninos incoloros se transforman en taninos rojos y pardos; la oxidación enzimática de catequinas da como resultado dos grupos de compuestos polifenólicos; la cafeína extraíble disminuye por la formación de complejos con los polifenoles; aminoácidos, carotenoides, clorofila y ácidos grasos que son los compuestos que aportan el aroma del té.

**Secado:** es la operación que tiene como finalidad detener la fermentación en el momento deseado y se realiza con ventiladores de aire caliente. Si se está

utilizando maquinaria, el té es conducido directamente a un horno, en el que también se utiliza aire, a una temperatura de alrededor de 100°C. Al llegar a este punto, el té conserva entre un 50 y un 60% de humedad. Al concluir el secado el té sólo contendrá una humedad de 2-3%. Se presenta una pequeña pérdida de cafeína debido a la sublimación.

En esta etapa, dos parámetros son determinantes para la obtención de un té de calidad: la temperatura de secado y la duración. Un secado “flojo” produce un té con alto contenido en agua y puede correr el riesgo de enmohecerse, mientras que una desecación fuerte o larga le quita al té su aroma, haciendo insolubles gran cantidad de sustancias contenidas en la hoja.

**Clasificación:** la última fase de la elaboración del té es la selección, cribado o graduación de la hoja. La clasificación se basa en el aspecto y tamaño de la hoja. Las hojas más pequeñas se utilizan para la elaboración del té en bolsitas y las más grandes para el té a granel. La fuerza, el sabor y el color de la infusión dependen del tamaño de la hoja; cuanto mayor es ésta, menor es la difusión hacia el agua y viceversa.

### **2.2.5 Composición química**

En la Tabla 2.3 se muestra la composición química del té negro, comparado con el té sin procesar (Iciar, 2000).

El sabor del té negro se debe principalmente a los polifenoles y la cafeína; la astringencia está dada por la interacción entre la cafeína y algunos productos de oxidación; la formación de complejos de la cafeína con polifenoles oxidados da como resultado la sensación del fenómeno conocido como “cremosidad”.

## **2.3 CAFÉ**

### **2.3.1 Breve historia**

Tratando de explicar los orígenes de la palabra café, se afirma que deriva del árabe KAHWAH [caua], término que se extendió a través del vocablo turco

KAHWEH ([cave] que significa bebida) y que los pueblos que adoptaron la infusión, fueron adaptando a su pronunciación: café en español; coffee en inglés; caffè en italiano; kave en húngaro; kia fey en chino, etc.

**Tabla 2.3 Composición del té negro (Iciar, 2000)**

Constituyentes	Té (% materia seca)	
	Fresco	Negro
Cafeína	3.0	3.0
Compuestos fenólicos	30.0	5.0
Compuestos fenólicos oxidados	0.0	25.0
Proteínas	15.0	15.0
Aminoácidos	4.0	4.0
Fibra bruta	26.0	26.0
Carbohidratos	7.0	7.0
Lípidos	7.0	7.0
Pigmentos	2.0	2.0
Compuestos volátiles	0.1	0.1
Minerales	5.0	5.0

Según algunos investigadores, el café procede de una región situada entre los puertos de Moka y Adén, en la vasta península de Arabia, en el Suroeste de Asia, extendida entre el Mar Rojo, el Océano Índico, el Golfo Pérsico, Irak y Jordania.

El café fue mencionado en la literatura por un médico árabe llamado Rhazes, hacia el año 900 D.C. En sus inicios fue utilizado como alimento; después fue catalogado por los árabes como un vino; más tarde se utilizó como medicamento y, finalmente, hacia el siglo XIII de nuestra era, comienza a consumirse como bebida.

El café ha sido, a través de la historia, alabado, prohibido y criticado. Se encontró un tratado anónimo, en donde se especifican las cualidades que se atribuyen a la bebida "... que deseca todo, humores fríos y húmedos, expulsa los vientos, tonifica el hígado, alivia a los hidrónicos por su naturaleza purificadora, resulta también excelente para la sarna y la corrupción de sangre, refresca el corazón y el latido vital de éste, alivia a los que tienen dolores de estómago y a los que han perdido el apetito, es igualmente bueno para las indisposiciones de cerebro frías, húmedas y penosas. El humo que desprende es bueno contra los flujos oculares y los zumbidos de oídos, resulta excelente también para el ahogo, los catarrros que atacan al pulmón, los dolores de riñón y las lombrices, es un alivio extraordinario después de haber bebido o comido demasiado" (González-Medina, 2001).

En la actualidad, el café está presente en las costumbres de muchos pueblos que lo consumen diariamente. La vida de millones de hombres y mujeres depende del proceso de producción, beneficio, industrialización y comercialización del café.

México ocupa, a nivel internacional (Anónimo, 2006a):

- ✓ El quinto lugar como productor de café, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam, con una producción de 1,722,905 toneladas anuales en promedio.
- ✓ El quinto lugar por la superficie de cultivo, con alrededor de 750 mil hectáreas.
- ✓ El primer lugar en la producción de café orgánico certificado.
- ✓ México es la nación productora con el menor nivel de consumo interno, de 0.8 kg/persona.

### **2.3.2 Descripción**

Cafeto es la denominación común del género de árboles de la familia de las Rubiáceas, así como de sus semillas y de la bebida que con ellas se prepara. De las treinta especies que comprende el género *Coffea*, sólo son importantes tres:

*arabica, canephora y liberica*. Las especies del arbusto del cafeto que se cultivan en el país son dos: 1) la arábica, árabe o arabica y 2) la robusta o canephora (Anónimo, 2006a).

El arbusto o arbolillo, de 4 a 6 m de altura en la madurez tiene hojas ovaladas, lustrosas, verdes, que se mantienen durante 3 a 5 años y flores blancas, fragantes, que sólo permanecen abiertas durante unos pocos días. El fruto se desarrolla en el curso de los seis o siete meses siguientes a la aparición de la flor; cambia desde el verde claro al rojo y, cuando está totalmente maduro y listo para la recolección, al carmesí. El fruto maduro, que se parece a la cereza, se forma en racimos unidos a las ramas por tallos muy cortos; suele encerrar dos semillas rodeadas de una pulpa dulce (Anónimo, 2006a).

Este fruto clasificado como drupa se encuentra en la mata cubierto por cuatro capas, que se describen a continuación (Coste, 1986):

- Pericarpio o cáscara del fruto. Suele ser rojo cuando está maduro, verde, amarillo o rosado durante el proceso de maduración y castaño oscuro cuando está seco.
- Mesocarpio. Está formado por la pulpa en sí y por una película pegajosa gelatinosa compuesta por sustancias pécticas y azúcares, que forma lo que generalmente se conoce como mucílago o baba.
- Endocarpio o pergamino. Es un tejido muy delgado que cubre directamente a la semilla de color gris plateado, rojizo o negro.
- Semilla o endospermo. Es el grano desprovisto de todas sus cubiertas, que comúnmente es llamado café verde o café oro, dependiendo de la etapa de beneficio.

### **2.3.3 Cosecha**

El fruto del cafeto es recolectado cuando alcanza la madurez; es decir cuando presenta un color rojo cereza.



Se utilizan dos métodos de recolección: uno se basa en la recolección selectiva. El otro consiste en agitar la planta y recoger todos los frutos (Spiller, 1998a).

Las semillas obtenidas mediante la primera técnica suelen beneficiarse, si hay agua, por el llamado método húmedo, que consiste en el ablandamiento en agua, eliminación mecánica de la pulpa, fermentación en depósitos, nuevo lavado y secado al aire o en cilindros giratorios calientes.

El método seco, que suele reservarse para las semillas recolectadas de la segunda forma, se reduce a secar el grano y eliminar las envolturas externas. El producto final es siempre el llamado "Café Verde", que se selecciona a mano o a máquina para eliminar las semillas defectuosas y la materia extraña. Se clasifica en función del tamaño.

#### **2.3.4 Producción (Anónimo, 2006a; Clarke y Macrae, 1993;Spiller, 1998a)**

##### ***Recepción y limpieza de café cereza***

En este primer paso, la recepción, se tiene la finalidad de registrar los volúmenes de café a beneficiar, a la vez de realizar una primera clasificación del grano. Normalmente el pequeño productor integrado al beneficio no cubre el primer objetivo, al no llevar una relación de las cantidades de café procesadas.

El segundo es la limpieza, que se realiza en forma manual o mediante sifones, que son depósitos de agua en forma de conos truncados invertidos, en los cuales por densidad se separan los granos verdes, vanos e impurezas de la cereza madura. El pequeño productor realiza dicha clasificación en forma manual desde el momento de la cosecha.

##### ***Despulpado***

Consiste en la separación de la pulpa y cáscara del café. Para ello se utilizan despulpadoras de discos de hierro por ser más resistentes a los granos de diferente madurez e impurezas.

### ***Remoción del mucílago y secado***

La remoción del mucílago y el secado son las etapas decisivas del beneficio. El mucílago es insoluble en agua y, por lo tanto, se quita del grano mediante dos procedimientos: fermentación natural, en la mayoría de los casos y remoción químico-mecánica, sólo en algunos beneficios.

Los pequeños productores utilizan comúnmente tanques de tabique o *block* cubiertos de cemento, aunque en algunas regiones utilizan sacos de plástico y pequeños tanques de madera.

### ***Morteado***

En esta operación se separa el endocarpio o pergamino de las semillas del fruto del cafeto, el cual es un tejido muy delgado que cubre directamente a la semilla de color gris plateado, rojizo o negro. Una vez desprovista de todas sus envolturas, la semilla de café está lista para ser tostada. Ésta es la fase más importante del beneficio e industrialización del café y de ella dependerán muchas de las cualidades que se expresarán en la taza.

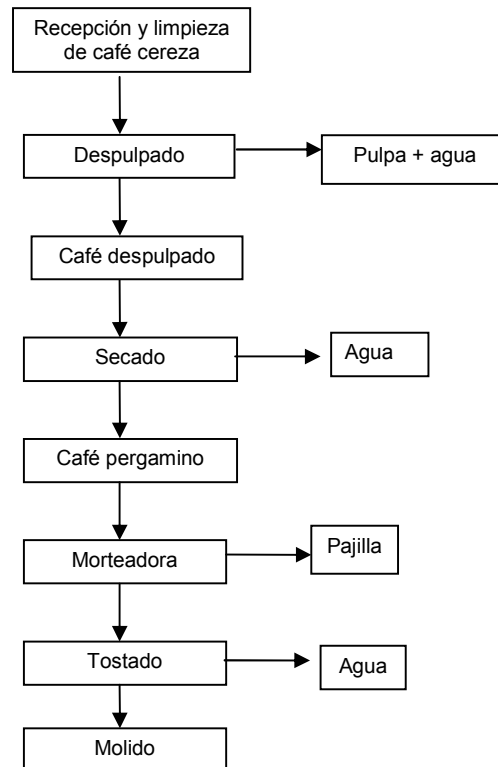
### ***Tostado***

El tostado es la operación más importante en cuanto a la generación de las propiedades sensoriales de café como bebida. Durante la fase de tostado ocurren diversas reacciones pirolíticas, responsables de la formación de las sustancias que aportan las características sensoriales del café, acompañadas por cambios físicos importantes. En ella se desarrollan las reacciones de caramelización, cuyos productos son importantes para el desarrollo de color y sabor, entre otras. Los ácidos orgánicos forman parte importante del sabor del café: cafeico y los clorogénicos. También se generan otros ácidos como el cítrico, málico y tartárico. En esta etapa del proceso la humedad final es de 8% aproximadamente.

### ***Molido***

Esta operación es importante debido a que influye directamente en la cantidad de café utilizado para la preparación de la bebida. Entre menor sea el tamaño de la partícula menor será la cantidad de café necesaria para la preparación.

En la Figura 2.5 se muestra un esquema del procesamiento del café.



**Figura 2.5 Diagrama de producción del café**

### **2.3.5 Composición del café**

En la Tabla 2.4 se muestra la composición del café antes y después del tostado (Iciar, 2000).

La cafeína es una sustancia químicamente termoestable y sólo sufre una pequeña pérdida por sublimación (178°C). Desde el punto de vista analítico, sin embargo, se observa que el porcentaje de cafeína aumenta ligeramente durante el tostado. Ello se explica por la disminución del peso en el grano del café debido a las pérdidas de sustancias orgánicas volátiles y de agua.

Es el componente que aporta el sabor amargo y contribuye ligeramente a la sensación de cuerpo y de fuerza. La cafeína (1,3,7- trimetilxantina), se presenta en el café verde en forma de complejo con el clorogenato de potasio, en proporción

1:1. Este complejo es poco soluble, por lo que dificulta la libre movilidad de la cafeína por los distintos tejidos; de otro modo, la cafeína resultaría tóxica para las células del café verde (Iciar, 2000).

**Tabla 2.4 Composición química del grano de café (Iciar, 2000)**

Constituyentes	Arabica (% materia seca)	
	Verde	Tostado
Cafeína	1.2	1.3
Trigonelina	1.0	1.0
Proteínas	9.8	7.5
Aminoácidos libres	0.5	0.0
Azúcares	58.9	38.3
Ácidos	8.0	4.9
Alifáticos	1.1	1.6
Químicos	0.4	0.8
Clorogénicos	6.5	2.5
Lípidos	16.2	17.0
Minerales	4.2	4.5
Componentes aromáticos	-	0.1
Productos de caramelización y condensación	-	25.4
Agua	8-12	0-5

## 2.4 PULPA DE CAFÉ

El proceso o beneficio del café es el conjunto de operaciones que se realizan para obtener y estabilizar fisicoquímica y microbiológicamente el endospermo o semilla, para obtener los granos de café (semilla). En la Tabla 2.5 se muestra la composición química de la pulpa de café.

**Tabla 2.5 Composición química de la pulpa de café (Solís, 1995)**

<b>Composición</b>	<b>% (bs)</b>
Extracto etéreo	2.68
Fibra cruda	20.00
Proteína (N*6.25)	8.82
Cenizas	8.72
Carbohidratos totales	63.56
Sustancias pécticas totales	6.50
Taninos	3.97
Cafeína	1.30
Ácido clorogénico	2.60
Ácido cafeico total	1.60
Calcio	0.34
Fósforo	0.05
Potasio	3.17
Sodio mg/L	171.00
Hierro mg/L	250.00

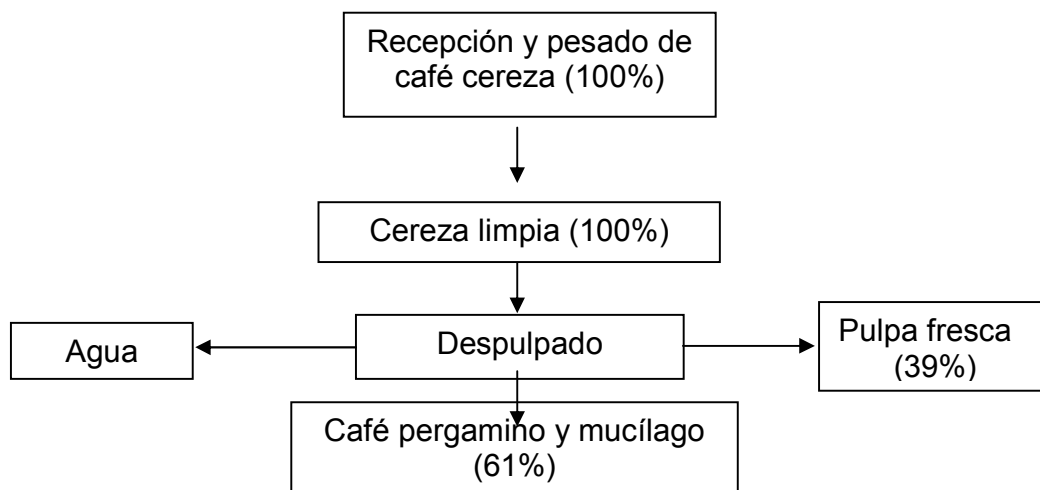
Durante el beneficio se eliminan varias capas del fruto, entre ellas el mesocarpio (pulpa), pericarpio y el endocarpio, generando una serie de residuos (ver inciso 2.5).

Zuluaga (1989) estimó el peso promedio de estos residuos. De acuerdo con sus datos, por cada 100 kg de café cereza beneficiado por vía húmeda se obtienen 39 kg de pulpa fresca y 22 kg de mucílago, aunque estos valores pueden diferir en función de la variedad o mezcla de variedades de café (Solís, 1995). En la Figura 2.6 se presenta un diagrama esquemático elaborado por este autor y sus colaboradores (Solís-Fuentes y col., 1998).

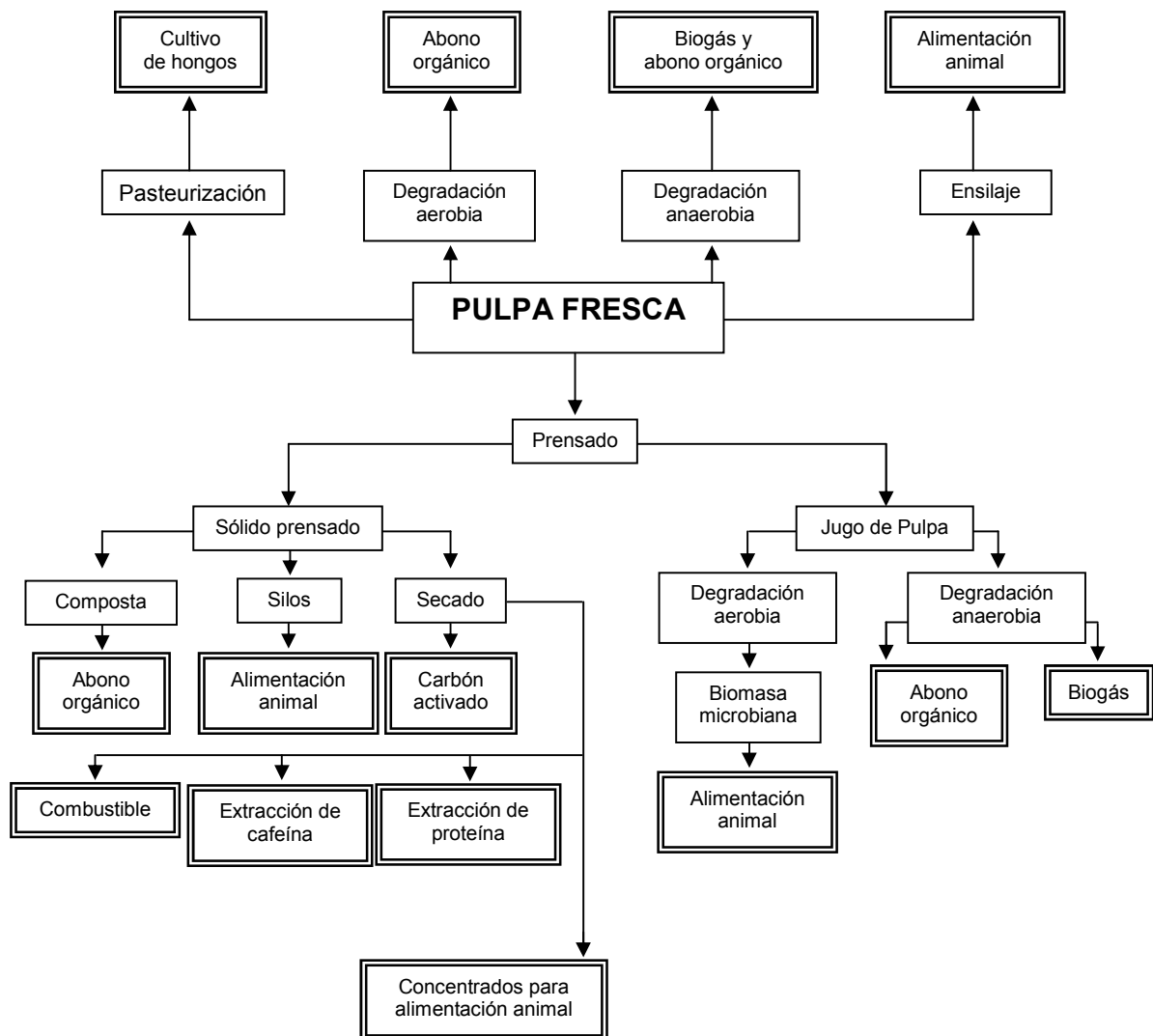
En México, como en el resto de los países productores de café, el beneficio también representa un foco de contaminación ambiental y, por tanto, un problema

ecológico a resolver. Ello hace necesario desarrollar nuevas metodologías, para la utilización integral de los residuos generados durante el proceso del beneficio. En este sentido y como respuesta a este problema, la pulpa del café ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su composición química y a sus posibles usos en diferentes rubros (Figura 2.7).

La pulpa tiene un alto contenido de humedad (alrededor del 80%), lo cual representa una de las principales desventajas para su manejo y utilización. Su proteína presenta una composición similar a las harinas de soya y de algodón por su alto nivel de lisina, histidina, treonina, valina, isoleucina y fenilalanina y tiene deficiencia en aminoácidos azufrados (Solís, 1995). Sin embargo, gran parte de esta proteína se encuentra rodeada por la pared celular lo que hace más difícil su aprovechamiento durante la digestión (Anónimo, 2006b).



**Figura 2.6 Diagrama esquemático de las fracciones obtenidas del café cereza (Solís-Fuentes y col., 1998)**



**Figura 2.7 Posibles usos de la pulpa y pericarpio del café  
(Solís-Fuentes y col., 1998)**

La presencia de ciertos compuestos químicos como: taninos, cafeína, ácidos clorogénicos y ácido cafeico proporcionan a la pulpa algunas limitaciones en cuanto a su eficiencia como posible alimento. Sin embargo, también pueden representar posibilidades como materia prima para otros usos.

Las alternativas para superar las limitaciones mencionadas se refieren, entre otras, al prensado, la deshidratación, el ensilado, el lixiviado con diferentes disolventes, el cultivo de hongos filamentosos en fermentaciones sólidas y el crecimiento de lombrices (Solís, 1995).

Se ha estudiado que la pulpa de café, por medio de fermentaciones, es posible aislar pectinasas con el objetivo de cubrir la demanda industrial; así como su uso como antioxidante (Anónimo, 2006c).

La pulpa de café puede de esta manera ser utilizada oportunamente en alimentación animal, lombricultura, producción de hongos comestibles y de compuestos químicos.

Ensayos nutricionales con animales han sido exitosos con algunas especies (conejos, cerdos y peces). El uso de la pulpa de café en sus dietas podría contribuir a reducir los costos de producción de la leche y la carne, especialmente en los países en vías de desarrollo que producen café (Anónimo, 2006d).

Sin embargo, no siempre las tecnologías necesarias para la conversión de este residuo están al alcance de la economía del país (no son redituables). A esto debe aunarse el poco interés de los industriales del café cereza para convertir un residuo en un recurso explotable, ya que como no son sancionados por contaminar, simplemente se deshacen de esos residuos como pueden.

## **2.5 LOS RESIDUOS EN LA AGROINDUSTRIA (Solís-Fuentes y col.,1998)**

Hoy en día, en casi todo el mundo los alimentos son objeto de algún tipo de procesamiento agroindustrial previo a su consumo. Ello se ha traducido en una corriente de materiales, considerados residuos, debido a que su origen, características biológicas, existencia y disposición final, a menudo significan un problema y, por lo tanto, también la oportunidad para desarrollar alternativas para superarlo.

Los residuos, como los recursos naturales, son conceptos sujetos a un estadio de conocimiento y desarrollo tecnológico determinado. El carácter de residuo o de



recurso para un mismo material tiene una determinación histórica y social. En el manejo de los residuos provenientes de la producción y procesamiento de los alimentos pueden distinguirse tres enfoques principales: disposición, tratamiento y aprovechamiento. El primero tiene como objetivo el resolver la ubicación final de los residuos sin profundizar mayormente en las características ni el impacto ambiental que podrían tener. El segundo toma cuerpo una vez que la sociedad ha aceptado que la contaminación por estos residuos es un problema que debe resolverse para reducir o eliminar el desequilibrio ambiental, incorporando medidas que incidan en las características fisicoquímicas de los residuos mediante su procesamiento ulterior, previo a su disposición al ambiente. El tercero, el aprovechamiento, surge de una nueva concepción del proceso de desarrollo de los pueblos, ubicada más allá de las visiones economicistas.

En general los residuos de la industria cafetalera tienen un enfoque de disposición y, en el caso específico de la pulpa y cáscara del café, estos son amontonados cerca de las plantas procesadoras o arrojados a los ríos, por lo que es de suma importancia lograr un enfoque de aprovechamiento.

## **2.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS**

### ***2.6.1 Validación de métodos cromatográficos***

La validación se define, según la NOM-059-SSA1-1993, como "... la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos" (Cedillo-Ramírez, 2002).

ISO define validación como "La confirmación por medio de la examinación y la provisión de evidencia objetiva de que las exigencias particulares para un empleo específico se han cumplido." (Anónimo, 1998).

Un método debe ser validado cuando es necesario verificar que los parámetros a evaluar son adecuados para ese problema analítico en particular; por ejemplo:

- cuando se desarrolla un nuevo método para un problema en particular;

- cuando hay una revisión del método por el mejoramiento o por que se quiere extender a un nuevo problema,
- cuando el control de calidad de la empresa establece que un método cambia con el tiempo,
- cuando se establece el método en otro laboratorio, o con un diferente analista, o una instrumentación diferente, y
- para demostrar la equivalencia entre dos métodos (el método normalizado y el nuevo).

La validación de un método analítico consta de tres pasos: establecimiento de las condiciones por cumplir por parte de la metodología, determinados por normatividad o por cliente; determinación de los parámetros del procedimiento, determinados por el responsable que desarrolla la metodología; la valoración de los resultados, que es la comparación de los parámetros obtenidos con las condiciones establecidas y la decisión de validez del procedimiento para el propósito establecido (Anónimo, 1998).

Los parámetros cromatográficos típicos de la validación de métodos analíticos son. selectividad, linealidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad), recobro, límite de cuantificación, límite de detección, sensibilidad, robustez, estabilidad y exactitud.

### ***2.6.2 Parámetros para la validación de métodos cromatográficos evaluados en esta investigación (Anónimo, 1994; 1998; 2001)***

#### **A. Límite de detección y cuantificación**

El límite de detección es la concentración más baja del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales establecidas.

## **B. Linealidad**

Es una medida que asegura que la relación entre la respuesta obtenida (variable dependiente) por el instrumento y la concentración del analito (variable independiente) tiene una tendencia o comportamiento lineal; es decir, que obedezca a la Ley de Lambert-Beer y que tenga un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.98.

Si cumple con la Ley de Lambert-Beer entonces se procede a realizar una prueba de hipótesis a la ordenada al origen y a la pendiente, con el objetivo de determinar si la curva de calibración parte del origen.

## **C. Precisión**

La precisión es la medida de qué tan cercanos están los valores de los datos uno del otro para un número de medidas bajo las mismas condiciones analíticas.

La precisión tiene tres componentes: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Para los fines de esta investigación sólo se analizará la repetibilidad, que es una medida del desempeño del instrumento, bajo las condiciones cromatográficas y día probado. Esta medida determinará el límite de variación del análisis. Entre más estrecho sea el valor, uno puede esperar que los resultados sean más precisos o sensibles a la variación.

La repetibilidad se expresa como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación en porcentaje. Los resultados de esta prueba normalmente no deben ser mayores del 2 % del coeficiente de variación (o desviación estándar relativa) para concentraciones altas y no más del 5% para concentraciones del orden de trazas para técnicas cromatográficas. No obstante, se debe tomar en cuenta que ésta no considera las variaciones debidas a los procedimientos de preparación de muestras de laboratorio.

## **D. Recobro**

Los métodos analíticos no siempre miden todo el analito de interés presente en la muestra. Los analitos pueden estar presentes en las muestras en una variedad de formas, no todas del interés del analista. El método, por lo tanto, puede

deliberadamente ser diseñado para determinar sólo una forma particular del analito.

El recobro está relacionado con la eficiencia de la extracción de un método analítico dentro de los límites de variabilidad. Esta medida no necesita ser al 100 %, pero la extensión del recobro de un analito y el estándar interno deben ser consistentes, precisos y reproducibles.

El recobro se expresa como la relación entre la cantidad del compuesto de interés como porcentaje y la cantidad teórica presente en el medio.

#### **E. Estabilidad en solución**

Con este parámetro se puede observar el efecto que tiene el disolvente sobre el analito, bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Ello es debido a que muchas veces el analito puede experimentar una degradación y constituir una fuente de error al cuantificarlo. De esta manera se pueden establecer las condiciones de almacenamiento y tiempo en que la muestra puede ser analizada.

#### **F. Exactitud**

Es la medida de qué tan cercano está el valor experimental del valor verdadero. En un método analítico, la exactitud, describe la proximidad de los resultados promedio de las pruebas al valor verdadero (concentración del analito). La exactitud debe ser medida utilizando como mínimo cinco determinaciones y se expresa como porcentaje.

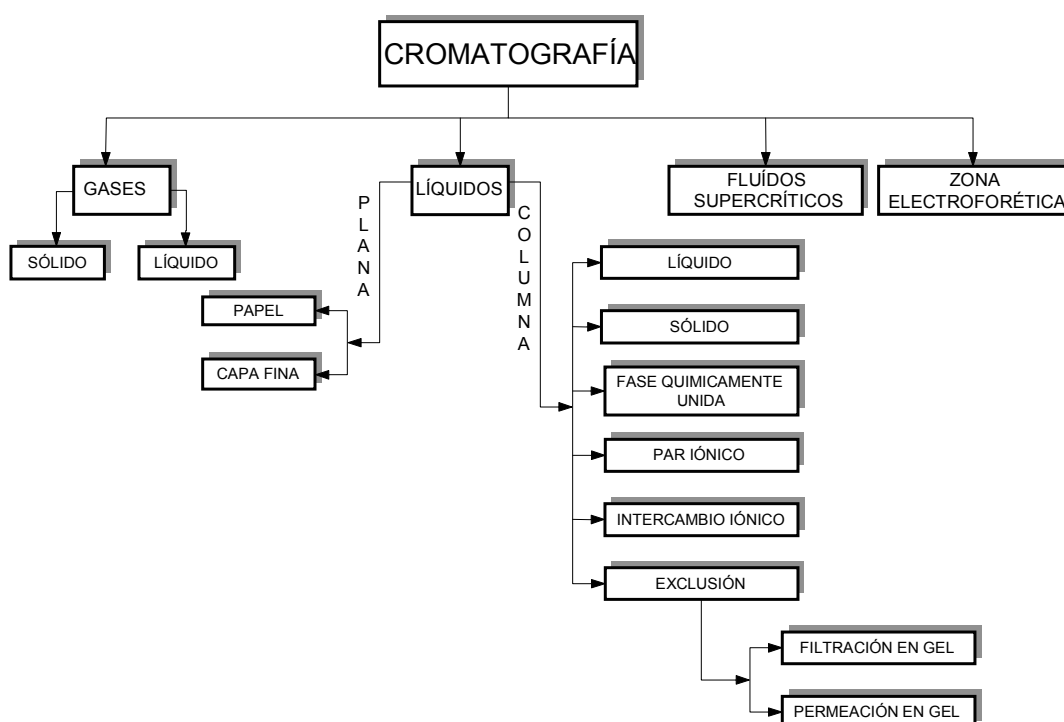
### **2.7 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra se distribuye entre dos fases: una estacionaria y una móvil. Cada uno de los componentes de la mezcla se retiene selectivamente, dependiendo de su afinidad con cada fase (Nair, 1973). Debido a esto se establece un equilibrio entre ambas

fases, el cual se puede representar por medio de una constante de equilibrio (Skoog, 2001):

$$K_{eq} = \frac{[Conc\ analito]_{FASE\ EST}}{[Conc\ analito]_{FASE\ MÓVIL}}$$

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía. La Figura 2.8 los presenta.



**Figura 2.8 Clasificación de la cromatografía (Skoog, 2001)**

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma “clásica”, la cual consistía de una columna de vidrio rellena con algún material, como sílice o alúmina en la que se introducía la muestra disuelta en la fase móvil; después se adicionaba más fase móvil para hacer eluir la muestra a través de la columna. Como el disolvente o fase móvil fluía a través de la columna por efecto de la gravedad, apenas se producía una débil presión ejercida para que la muestra pasara a través del relleno, con lo cual los tiempos de análisis se hacían muy

largos (horas o días). El material de relleno sólo se podía utilizar una vez debido a que parte de la muestra se absorbe en forma irreversible; además la identificación y cuantificación de los componentes eluidos debía realizarse con otras técnicas analíticas (Nair, 1973).

Debido a estos inconvenientes surgió la cromatografía de líquidos de alta resolución o CLAR por sus siglas en español (HPLC, por sus siglas en inglés), junto con todo el instrumental que lo compone y que permite grandes ventajas respecto a la forma “clásica”.

En este método se usan columnas de diámetro reducido rellenas de materiales pulverulentos. Este tipo de columnas son eficaces, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, por lo cual es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm), que hagan fluir la fase móvil (Nair, 1973).

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite que el sistema de registro procese dichos datos y se pueda obtener un cromatograma.

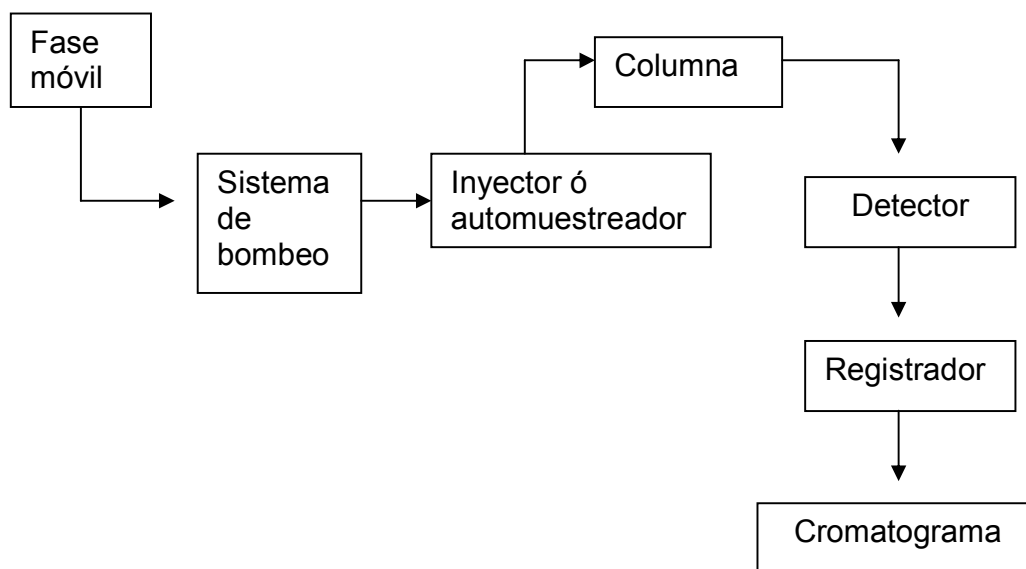
El desarrollo espectacular que tuvo la cromatografía de líquidos de alta resolución en la década de los sesenta condujo a la síntesis de las llamadas “fases estacionarias químicamente unidas”, en las cuales la fase estacionaria en lugar de estar impregnada sobre el soporte se encuentra unida químicamente a él por enlaces covalentes (Nair, 1973).

Como resultado de la versatilidad, las fases químicamente unidas han sido responsables del crecimiento de la cromatografía de líquidos en los últimos años. De lo cual se desprende otra clasificación de la cromatografía de líquidos, dependiendo de la polaridad de las fases involucradas en la separación, fase normal y fase reversa.

En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar respecto a la muestra. Las fases estacionarias típicas son cadenas “hidrocarbonadas” (C8 y C18) y las fases móviles están constituidas por mezclas de disolventes orgánicos y agua, tales como metanol-agua, acetonitrilo-agua, etc. (Cedillo-Ramírez, 2002).

### 2.7.1 Instrumentación

Los componentes esenciales que forman parte de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución se muestran en la Figura 2.9. A continuación se describirán los componentes del sistema cromatográfico.



**Figura 2.9 Esquema general de un cromatógrafo de líquidos**

#### A. Fase móvil

Aunque no es parte del instrumental propiamente dicho es importante recalcar ciertos aspectos importantes de la fase móvil como son: disolver a la muestra; debe ser de alta pureza; tener baja viscosidad; ser compatible con el tipo de detector; tener polaridad adecuada; ser inertes, no tóxicos, ser baratos o accesibles (Nair, 1973).

Los disolventes más utilizados en cromatografía de líquidos son: hexano-cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua.

La fase móvil se puede almacenar en recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico inerte, con capacidad de 1 y 3 L. La toma del disolvente generalmente se

hace filtrando previamente, con el objetivo de retener las pequeñas partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna (Skoog, 2001). Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido, que dentro del instrumento forman burbujas que pueden afectar el sistema de bombeo, disminuir la eficiencia de la columna y afectar el funcionamiento del detector, por lo que es conveniente desgasificar los disolventes.

Dependiendo de si la fase móvil mantiene el mismo poder de elución (composición) durante la corrida o varía, se puede trabajar bajo dos formas (Skoog, 2001):

- *Isocrática*. Se mantiene el mismo poder de elución; esto es, que se mantiene la misma composición de la fase móvil (la proporción del disolvente o los disolventes que la constituyen no varían en el tiempo que dure el análisis en el cromatógrafo).
- *Gradiente de elución*. Se varía el poder de elución, lo cual provoca una variación en la composición de la fase móvil durante el tiempo que dura el análisis cromatográfico.

## **B. Sistema de bombeo (Nair, 1973)**

Las columnas que se utilizan en la cromatografía de líquidos están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos. Los aspectos más importantes del sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente 400 atm).
- Intervalo de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 mL/min).
- Reproducibilidad y constancia del flujo (aproximadamente 1%).
- Características de flujo (continuo o pulsado).



De acuerdo a las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas: bombas neumáticas y bombas mecánicas.

En lo que atañe a las mecánicas existen dos tipos distintos:

- Bombas “reciprocantes” (pistón o diafragma).
- Bombas de desplazamiento continuo.

Debido a que se trabajó con un cromatógrafo de líquidos que tiene integrada una bomba de doble pistón (reciprocante), sólo se explicará el funcionamiento de dicha bomba.

La forma en como opera dicha bomba es la siguiente: mediante el movimiento de dos pistones sincronizados, los cuales tienen un sistema de válvulas (llamadas válvulas “check” que son esferas usualmente de cuarzo o zafiro), que alternadamente se abren y cierran, se llenan y vacían alternadamente una pequeña cámara, con el fin de que mientras uno de los pistones carga la cámara de fase móvil, el otro pistón expulsa hacia el sistema cromatográfico; con esto es posible mantener volúmenes y flujos constantes y eliminar las posibilidades de afectar el sistema cromatográfico.

### **C. Inyector**

Es el dispositivo por el cual la muestra es introducida al sistema cromatográfico, éste puede ser manual, empleando una jeringa de volumen adecuado, o automático como lo es en este trabajo; también llamado automuestreador; es el más usado actualmente, ya que minimiza los errores.

Los volúmenes que se manejan van de 5 a 200  $\mu\text{L}$  (Cedillo-Ramírez, 2002). Para este estudio el volumen inyectado fue de 20  $\mu\text{L}$ .

### **D. Columna**

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa, la columna es el “corazón” del sistema, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los

componentes de la muestra en estudio. A continuación se hace una descripción de las características generales de ésta.

Básicamente, la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte (usualmente acero inoxidable), de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones.

La longitud de la columna es, por lo general, de entre 10 y 30 cm, aunque en ocasiones puede ser más larga o más corta. El diámetro interno en la mayoría de los casos es de 3-4 mm, pero en columnas de tipo preparativo es de hasta más de 1 cm. Los empaques tienen un tamaño de partícula de 5 a 10  $\mu\text{m}$  (Skoog, 2001).

### **E. Detector**

Es el instrumento que mide en forma continua algunas propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra, generando una señal conforme éstos salen de la columna.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, o evaluar las cualidades de un cierto diseño, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales, tales como (Skoog, 2001):

- **Respuesta:** Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de compuestos o con sólo un tipo de compuestos en específico.
- **Sensibilidad:** Es la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.
- **Ruido:** Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por alguna falla electrónica, variaciones en el flujo o temperatura, fluctuaciones del voltaje o burbujas de aire atrapadas en el detector, entre otras.
- **Linealidad:** Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.

- **Estabilidad:** Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación del flujo. Los más usados son:
  - Detector UV.
  - Detector de índice de refracción.
  - Detector de fluorescencia.
  - Detector de fluorescencia inducida por láser.
  - Detectores electroquímicos.

El detector utilizado en el análisis de cafeína de esta investigación fue un detector UV-Visible de longitud de onda variable. Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz ultravioleta. Los analitos contenidos en la muestra que absorben dicha luz son llamados cromóforos y en general son compuestos con dobles ligaduras conjugadas y sistemas aromáticos, también pueden absorber algunos iones de compuestos inorgánicos y algunos cationes de los metales de transición.

#### **F. Sistema de adquisición y procesamiento de datos (registrador)**

Como su nombre lo indica, el objetivo de este sistema es adquirir las señales generadas por la muestra en el detector y procesar las mismas para hacer una representación gráfica (cromatograma); esto se puede lograr mediante un registrador, un integrador electrónico o una computadora.

## **2.8 SONIFICACIÓN (ULTRASONIDO)**

El ultrasonido es la parte del espectro del sonido con frecuencia de 16-120kHz, el cual está fuera del rango normal del oído humano.

El ultrasonido se transporta a través de la solución (líquido) y causan un aumento en la presión, alternando con una disminución de la misma. Durante el estado de presión baja se forman burbujas microscópicas, que crecen y durante el estado de presión alta, las burbujas colapsan liberando una enorme cantidad de energía y provocando vibraciones, las cuales llegarán a cada superficie abierta dentro del

espacio en el que se encuentra, a esto se le conoce como “cavitación” (Anónimo, 2000).

La influencia de varios factores para el éxito de la aplicación del ultrasonido puede ser resumida de la siguiente manera (Anónimo, 2007c):

**Frecuencia.** El aumento de la frecuencia lleva al descenso de la producción e intensidad de la cavitación. Este hecho puede ser explicado así: a frecuencias altas, el tiempo necesario para que una burbuja aparece como resultado de la cavitación crezca hasta un tamaño suficiente para afectar la fase líquida es demasiado pequeño.

**Solvente.** Los líquidos viscosos o con tensiones superficiales altas, producen una menor cavitación.

**Temperatura.** El aumento de la temperatura permite llevar a cabo la cavitación a intensidades acústicas más bajas. Eso es una consecuencia del aumento de la presión de vapor del solvente con el aumento de la temperatura.

Algunas aplicaciones del ultrasonido en la industria son en: procesamiento de carnes, cristalización y congelación, emulsificación, tratamiento de granos y secado entre otras (Anónimo, 2007b).

### ***2.8.1 Extracción de cafeína asistida por ultrasonido***

En general, la extracción con disolventes de los compuestos provenientes de material vegetal puede ser realizada por metodologías clásicas, como (Toma y col., 2001):

- 1.- Destilación.
- 2.- Extracción con disolvente.
  - a) Extracción con disolvente (filtración)
  - b) Maceración con el disolvente
  - c) Ebullición con agua (infusión)
  - d) Extracción en frío
  - e) Extracción en caliente
- 3.- Compresión en frío.

4.- Métodos más modernos, no convencionales como:

- a) Extracción con fluido supercrítico
- b) Extracción con vórtices
- c) Extracción con energía eléctrica
- d) Extracción con ultrasonido.

De todas ellas, se seleccionó la metodología de extracción por ultrasonido ya que es una metodología rápida y no contaminante (Tzanavaras y Themelis, 2006)

Los intervalos de sonido utilizados se pueden dividir en:

- a) Alta frecuencia, baja energía (MHz)
- b) Baja frecuencia, alta energía (kHz) (Manson y col., 1996).

En la Tabla 2.6 se muestran los efectos del sonido de baja frecuencia, ya que en este trabajo la frecuencia utilizada es de 47kHz.

Para fines de este trabajo solamente se analizó el efecto del ultrasonido de baja frecuencia sobre la superficie (extracción).

El mecanismo de extracción se puede dividir en dos etapas:

1. El material vegetal entra en contacto con el disolvente, efecto turgente.
- 2.- La transferencia de masa de los compuestos solubles del material vegetal al disolvente por un proceso de difusión y ósmosis.

Es durante la etapa 2 donde la energía producida por el ultrasonido, es utilizada para acelerar el proceso de extracción (Vinatoru, 2001).

**Tabla 2.6 Efectos del ultrasonido en alimentos (Manson y col., 1996)**

<b>Efecto ultrasonido en tecnología de alimentos</b>	
Efecto en células vivas	Estimulación de la actividad, Destrucción sonoquímica
Efecto en enzimas	Estimulación de la actividad, Control desnaturalización
Efecto sobre superficie	Aumentar impregnación Aumentar extracción

## ***CAPÍTULO III***

### ***METODOLOGÍA***

#### **3.1 Material**

- Balanza de un plato Ohaus
- Pinzas de tres dedos
- Anillos
- Soportes universales
- Frascos de vidrio con tapa (500 mL ) Schot Duran
- Frascos contenedores fase móvil (1 L) Simax
- Embudos de filtración rápida
- Matraces Erlenmeyer de 1000, 500, 250 y 125 mL
- Embudos de separación de 500 y 125 mL
- Pipetas de 10, 5, 2 mL
- Matraz aforado de 1000 y 100 mL
- Vasos de precipitado 250 mL
- Termómetro Brannan 10 a 260 °C
- Mortero con pistilo
- Probetas 250, 100 y 50 mL
- Micropipetas: Nichiryo (200-1000  $\mu\text{L}$ ); Brand (10-100  $\mu\text{L}$ ); High Tech Lab (0.5-10  $\mu\text{L}$ ).
- Tamices
- Parrilla PMC
- Filtros desechables de disco de 0.45  $\mu\text{m}$  de nylon Lida
- Equipo filtración rápida Perkin Elmer
- Viales de 40, 20 y 1 mL

#### **3.2 Muestras**

- El té negro fue adquirido en una tienda de autoservicio de una marca comercial transnacional, con número de lote U7012L2. El té negro fue

sacado de los sobres individuales y fue pasado por tamices de tamaño de partícula de 450  $\mu\text{m}$ , remoliendo cuando fue necesario para obtener más de un 80% del material original en este tamiz.

- El café y la pulpa de café fueron traídas del municipio de Xicotepec de Juárez, Puebla, México. Dichas muestras se trajeron secas y molidas, por lo que solamente se pasó por tamices hasta obtener un tamaño de partícula de 450  $\mu\text{m}$  en más de un 80% del material original.

### 3.3 Reactivos

Estándar de cafeína (Reactivo plus, Sigma-Aldrich, No. lote: 066K0085). Metanol grado CLAR (Reactivo HPLC, JT Baker, lote: C30C07). Agua desionizada. Ácido acético (Reactivo analítico 99.7%, JT Baker, lote: H07481). Cloroformo (Reactivo 99.9%, JT Baker, lote: V03C56). Ácido sulfúrico (Reactivo analítico 98.2%, Reactivos Analíticos, S.A. de C.V., lote: 060608GT). Hidróxido de sodio (grado técnico, Reactivos Golden Bell). Hidróxido de potasio (Reactivo Baker 86.8%, JT Baker, lote: V41056). Óxido de magnesio (Reactivo analítico QP, JT Baker, lote: 623346). Fenoftaleína (Reactivo, JT Baker, lote: F19720). Rojo de metilo (Sigma México, S.A. de C.V., lote: 7763). Verde de bromocresol al 1% (Sigma México, S.A. de C.V., lote: 17028V). Ácido bórico (Reactivo analítico lote: E277-6). Sulfato de potasio (Reactivo Baker 98.8%, JT Baker, lote: Y09C11). Sulfato de cobre pentahidratado (Reactivo analítico 99.3%, Mallinckrodt AR lote: 4844KTAL). Sacarosa (Reactivos Golden Bell, lote: 0703411). Acetona (Reactivo analítico, JT Baker, lote: T30312). Alcohol etílico (Reactivo analítico 94.2%, JT Baker, lote: C36C05). Ácido nítrico (Reactivo analítico 66%, JT Baker, lote: B48031).

### 3.4 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución: Bomba Varian inert 9012, automuestreador Varian 9100, columna empacada de fase

estacionaria C8 Vydac (tamaño de partícula 5 $\mu$ m, diámetro 4.6 mm y 250 mm de longitud) 208Tp54; detector UV Varian 9065Polichrom.

- Analizador elemental Carlo Erba EA-1100. No. de serie 962922, intervalo de medición 0-100%.
- Baño ultrasónico Bransonic 1210. Frecuencia 47 kHz, potencia 80 W, modelo 121OR-MT.
- Digestor Labconco, No. de serie: 242806.
- Equipo micro- Kjeldahl Labconco, No. de serie 000292795H.

### **3.5 Condiciones cromatográficas**

Las condiciones que a continuación se muestran fueron para todas las pruebas a realizar.

- Fase móvil: 70:30 (agua: metanol) a pH de 3 con ácido acético
- Flujo: 1 mL/min
- Volumen inyección: 20  $\mu$ L
- Longitud de onda: 273 nm (detector UV)

### **3.6 Elección de la composición de la fase móvil**

Con base en lo encontrado en la literatura (Anónimo, 1999; Horwitz, 2000), se decidió usar metanol y agua como componentes de la fase móvil. Se preparó una disolución de cafeína estándar con una concentración de 100 ppm; se inyectaron por triplicado 20  $\mu$ L de dicha disolución para cada composición de la fase móvil. Las composiciones probadas fueron: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 y 20% de metanol y se escogió la composición en donde se usara la mínima cantidad de metanol y la resolución del pico fuera adecuada. En la literatura se encontró que un pH de 3 era el más adecuado (Anónimo, 1999).



### **3.7 Elección de la longitud de onda**

Se analizaron las inyecciones realizadas en la determinación de la fase móvil a diferentes longitudes de onda para determinar aquella donde hubiera una mayor absorción. Las longitudes de onda probadas fueron: 224, 254, 268, 273, 278 y 282 nm.

### **3.8 Linealidad**

Para la realización de la curva de calibración se prepararon 14 disoluciones de cafeína, las cuales fueron preparadas de la siguiente manera: se pesaron 2 mg de cafeína y se llevaron al aforó de 20 mL con agua desionizada. De esta solución “madre” (“stock”, en inglés) se tomaron alícuotas con las micropipetas de: 900, 800, 700, 650, 600, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 100 y 50  $\mu$ L y se aforó a 1mL con agua desionizada.

Las 14 disoluciones estándar de cafeína (5, 10, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 80, 90 y 100 mg/L); se inyectaron por triplicado y se obtuvo la curva de calibración, misma que se analizó estadísticamente para corroborar su linealidad.

### **3.9 Precisión y exactitud**

De la disolución de 50 ppm preparada para la realización de la curva de calibración se hicieron 6 inyecciones consecutivas de 20  $\mu$ L. Con los resultados obtenidos se prosiguió a hacer un análisis estadístico para calcular tales parámetros.

### **3.10 Determinación de la estabilidad de cafeína**

Se prepararon 2 disoluciones de cafeína de 100 ppm en agua y otras 2 en metanol. Se almacenaron en el cuarto frío (4°C) una disolución de cafeína en agua y otra en metanol; los duplicados se dejaron a temperatura ambiente.

Se realizaron cuatro inyecciones de cada una de las disoluciones en los días: 1, 2, 4 y 7. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico correspondiente.

### **3.11 Determinación del límite de detección y cuantificación**

Se prepararon disoluciones de concentración (4, 3, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.3 y 1 mg/L) y se inyectaron por triplicado.

El criterio de evaluación para el límite de detección fue con base en el ruido que presentara el cromatograma, el cual impedirá la detección del pico correspondiente a la cafeína.; para el límite de cuantificación fue cuando el integrador (registrador) ya no cuantifico la altura del pico correspondiente a la cafeína.

### **3.12 Desarrollo de la metodología de extracción por baño ultrasónico**

#### ***3.12.1 Concentración óptima***

Se pesaron 10, 20, 30, 50, 75 y 100 mg del estándar de cafeína y se llevaron al aforo de 5 mL con agua desionizada; se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L respectivamente; se aforaron a 10 mL y se sometieron al baño ultrasónico durante 30 min. Se realizaron 5 inyecciones consecutivas en el cromatógrafo de líquidos.

Con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones de cafeína en cada una de ellas; se obtuvo el porcentaje de recobro y se determinó la concentración óptima (mayor porcentaje de recobro).

#### ***3.12.2 Volumen óptimo***

Se prepararon 6 disoluciones con una concentración aproximada de 50 ppm; para la realización de éstas se pesaron 30 mg de cafeína y se llevaron a los siguientes aforos: 2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 mL.

Se realizó una dilución tomando las siguientes alícuotas: 21, 42, 83, 125, 167 y 200  $\mu$ L, respectivamente; se llevó al aforo de 5 mL y se pusieron en el baño ultrasónico 30 min; se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Se calcularon las concentraciones, el porcentaje de recobro y se determinó el volumen óptimo.

### **3.12.3 Tiempo óptimo**

Conociendo la concentración y el volumen óptimo se determinó el tiempo, se hicieron 4 disoluciones de una concentración teórica de 49.8 mg/L; se probaron los siguientes tiempos: 10, 15, 30, 40 min en el baño ultrasónico. Con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones, el porcentaje de recobro y se determinó el tiempo óptimo.

### **3.13 Determinación de cafeína por CLAR en muestras de café, té negro y pulpa de café**

Se pesó la cantidad de muestra equivalente a el posible contenido de cafeína contenida en la dilución realizada en la determinación del tiempo óptimo, 8.5 mg de té negro, 25 mg de café y 25 mg de pulpa de café; se llevaron al aforo de 5 mL con agua desionizada. Se realizaron 3 inyecciones de 20 µL en el cromatógrafo para cada muestra; la solución restante de cada muestra se sometió 30 min al baño ultrasónico y se hicieron 3 inyecciones de cada extracto; los extractos restantes de cada muestra fueron pasados por un filtro de jeringa con tamaño de poro de 45 µm, eluidos con 2 mL de metanol y se inyectaron por triplicado. A los resultados obtenidos de cada paso se les calculó la concentración y el porcentaje de recobro.

### **3.14 Cuantificación de cafeína en las muestras de café, té negro y pulpa de café por el método AOAC Método Bailey-Andrew (Horwitz, 2000)**

#### **3.14.1 Café y pulpa de café (960.25)**

Se pesaron 2 g de muestra, 5 g de MgO y 150-200 mL de agua en un matraz Erlenmeyer de 500 mL; se calentó hasta ebullición durante 45 min. Se adicionó la cantidad de agua necesaria para evitar la formación de espuma. Se enfrió a temperatura ambiente y se pesó.

Se filtraron 50 mL de disolución en una probeta graduada (equivale a la mitad del peso de la muestra). Se transfirió la solución a un embudo de separación de 125

mL y se lavó con 2 mL agua. Se adicionaron 4 mL de ácido sulfúrico (1+9) y se hicieron 5 extracciones con 10 mL de cloroformo; después se añadió 5 mL de una solución KOH al 1%, se agitó vigorosamente por un minuto permitiendo que la emulsión se separara y se drenó el cloroformo a través de algodón dentro de un frasco de Kjeldahl. Se extrajo la solución de KOH con 5mL de cloroformo y se añadió en el frasco Kjeldahl. Se colocaron los frascos en el digestor y se procedió a realizar el análisis de micro-Kjeldahl. Para obtener el valor de cafeína se consideró que 1 mL 0.02 M de ácido sulfúrico = 0.971 mg de cafeína.

### **3.14.2 Té negro (925.17)**

Se pesaron 5 g de muestra, 10 g de MgO y 500 mL de agua en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL; se calentó hasta ebullición durante 2 h. Se adicionó la cantidad de agua necesaria para evitar la formación de espuma. Se enfrió a temperatura ambiente y se pesó.

Se filtraron 200 mL de disolución en una probeta graduada. Se transfirió la solución a un embudo de separación de 500 mL y se lavó con 2 mL agua. Se adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico (1+9) y se hicieron 6 extracciones con 25, 20, 15 y 10 mL. La última operación se repitió dos veces más, cada una con 10 mL de cloroformo. Después se añadieron 5 mL de una solución KOH al 1 %; se agitó vigorosamente por un minuto permitiendo que la emulsión se separara y se drenó el cloroformo dentro un frasco de Kjeldahl. Se extrajo la solución de KOH con 5 mL de cloroformo y se añadió en el frasco Kjeldahl y se evaporó a un volumen menor a 25 mL; se colocaron los frascos en el digestor y se procedió a realizar la digestión y la destilación en un aparato micro-Kjeldahl. Para obtener el valor de cafeína se consideró que 1 mL de ácido sulfúrico 0.05 M = 4.85 mg de cafeína.

### **3.15 Extracción de cafeína por el método AOAC Método Bailey-Andrew y su cuantificación por medio de un analizador elemental**

Se realizó el mismo procedimiento de extracción para cada muestra señalado en el inciso 3.14; habiendo obtenido los extractos en cloroformo, se pesaron entre 1 y

6 mg de los extractos en cloroformo y se colocaron en una minicápsula de estaño con material adsorbente; después se introdujo a un analizador elemental marca Carlo Erba, como ya se mencionó en el inciso de equipos y se determinó el % de nitrógeno en cada extracto. En las Figuras 2.2 y 2.3 del Capítulo 2 se mostraron los procedimientos para la extracción de cafeína por el método AOAC para café y pulpa de café y para el té negro, respectivamente.

### **3.16 Recobro**

#### ***3.16.1 Recobro en CLAR***

Se preparó una solución “madre” de 49.8 ppm, pesando 30 mg del estándar de cafeína y se aforaron a 10 mL; después se tomó una alícuota de 83  $\mu$ L y se llevaron a 5 mL con agua desionizada. Se pesaron 8.5 mg de té negro y 25 mg de café y pulpa de café; se adicionó 0.5 mL de la disolución stock preparada anteriormente y se aforaron a 5 mL. Después se inyectaron (20  $\mu$ L) por triplicado las muestras y el resto de éstas se colocaron en el baño ultrasónico por 30 min; se inyectaron (20  $\mu$ L) por triplicado cada muestra y posteriormente el resto de las muestras se pasaron por un filtro de 45  $\mu$ m y se inyectaron por triplicado. Con los datos obtenidos en cada fase se determinó la concentración y la cantidad del analito que se pierde en cada paso del procedimiento.

#### ***3.16.2 Recobro por el método AOAC y con el analizador elemental***

Se preparó una solución stock de cafeína con 15 mg, la cual se aforó a 50 mL con agua. Se preparó la muestra como se señala en el inciso 3.15 y se le adicionaron 5 mL de la solución stock de cafeína; se continuó con el proceso de extracción como se marca en el inciso mencionado. Al final del análisis se calculó la concentración y el porcentaje de recobro.

### **3.17 Análisis estadístico**

A continuación se describen los análisis estadísticos empleados en cada uno de los parámetros de la validación (Stephens y Spiegel, 2002).

### 3.17.1 Linealidad

Para el análisis de este parámetro se realizó una regresión lineal, para la cual se utilizó un programa de computadora. El criterio de aceptación internacional (Anónimo, 1994) para la linealidad del sistema es que debe obtenerse gráficamente una tendencia lineal de los datos obtenidos y que el valor del coeficiente de correlación de la regresión lineal aplicada a los datos de la curva sea:  $r^2 \geq 0.98$  ó  $r \geq 0.98$ .

Si cumple con estas condiciones, se aplica una prueba de hipótesis a la ordenada y a la pendiente, obtenidas de la regresión, para determinar si la curva de calibración parte del origen y si la línea de tendencia es la más adecuada para la descripción lineal. Posteriormente, se calculan los intervalos de confianza, tanto para la ordenada, como para la pendiente de la curva obtenida.

En la prueba de hipótesis a la ordenada y a la pendiente se establecen las siguientes hipótesis:

Ho:  $\varphi=0$

H1:  $\varphi \neq 0$

donde  $\varphi$  es el valor de la ordenada ó de la pendiente según sea el caso.

Se utiliza para este estudio la "t de student", con grados de libertad n-2, con un nivel de significancia del 95 % ( $\alpha= 0.05$ ).

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{x})^2}}$$

donde:

b = Ordenada al origen.

$\beta$  = Ordenada al origen poblacional ( $\beta = 0$ ).

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

$\bar{x}$  = Media experimental.

Ya que se trata de un ensayo bilateral ó de dos colas, donde  $\alpha$  es el nivel de significancia, que se toma del 5 % ( $\alpha = 0.05$ ), que corresponde a un valor usual de riesgo de cometer un error y que se toma a nivel internacional en el desarrollo de la mayoría de las metodologías analíticas; el error típico de estimación se calcula de la siguiente forma:

$$Se = \sqrt{\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n-2)nSxx}}$$

donde:

$$Sxx = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n X_i \right)^2$$

$$Sxy = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left( \sum_{i=1}^n X_i \right) \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right)$$

$$Syy = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right)^2$$

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

t cal. <  $-t_{\alpha/2}$  ó tcal. >  $t_{\alpha/2}$

Para calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{Sxx + (n\bar{x})^2}{nSxx}}$$

Para calcular el intervalo de confianza para la pendiente con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

### 3.17.2 Precisión y exactitud

La precisión se puede definir como el grado de concordancia en las mediciones de concentración de la cafeína. Se ha establecido para este parámetro que el coeficiente de variación debe de ser menor al 2 %.

La desviación estándar se calculó con la siguiente ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (X_j - a)^2}{n}}$$

donde:

a= altura del pico promedio

X<sub>j</sub> = altura del pico

n = número de determinaciones

El coeficiente de variación expresado como porcentaje se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%CV = \frac{S}{a} \times 100$$

Los resultados de esta prueba normalmente no deben ser mayores del 2 % del coeficiente de variación (o desviación estándar relativa) para concentraciones altas y no más del 5 % para concentraciones del orden de trazas para técnicas cromatográficas.

La exactitud es la medida de qué tan cercano está el valor experimental del valor verdadero.

Se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%CV = \frac{S_{concentración\ exp}}{Conc.\ estd.\ _{teo}} \times 100$$



### 3.17.3 Estabilidad en disolución

El análisis estadístico de este parámetro fue por medio de tablas de análisis de varianza o AN de VA. Las pruebas de hipótesis para este análisis son:

Ho: no existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento.

H1: sí existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento.

Y

Ho: no existe diferencia significativa entre los días de almacenamiento.

H1: sí existe diferencia significativa entre los días de almacenamiento.

Con un nivel de significancia del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).

Factor de corrección:

$$FactorC = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^k (X_{in} + X_{jn})^2$$

Suma de cuadrados entre tratamientos

$$SCE = \frac{1}{n} \left( \left( \sum_{n=1}^k X_{jn} \right)^2 \left( \sum_{n=1}^K X_{in} \right)^2 \right) - FactorC$$

Suma de cuadrados dentro de tratamientos

$$SCD = \frac{1}{n} \left( \sum_{n=1}^k (X_{in} + X_{jn}) \right) - FactorC$$

Suma de cuadrados total

$$SCT = \sum_{n=1}^k (X_{an})^2 - FactorC$$

Suma de cuadrados del error

$$SCe = SCT - (SCE + SCD)$$

Cuadrado medio entre tratamientos

$$CME = \frac{SCE}{a - 1}$$

Cuadrado medio dentro de tratamientos

$$CMD = \frac{SCD}{n - 1}$$

Cuadrado medio del error

$$CMe = \frac{SCe}{n - 1}$$

Fisher entre tratamientos

$$FE = \frac{CME}{CMe}$$

Fisher dentro de tratamientos

$$FD = \frac{CMD}{CMe}$$

donde:

N = Número total de datos

n= Número de datos en cada tratamiento

i= primer tratamiento

j= segundo tratamiento

a= número de tratamientos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher Calculada
FV	SC	Gl	CM	Fc

Muestras (tratamientos)	SCE	a-1	CME	
Entre n	SCD	n-1	CMD	
Error	SCe	n-1	CMe	
Total	SCT			

Para rechazar la hipótesis nula (Ho), se utiliza el siguiente criterio:

$F_{calculada} > F_{tablas}$

### **3.17.4 Recobro**

La pérdida del analito a través del proceso fue evaluada calculando el porcentaje de recobro.

Para obtener el % de recobro se aplica la siguiente operación:

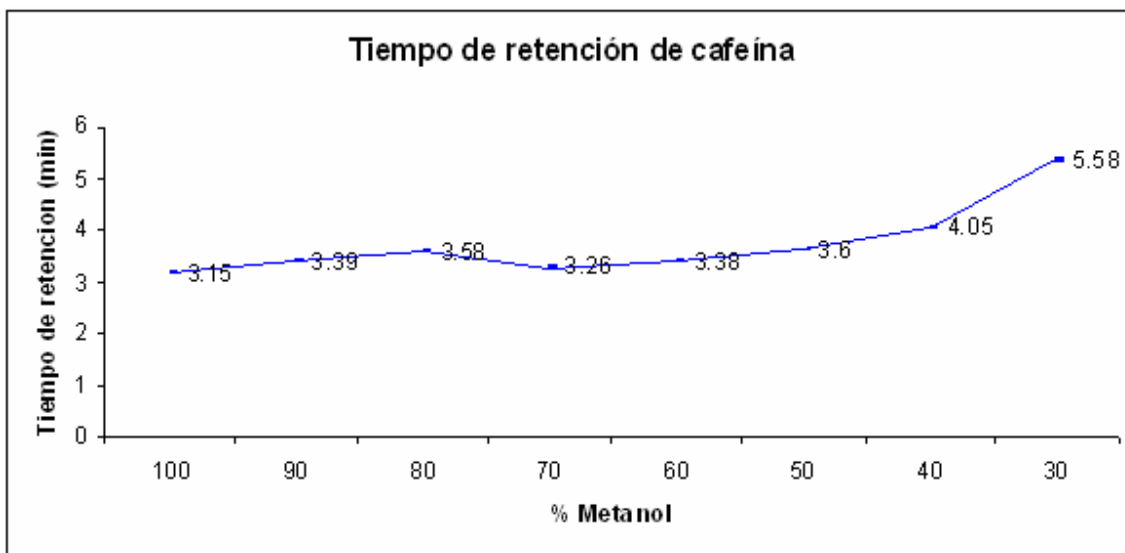
$$\%recobro = \frac{[Conc.analito]_{experimental}}{[Conc.analito]_{teórica}} \times 100$$

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Determinación de condiciones cromatográficas óptimas (fase móvil, $\lambda_{\max}$ , disolvente)

Como se mencionó en el capítulo anterior, se utilizaron metanol y agua a un pH de 3 como componentes de la fase móvil. De las pruebas que se realizaron para obtener la composición de la fase móvil y determinar el tiempo de retención de la cafeína, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4.1.



**Figura 4.1** Tiempo de retención de la cafeína a diferente composición de la fase móvil

El criterio que se tomó en cuenta para determinar la mejor fase móvil fue el porcentaje mínimo de metanol en donde se obtuviera una buena resolución. Con base en estos experimentos, se decidió que fuera 70% de agua y 30% de metanol y que el tiempo de retención fuera de 5.58 min

Una vez determinada la composición de la fase móvil se analizaron los cromatogramas de la fase móvil elegida a diferentes longitudes de onda para determinar cual tenía la máxima absorción. De este análisis se concluyó que la

mejor longitud de onda fue 273 nm, lo que concuerda con lo reportado para cafeína (Popl y col., 1990).

Analizando los cromatogramas se determinó que el mejor disolvente es el agua, ya que presentó una mayor área y un pico más definido.

## **4.2 Validación**

El método desarrollado se validó en términos de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, estabilidad del compuesto a través del tiempo, a dos diferentes temperaturas (temperatura ambiente en los laboratorios,  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y de refrigeración,  $4^{\circ}\text{C}$ ) y porcentaje de recobro.

### **4.2.1 Linealidad**

Para evaluar la linealidad se realizó una curva patrón, en donde se evaluaron por triplicado 14 concentraciones que fueron de 5-100 ppm y se integraron respecto a la altura del pico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.1. En la Figura 4.2 se muestra la curva de calibración.

Como se puede apreciar en la Figura 4.2, los resultados presentan una tendencia lineal; esto se puede corroborar con el cálculo de la regresión lineal, la cual dio como resultado lo siguiente:

- Pendiente (m) = 245.65 L/mg
- Ordenada al origen (b) = -49.467
- Coeficiente de correlación = 0.9972

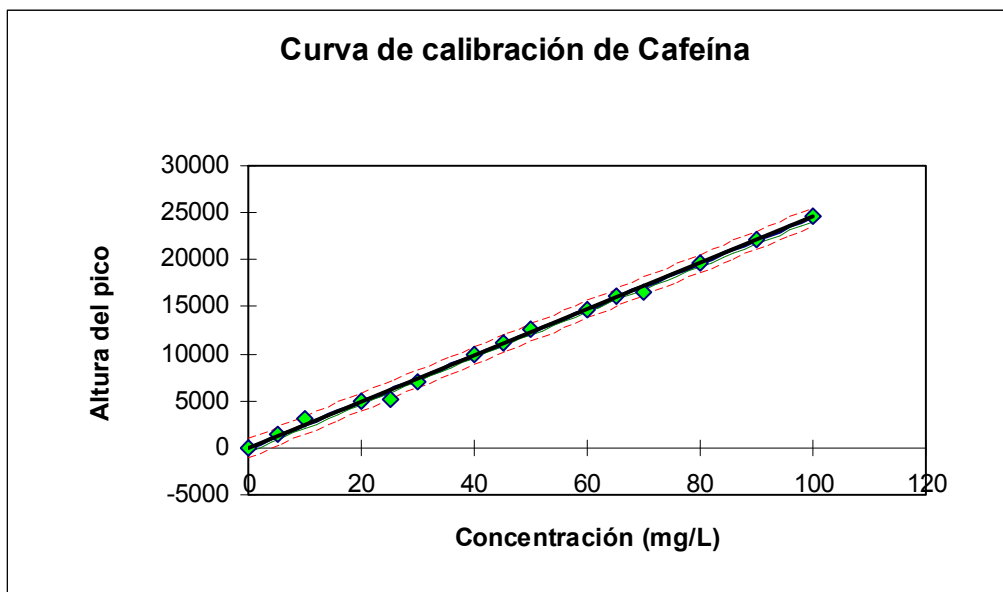
El coeficiente de correlación obtenido cumple con lo establecido en el Capítulo II para la linealidad.

Después de los cálculos anteriores respecto a la linealidad de la curva de calibración, es necesario determinar si la curva patrón parte del origen, llevando a cabo un análisis estadístico a la ordenada de la ecuación de regresión. Como ya se dijo en el capítulo anterior, el análisis estadístico llevado a cabo fue la "t" de student con un nivel de significancia del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ) y se obtuvieron los

resultados mostrados en la Tabla 4.2. Con este resultado es posible afirmar que la recta tiene ordenada al origen igual a cero.

**Tabla 4.1 Curva estándar de cafeína**

Concentración (mg/L)	Altura promedio
5	1321
10	3048
20	4923
25	5070
30	6961
40	9841
45	11054
50	12639
60	14757
65	16110
70	16515
80	19717
90	22171
100	24627



**Figura 4.2 Curva de calibración de cafeína**

**Tabla 4.2 Prueba de hipótesis para la ordenada al origen**

Hipótesis sobre ordenada origen , estimada b= -49.4666 ; riesgo $\alpha = 0.05$			
H <sub>0</sub> b=0	"t" calculada	"t" tablas	Decisión
H <sub>1</sub> b<0	-0.2521	-1.7709	Acepto H <sub>0</sub>
H <sub>1</sub> b≠0	-0.2521	2.1604	Acepto H <sub>0</sub>

Se realizó otra prueba de hipótesis, en este caso para la pendiente de la recta con los datos de la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3 Prueba de hipótesis para la pendiente**

Hipótesis sobre la pendiente, estimada m=245.652115 ; riesgo $\alpha = 0.05$			
H <sub>0</sub> m=0	"t" calculada	"t" tablas	Decisión
H <sub>1</sub> m<0	68.8796	1.7709	Rechazo H <sub>0</sub> Riesgo a = 2.365E-18
H <sub>1</sub> m≠0	68.8796	2.1604	Rechazo H <sub>0</sub> Riesgo a = 4.73E-18

Después se prosiguió a determinar los intervalos de confianza para cada uno de los valores analizados y se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	m	b	R	r <sup>2</sup>
Cafeína	246 ±8	0±400	0.9986	0.9972

#### **4.2.2 Límite de detección y cuantificación**

Después de haber inyectado por triplicado las disoluciones de concentraciones 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.3 y 0.1 ppm, se analizaron los cromatogramas y se determinó: que el límite de detección (concentración más baja a la cual el analito puede ser detectado bajo las condiciones cromatográficas establecidas) fue de 1 ppm, ya que fue la concentración a la cual se pudo observar de manera adecuada el pico

correspondiente a la cafeína, sin que se confundiera con el ruido del sistema; y que el límite de cuantificación fue de 3ppm (concentración más baja a la cual el analito puede ser cuantificado bajo las condiciones cromatográficas establecidas), concentración a la cual el sistema aún pudo cuantificar la cafeína.

#### **4.2.3 Precisión y exactitud**

La precisión es la medida de qué tan cercanos están los valores de los datos uno del otro para un número de medidas bajo las mismas condiciones analíticas. En este estudio se evaluó la repetibilidad y fue determinada por el cálculo de la desviación estándar de 6 inyecciones consecutivas de la concentración media (50 ppm). El valor de la desviación fue de 21.1463 con un coeficiente de variación de 0.1673%. El desempeño del instrumento CLAR bajo las condiciones cromatográficas fue bueno, ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2%.

Esto quiere decir que la cromatografía es un buen método para determinar cafeína, aunque cabe recalcar que siempre se debe tomar en cuenta que éste no considera variaciones debidas a la manufactura y procedimientos de preparación de muestras de laboratorio.

Para evaluar la exactitud se determinó calculando la desviación del promedio de cafeína del valor real, dando como resultado un porcentaje de 0.1738, lo cual indica que los valores determinados se desvían del valor real un 0.1738%.

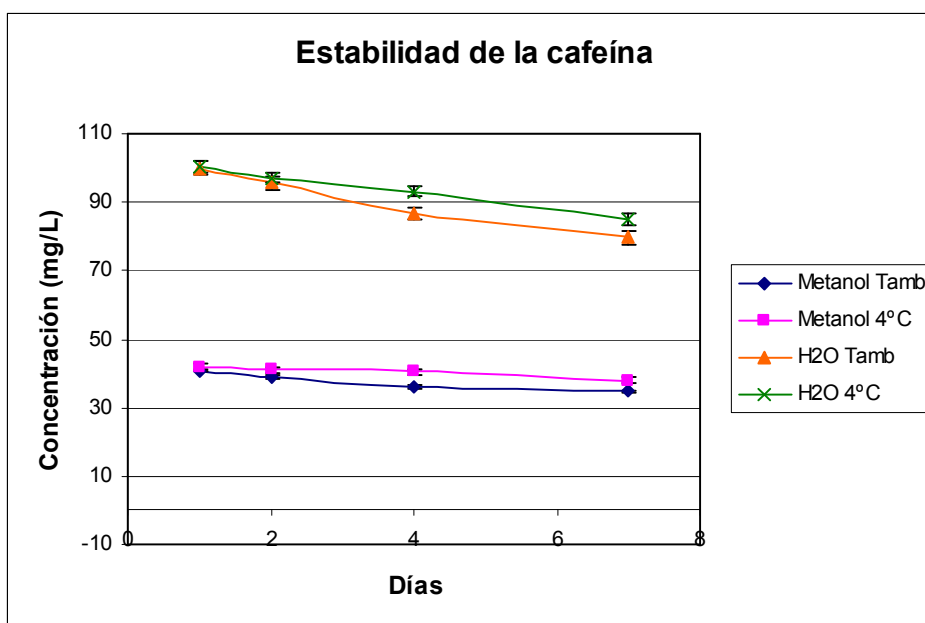
#### **4.2.4 Estabilidad de la cafeína**

Como se indicó en el Capítulo III, Metodología, se analizó la estabilidad de la cafeína en dos matrices, en agua y en metanol, durante 7 días a diferentes temperaturas y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4.4 y en la Figura 4.3.



**Tabla 4.4 Estabilidad de la cafeína en agua y metanol**

Concentración ppm				
día	METANOL		AGUA	
	Tamb, 20±2°C	T, 4°C	Tamb, 20±2°C	T, 4°C
1	40.8293±0.0403	41.7646±1.9144	99.9123±1.4647	100.3103±0.3532
2	38.9028±0.3729	41.0593±1.4636	95.5107±1.8866	97.1778±1.3198
4	36.0705±0.2348	40.4996±0.1937	86.7239±1.6082	93.1883±1.9333
7	34.6569±0.6231	38.0184±1.5295	79.7241±2.5316	84.8442±2.9433



**Figura 4.3 Estabilidad de la cafeína en agua y metanol**

Con los datos obtenidos se hizo el análisis estadístico ANdeVA para determinar si había diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento para cada uno de los disolventes. En las Tablas 4.5 y 4.6 se muestran los resultados de este análisis, que demuestran que sí hay diferencias significativas entre las dos temperaturas estudiadas.

**Tabla 4.5 Prueba de hipótesis para metanol (°C)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Fisher tablas	Criterio
FV	SC	gl	CM	Fc	Ft	FcvsFt
Muestras (tratamientos)	59.2238	1	59.2238	39.57	4.54	Fc>Ft
Entre n	121.9401	15	8.1293	5.43	2.4	Fc>Ft
Error	22.4500	15	1.4966			
Total		31				
Conclusión: Se rechaza Ho; es decir sí existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento						

**Tabla 4.6 Prueba de hipótesis para agua (°C)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Fisher tablas	Criterio
FV	SC	Gl	CM	Fc	Ft	FcvsFt
Muestras (tratamientos)	93.1544	1	93.1544	13.0106	4.54	Fc>Ft
Entre n	1493.1934	15	99.5462	13.9033	2.4	Fc>Ft
Error	107.3979	15	7.1598			
Total		31				
Conclusión: Se rechaza Ho; es decir sí existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento						

Para determinar si realmente hubo una degradación del analito a través de los días para cada uno de los disolventes se realizó un análisis estadístico ANDeVA a un nivel de significancia del 95%. En las Tablas 4.7 y 4.8 se muestran los resultados de este análisis, que demuestran que sí hay diferencias significativas en las muestras con respecto al tiempo de almacenamiento para las dos temperaturas en estudio.

**Tabla 4.7 Prueba de hipótesis para el metanol (días)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Fisher tablas	Criterio
FV	SC	Gl	CM	Fc	Ft	FcvsFt
<b>Metanol a 4°C</b>						
Muestras (días)	31.8598	3	10.6200	8.8307	4.26	Fc>Ft
Entre T°C	7.4507	3	2.4836	2.0651	4.26	Fc<Ft
Error	10.8235	9	1.2026			
Total		15				
Conclusión: Se rechaza Ho; es decir sí existe diferencia significativa entre los días						
<b>Metanol a temperatura ambiente, 20±2°C</b>						
Muestras (días)	92.5038	3	30.8346	216.9390	4.26	Fc>Ft
Entre T°C	0.4731	3	0.1577	1.1096	4.26	Fc<Ft
Error	1.2792	9	0.1421			
Total		15				
Conclusión: Se rechaza Ho; es decir sí existe diferencia significativa entre los días						

Con base en las Tablas 4.5 a 4.8 se determinó la estabilidad de la cafeína, llegando a lo siguiente:

La cafeína se ve afectada tanto por la temperatura de almacenamiento, como por el transcurso de los días. Esto corrobora lo que es posible apreciar en la Figura 4.3, donde se muestra que la cafeína se degrada a través del tiempo, en menor proporción a una temperatura de 4 °C con respecto a la ambiental, siendo el mejor disolvente el agua.

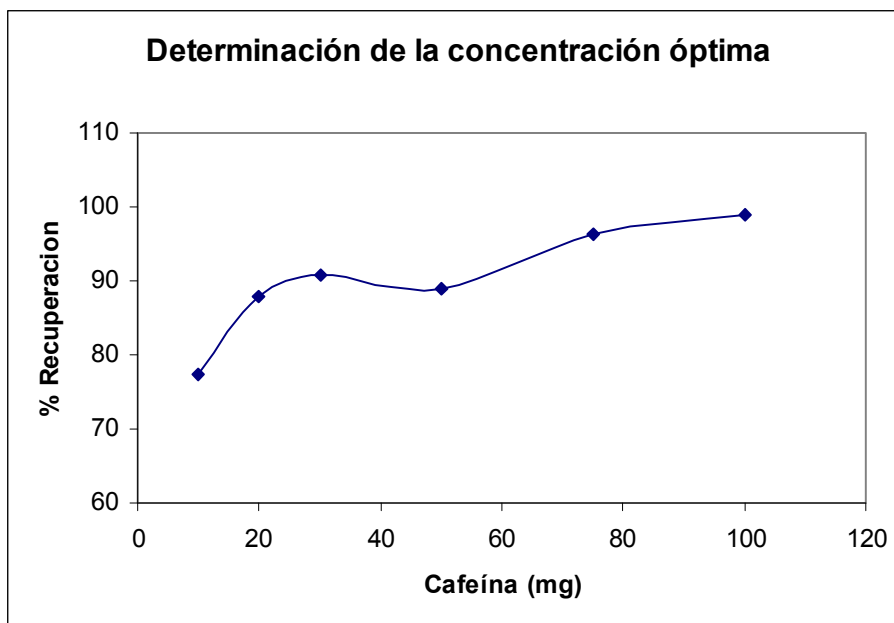
**Tabla 4.8 Prueba de hipótesis para el agua (días)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Fisher tablas	Criterio
FV	SC	Gl	CM	Fc	Ft	FcvsFt
<b>Agua a 4°C</b>						
Muestras (días)	537.3936	3	179.1312	55.6230	4.26	Fc>Ft
Entre T°C	13.8193	3	4.6064	1.4303	4.26	Fc<Ft
Error	29.9840	9	3.2204			
Total		15				
Conclusión: Se rechaza Ho; es decir sí existe diferencia significativa entre los días						
<b>Agua a temperatura ambiente, 20±2°C</b>						
Muestras (días)	976.3026	3	325.4342	103.6638	4.26	Fc>Ft
Entre T°C	15.8380	3	5.2793	1.6817	4.26	Fc<Ft
Error	28.2540	9	3.1393			
Total		15				
Conclusión: Se rechaza Ho; es decir sí existe diferencia significativa entre los días						

### 4.3 Desarrollo de la metodología de extracción por baño ultrasónico

#### 4.3.1 Concentración óptima

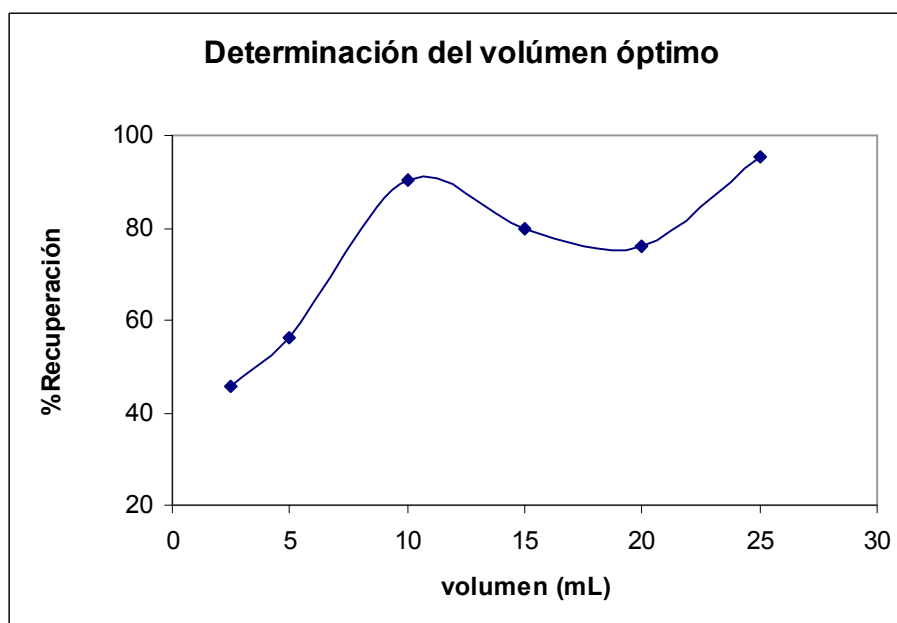
Al evaluar todas las concentraciones de cafeína en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución bajo las condiciones establecidas, se obtuvieron los porcentajes de recobro y se determinó la concentración óptima para la extracción. En la Figura 4.4 se muestra el comportamiento de la extracción, obteniéndose el mayor porcentaje de recobro a una concentración mínima de 30 mg de cafeína.



**Figura 4.4 Determinación de la concentración óptima de cafeína**

#### **4.3.2 Volumen óptimo**

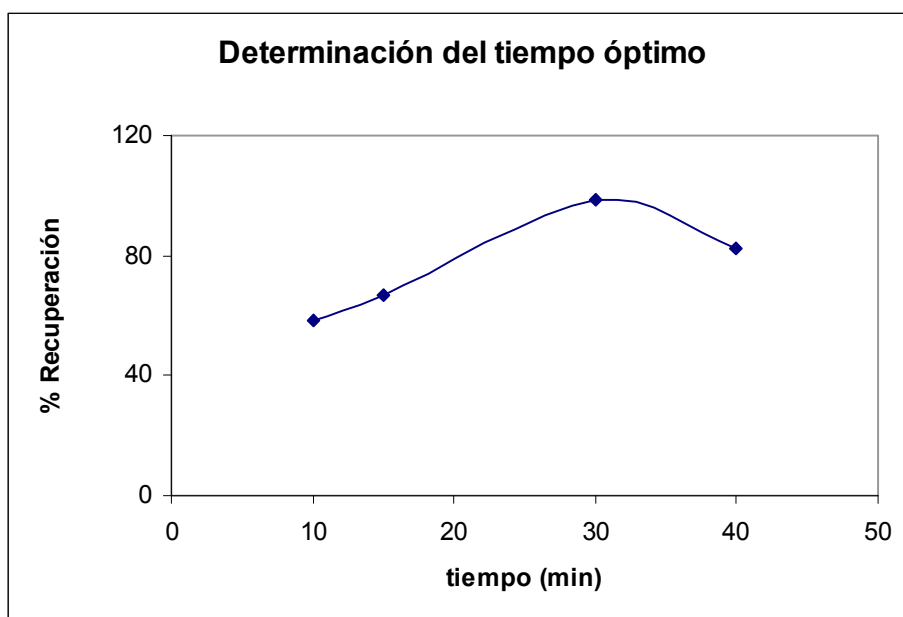
Al evaluar los diferentes volúmenes se pudo determinar el mejor para la extracción, siendo éste el de 10 mL, con el que se tiene el mejor porcentaje de recobro. Esto se muestra a continuación en la Figura 4.5.



**Figura 4.5 Determinación del volumen óptimo de cafeína**

### 4.3.3 Tiempo óptimo

Una vez determinados la concentración y el volumen óptimo, se determinó el tiempo de extracción óptimo. En la Figura 4.6 se muestra que el tiempo óptimo es de 30 min en el baño ultrasónico.



**Figura 4.6 Determinación del tiempo óptimo de cafeína**

### 4.4 Determinación de cafeína por CLAR en muestras de café, té negro y pulpa de café y evaluación del porcentaje de recobro en cada etapa

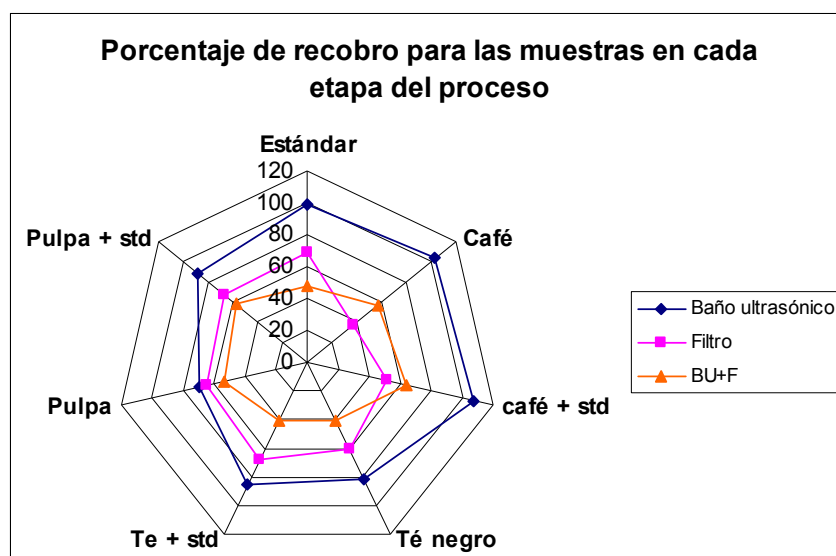
En la Tabla 4.9 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras en las diferentes etapas del proceso.

En la Figura 4.7 se muestran los porcentajes de recobro para cada una de las etapas de la determinación de cafeína.

Como se puede observar, en la etapa de extracción (baño ultrasónico), los porcentajes de recobro para todas las muestras fue el mayor, lo cual indica que el uso del ultrasonido para la extracción de cafeína es bueno; sus porcentajes de recobro varían entre 100 y 80%.

**Tabla 4.9 Porcentaje de recobro y de cafeína para las muestras en cada etapa del proceso**

<b>BAÑO ULTRASÓNICO</b>		
<b>Muestras</b>	<b>% recobro</b>	<b>% cafeína</b>
Estándar	98.7876±0.0213	
Café	102.9123±0.1351	1.3380±0.0017
Café + estd	106.5580±0.0558	1.4912±0.0027
Té negro	80.6828±0.0852	2.5672±0.0025
Te + estd	85.5733±0.08356	2.6569±0.0027
Pulpa	69.6437±0.0307	0.6964±0.0030
Pulpa + estd	88.6358±0.0333	0.9746±0.0036
<b>FILTRO</b>		
Estándar	68.5560±0.2301	
Café	36.6393±0.0524	0.4763±0.0068
Café + estd	51.0286±0.06627	0.7142±0.0092
Té negro	60.2645±0.1514	1.8080±0.0045
Té + estd	67.9300±0.0813	2.2303±0.0026
Pulpa	65.0737±0.0460	0.6507±0.0045
Pulpa + estd	66.6770±0.0448	0.7331±0.0053
<b>BAÑO ULTRASÓNICO Y FILTRO</b>		
Estándar	48.1030±0.0903	
Café	56.8413±0.0467	0.7390±0.0060
Café + estd	63.0602±0.0558	0.8825±0.0078
Té negro	41.4106±0.1461	1.2423±0.0043
Te + estd	41.4482±0.0708	1.3648±0.0022
Pulpa	53.1868±0.0461	0.5320±0.0046
Pulpa + estd	57.9635±0.0582	0.6374±0.0063

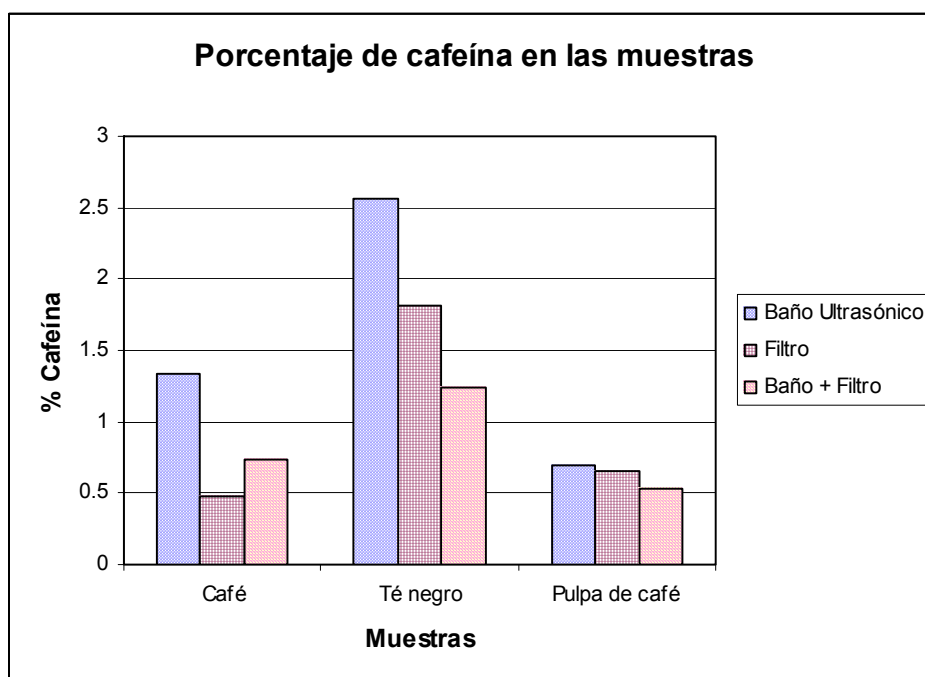


**Figura 4.7 Porcentajes de recobro para cada una de las etapas del proceso**

En la etapa de limpieza de la muestra, el filtrado, se observa que el porcentaje de recobro es menor, lo que indica que alrededor del 40% de la cafeína se queda en el filtro y no alcanza a eluir con el metanol. Este paso es necesario, ya que en él se eliminan partículas que podrían llegar a dañar el sistema cromatográfico.

Al evaluar todo el proceso, se observa que el porcentaje de recobro es menor, alrededor de un 50%. Cabe recalcar que los porcentajes de recobro son homogéneos, por lo cual se puede decir que no importa que matriz se esté analizando. Esto, naturalmente, es válido para las tres matrices en estudio. Sería interesante considerar en un estudio futuro a la cocoa y al chocolate con objeto de compararlos con los de la literatura (Kreiser y Martín, 1980).

En la Figura 4.8 se analizan los porcentajes de cafeína de las muestras (g de cafeína/ 100 g de muestra) en cada etapa del proceso.



**Figura 4.8 Porcentaje de cafeína de las muestras por el método CLAR**



Si se toma en consideración que es en la etapa de extracción en donde se pierde una menor cantidad del analito, tanto para el estándar como para las muestras, se podría decir que el valor más cercano al real es el de esta etapa, lo cual concuerda con lo que establece la literatura citada en el Capítulo II.

En el Anexo I se muestran los cromatogramas de las muestras analizadas.

#### **4.5 Cuantificación de cafeína en las muestras de café, té negro y pulpa de café por el método AOAC y porcentaje de recobro**

Con este método, en general, el porcentaje de recobro para el café y la pulpa de café fue alrededor de 50%, como puede apreciarse en la Tabla 4.10 y en las Figuras 4.9 y 4.10, lo cual indica que en todo el proceso se perdió aproximadamente la mitad de la cafeína.

El porcentaje para el té negro es mucho menor que el de las otras muestras. Ello puede deberse a la pérdida de cloroformo como resultado de la manipulación de volúmenes más grandes en la extracción y, por ende, una mayor pérdida de cafeína. Otro factor importante que pudo afectar fue la evaporación del cloroformo al final de las extracciones.

A lo largo de la metodología estandarizada se pueden detectar varios puntos en donde es muy probable que se haya perdido la cafeína. Éstos son:

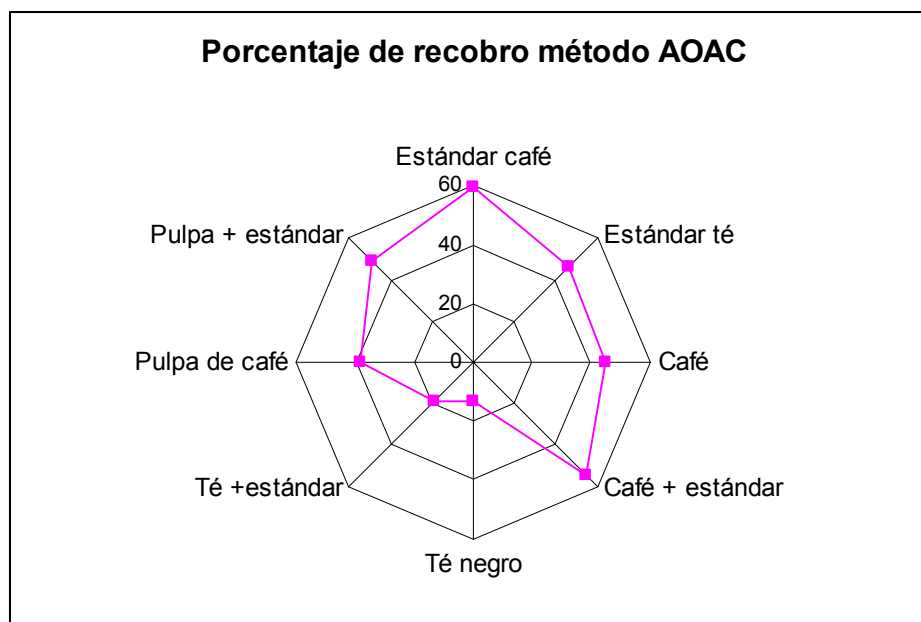
En la extracción con agua caliente, pudo haber pérdida por sublimación; en las extracciones en el embudo de separación con cloroformo, la pérdida puede deberse a que se manipula demasiado el extracto; en el procedimiento de determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl, la pérdida pudo ser en el momento de la digestión o en la destilación.

El porcentaje de cafeína determinada por el método de la AOAC (Figura 4.10) indica que los resultados para las muestras, en comparación con los datos la literatura (Sawyer y Kirk, 1991; Solís, 1995) son relativamente bajos. Esto pudo deberse a la gran pérdida del analito a través de las extracciones ya que, cuando se extrae cafeína con cloroformo, la literatura reporta que existen cantidades menores de cafeína libre (Tarka y Hurst, 1998).

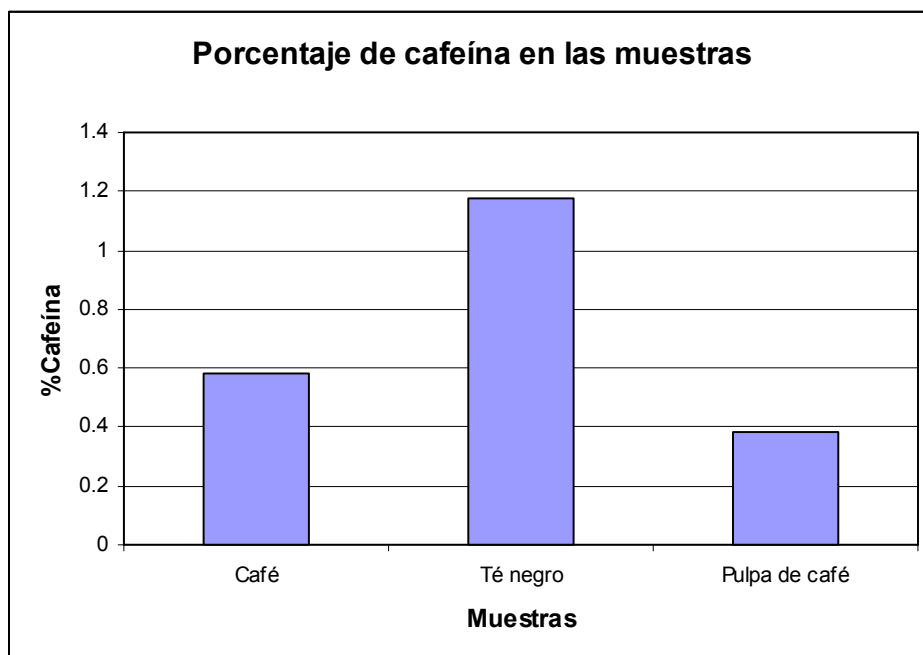
De lo anterior se puede inferir que si se realiza esta metodología como parámetro de calidad para el café, la cantidad de cafeína reportada está siendo subestimada.

**Tabla 4.10 Porcentaje de recobro y de cafeína para las muestras por el método AOAC**

Muestras	% recobro	% cafeína
Estándar té negro	59.3042±4.1331	-
Estándar café y pulpa	46.2590±6.0615	-
Café	44.7064±3.1825	0.5812±0.0413
Café + estándar	54.0534±8.8815	0.7435±0.1220
Pulpa de café	38.3472±4.7093	0.3835±0.0470
Pulpa + estándar	48.1323±2.1849	0.5180±0.0236
Té negro	13.2040±0.5375	1.1782±0.0506
Té negro + estándar	18.7793±0.5585	1.7575±0.14058



**Figura 4.9 Porcentaje de recobro para la muestras por el método de la AOAC**



**Figura 4.10 Porcentaje de cafeína en las muestras por el método AOAC**

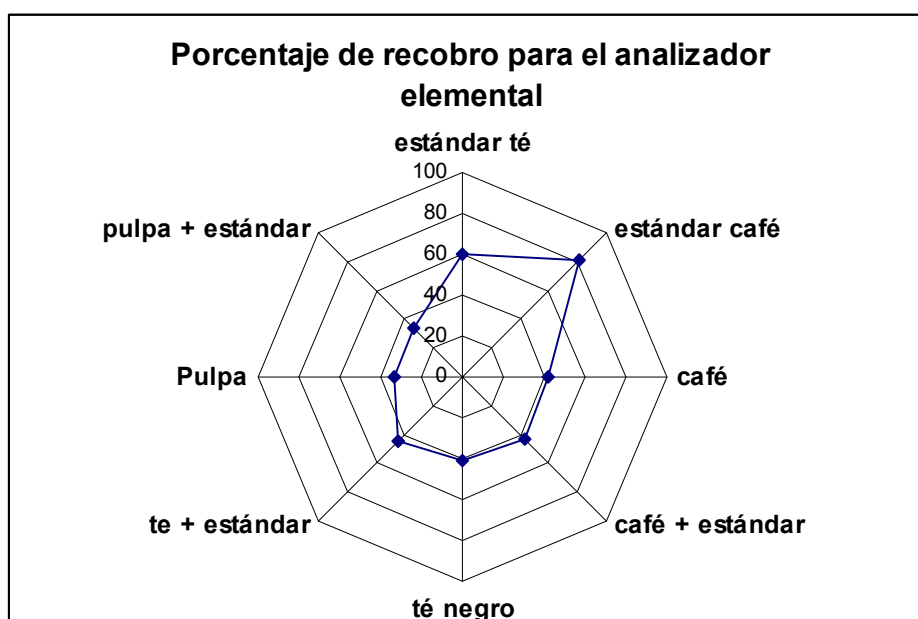
#### **4.6 Extracción de cafeína por método AOAC, cuantificación de cafeína por medio del analizador elemental, AE, y porcentaje de recobro**

La determinación de nitrógeno por medio del analizador elemental es una adaptación a la metodología de la AOAC ya que, aunque se realizaron las extracciones como se plantea en esa metodología, por problemas técnicos, no se pudo continuar con la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl, así que se probó el uso de este aparato.

Los porcentajes de recobro mostrados, tanto en la Tabla 4.11 como en la Figura 4.11 son muy diferentes para cada una de las muestras. Esta diferencia puede deberse a errores de manipulación, ya que como se menciona en la metodología, se pesaron cantidades de cloroformo en el material adsorbente muy pequeñas (2 a 6 mg).

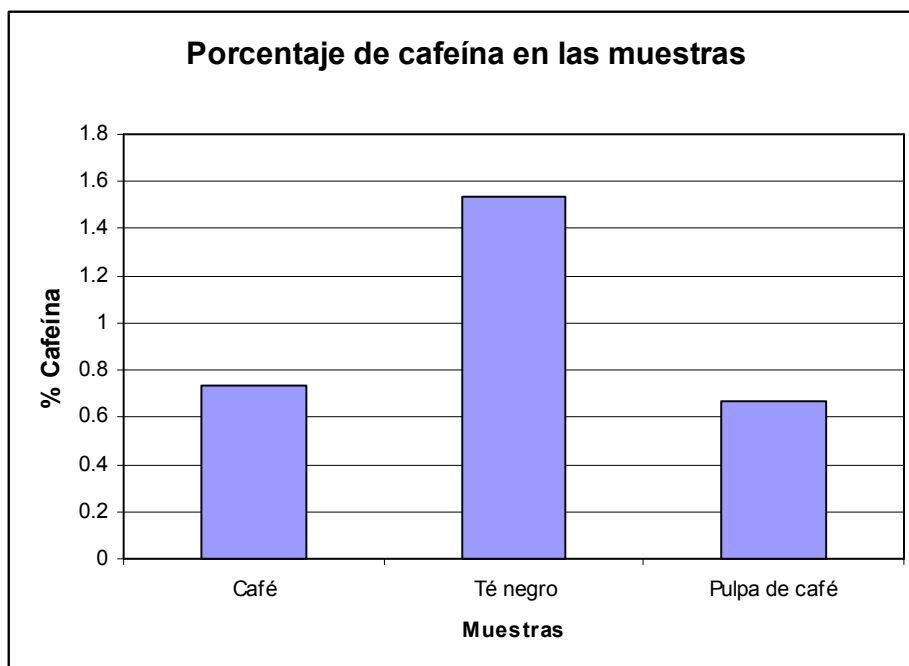
**Tabla 4.11 Porcentaje de recobro y de cafeína para las muestras analizadas con el AE**

Muestras	% recobro	% cafeína
Estándar té	59.9543	
Estándar café	81.2729	
Café	42.0980±8.6694	0.7309±0.3672
Café + estándar	42.6273±3.8571	0.7469±0.4274
Té negro	40.9648±6.5185	1.5384±0.1060
Té + estándar	43.7694±3.7022	1.6459±0.0602
Pulpa	33.3945±0.0660	0.6682±0.0015
Pulpa + estándar	33.2796±0.2462	0.6744±0.0048



**Figura 4.11 Porcentaje de recobro para las muestras por el método AE**

En la Figura 4.12 se muestran los porcentajes de cafeína para cada una de las muestras, dichos porcentajes se analizarán más adelante.



**Figura 4.12 Porcentaje de cafeína en las muestras por el método AE**

#### **4.7 Comparación de las tres metodologías**

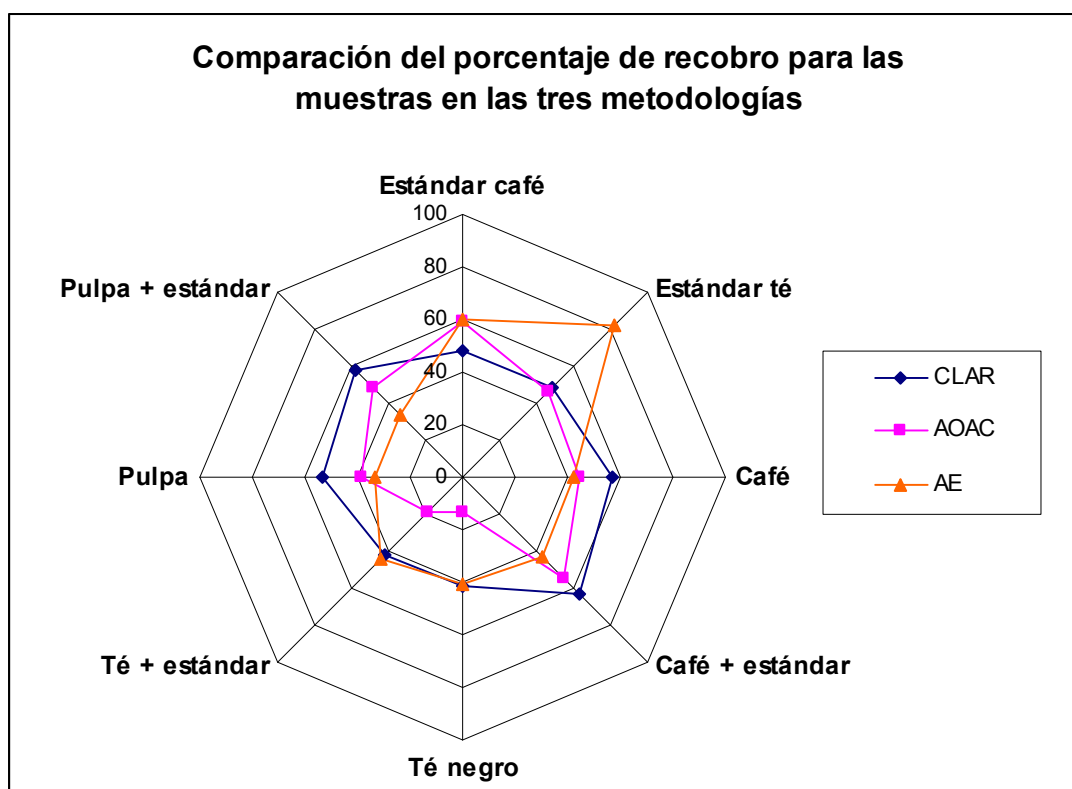
Al observar los porcentajes de recobro para el método propuesto empleando la metodología CLAR, con el método de la AOAC y para el uso de un analizador elemental, que se presentan en la Tabla 4.12 y en la Figura 4.13, se puede ver que el método CLAR da mejores resultados para la mayoría de las muestras, ya que los porcentajes de recobro son mejores, más homogéneos y con una desviación menor. Con homogeneidad se refiere a que no existen diferencias entre los porcentajes de recobro para cada muestra, lo cual indica que no importa la matriz en la que se encuentre el analito.

En la Tabla 4.13 y en la Figura 4.14 se muestran los porcentajes de cafeína que contiene cada muestra, determinados con las diferentes metodologías.

Comparando los porcentajes de cafeína para la metodología por cromatografía de líquidos con los obtenidos con la estandarizada por la AOAC se observa que, para las muestras en estudio, el porcentaje determinado con la primera es mayor que el que se determinó con el método estandarizado.

**Tabla 4.12 Comparación de los porcentajes de recobro para las muestras con los diferentes métodos**

Método/ Muestras	CLAR	AOAC	AE
Estándar café	48.1029±0.0903	59.3042±6.0615	59.9542±
Estándar té		46.2589±4.1331	81.2729±
Café	56.8413±0.0467	44.7064±3.1825	42.0979±8.6694
Café + estándar	63.0603±0.0558	54.0534±8.8815	42.6273±3.871
Té negro	41.4106±0.1461	13.2040±0.5375	40.9648±0.0660
Té + estándar	41.4481±0.0708	18.7792±0.5585	43.7694±0.2462
Pulpa	53.1867±0.0461	28.0497±4.7093	33.3945±6.5185
Pulpa + estándar	57.9635±0.0582	48.1323±2.1849	33.2795±3.7022

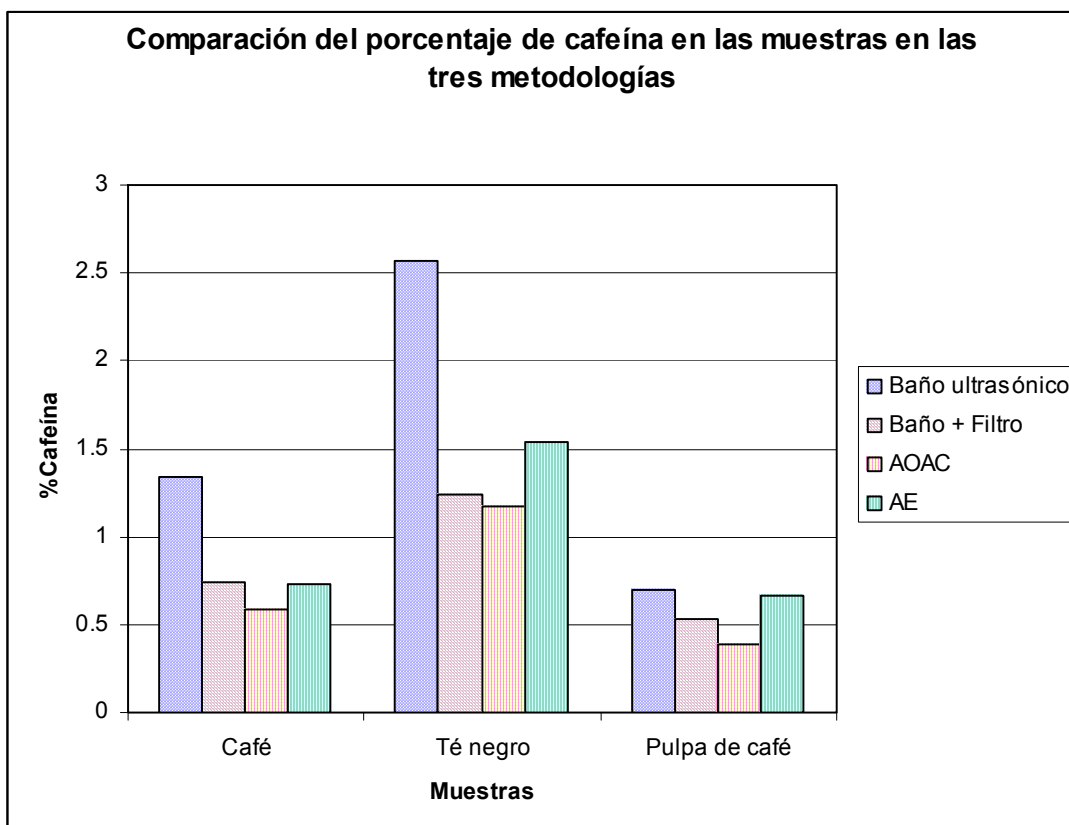


**Figura 4.13 Comparación de los porcentajes de recobro entre las tres metodologías**

**Tabla 4.13. Comparación de los porcentajes de cafeína para las muestras con las diferentes metodologías**

Muestras/Método	Baño Ultrasónico	Baño+Filtro	AOAC	AE
Café	1.3377±0.0017	0.7390±0.0060	0.5812±0.0413	0.7309±0.3672
Té negro	2.5672±0.0025	1.2423±0.0043	1.1782±0.0506	1.5384±0.1060
Pulpa de café	0.6964±0.0030	0.5320±0.0046	0.3835±0.0470	0.6682±0.0015

Esto corrobora que existe una mayor pérdida de cafeína en el segundo método, lo cual se hace más evidente al comparar el porcentaje de cafeína obtenido con el método estandarizado con el registrado en el baño ultrasónico (el más cercano al real). La cantidad determinada en éste equivale al doble de la determinada con el método de la AOAC.



**Figura 4.14 Porcentaje de cafeína en las muestras analizadas para las metodologías comparadas**

Al comparar los porcentajes de cafeína obtenidos mediante las metodologías CLAR y del AE, se puede decir que los determinados por el AE son mayores que los de CLAR, aunque, como en el caso anterior, si estos resultados se comparan con los obtenidos en el baño ultrasónico, se aprecia que estos últimos son mayores.

Los porcentajes de cafeína para las muestras determinados por el AE son mayores que los del AOAC. Si se considera que el método de extracción para ambas metodologías fue el mismo, se puede decir que la diferencia entre sus resultados, corresponde a las pérdidas registradas durante el proceso de digestión y destilación del método Kjeldahl.

De esta manera se puede decir que el método propuesto (CLAR) en este trabajo para la determinación de cafeína tiene las siguientes ventajas sobre el método de la AE:

- ✓ Menor tiempo para la determinación
- ✓ Menor cantidad de reactivos y muestra
- ✓ No utiliza disolventes tóxicos
- ✓ No genera residuos peligrosos

La desventaja del método CLAR en relación al AE es:

- ✗ Elevado costo de operación

El método propuesto (CLAR) en este trabajo para la determinación de cafeína tiene las siguientes ventajas sobre el método de la AOAC:

- ✓ Menor tiempo para la determinación.
- ✓ Mayor porcentaje de recobro.
- ✓ Menor cantidad de reactivos y muestra.
- ✓ No utiliza disolventes tóxicos.
- ✓ No genera residuos peligrosos.
- ✓ Automatización.



Las desventajas del método CLAR en relación al AOAC son:

- χ Requiere de personal con capacitación más especializada
- χ Instrumentación costosa
- χ Elevado costo de operación

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

Con base en todos los parámetros determinados en esta investigación, es posible decir que el método propuesto (CLAR) representa una buena alternativa para la cuantificación de cafeína en café, té negro y pulpa de café, así como también, ofrece importantes posibilidades para ser utilizada para diversos alimentos.

Partiendo del objetivo general propuesto y de los objetivos específicos, a continuación se presentan las conclusiones a las que se llegó en esta investigación:

- ✓ El uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución es adecuado para la determinación de cafeína en alimentos, ya que guarda una relación lineal entre la concentración del analito y la respuesta del instrumento; con un porcentaje de desviación del valor real bajo; una precisión adecuada con un coeficiente de variación dentro de lo establecido para la validación de un método cromatográfico.
- ✓ Las condiciones cromatográficas óptimas son: Fase móvil: 70:30 (agua: metanol) a pH de 3; flujo: 1 mL/min; volumen inyección: 20 µL; longitud de onda: 273 nm (detector UV).
- ✓ La cafeína se ve afectada por la temperatura y el tiempo de almacenamiento.
- ✓ Las condiciones óptimas de almacenamiento son a 4°C en disolución acuosa y menos de 7 días de almacenamiento.
- ✓ Las condiciones óptimas para la extracción de cafeína en el baño ultrasónico son: 30 mg cafeína, 10 mL durante 30 min.
- ✓ El mejor método de extracción es el uso de ultrasonido.

- ✓ El uso de la técnica cromatográfica reduce el tiempo de la determinación de la cafeína; no se utilizan disolventes tóxicos y por ende no genera residuos peligrosos; la cantidad de muestra es menor.
- ✓ La cantidad de cafeína determinada en el café, té negro y pulpa de café coincide con lo reportado en la literatura.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

Las recomendaciones propuestas a la luz de la experimentación realizada en esta investigación son:

- Es posible mejorar el porcentaje de recobro para el método CLAR si se hacen pruebas con otros tipos de filtros de jeringa o si se prueban diferentes disolventes y volúmenes para eluir la cafeína del filtro.
- Realizar una validación para el uso del analizador elemental, ya que éste puede representar un método muy rápido. Tiene la desventaja de que el costo por muestra es relativamente alto. En esta investigación no se hizo una evaluación comparativa de costos pero esta información se deriva de la información proporcionada por el personal responsable del equipo.
- La metodología por cromatografía de líquidos para la determinación de cafeína en pulpa de café, validada en esta investigación, ofrece importantes posibilidades para ser utilizada en otras investigaciones, particularmente en aquellas orientadas a la evaluación de diferentes procesos de desintoxicación de la pulpa y para determinar la calidad de ésta en alimentos animales, entre otras.

## ANEXO1 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS

Tabla de resultados para la curva estándar, determinación de la exactitud y límite de cuantificación

Concentración (mg/L)		Alturas					Altura promedio	Desviación estándar	% Coeficiente variación
3	674	657	668				666.3333333	8.6216781	1.29389866
5	1326	1317	1320				1321	<b>LC</b>	
10	3045	3050	3049				3048		
20	4925	4933	4912				4923.333333		
25	5083	5059	5068				5070		
30	6968	6956	6960				6961.333333		
40	9835	9850	9839				9841.333333		
45	11044	11065	11053				11054	<b>PRECISIÓN</b>	
50	12661	12606	12650	12666	12647	12653	12639	21.1463157	0.16731004
60	14776	14787	14710				14757.66667	% <b>EXACTITUD</b> = 0.1738107	
65	16109	16115	16107				16110.33333		
70	16512	16511	16524				16515.66667		
80	19728	19701	19723				19717.33333		
90	22178	22164	22172				22171.33333		
100	24603	24653	24627				24627.66667		

Tabla de resultados para la determinación de las condiciones óptimas de la extracción en en baño ultrasónico

Concentración (mg/L)	% recuperacion	Volumen	% recuperacion	Tiempo (min)	% recuperacion
10.002	77.3105096	2.5	45.6258044	10	58.5718545
20.004	87.8922994	5	56.1945805	15	66.6849689
30.004	90.8789183	10	90.3156858	30	93.6361543
50.002	88.947625	15	79.7891596	40	82.4643773
75.008	96.377858	20	76.0308561		
100.004	98.9055502	25	95.1655826		

Tabla de resultados de la estabilidad de la cafeína en metanol y agua, a temperatura ambiente, 20±2 y 4°C

DÍA	Concentración (mg/L)			
	METANOL		AGUA	
	Tamb, 20±2°C	T 4°C	Tamb, 20±2	T 4°C
<b>1</b>	40.8567759	40.8934134	100.282789	100.079247
	40.8567759	40.5799593	101.46333	100.413055
	40.7712884	40.9626175	99.9611928	99.9856177
	40.8323509	44.6263668	97.9420598	100.763147
<b>Promedio</b>	40.8292978	41.7655893	99.9123428	100.310267
<b>Desv.estd</b>	0.04035055	1.91443819	1.46369309	0.35328596
<b>cv</b>	0.09882745	4.58376914	1.46497725	0.35219322
<b>2</b>	38.4956931	40.8404926	95.727527	97.06276
	38.910918	41.2720008	97.4535599	95.3570812
	38.8091472	41.2272217	92.9267942	98.2555139
	39.395347	40.8974842	95.9351394	98.035689
<b>Promedio</b>	38.9027763	41.0592998	95.5107551	97.177761
<b>Desv.estd</b>	0.37290544	0.22173585	1.88665812	1.31980958
<b>cv</b>	0.9585574	0.54003806	1.97533578	1.35813952
<b>4</b>	36.0613352	40.5229676	88.3430368	93.9485732
	35.7967311	40.5311093	85.5463749	91.8480236
	36.3707185	40.2380094	87.8545369	91.3961612
	36.0531936	40.7061551	85.1515042	95.5606228
<b>Promedio</b>	36.0704946	40.4995604	86.7238632	93.1883452
<b>Desv.estd</b>	0.23485034	0.19376407	1.60820168	1.93339367
<b>cv</b>	0.65108712	0.478435	1.8543935	2.07471617
<b>7</b>	34.3760106	36.6719601	78.9882638	89.1572033
	34.3800814	36.7208101	81.9192632	83.9913169
	35.5891187	39.2243721	81.5243924	82.5339589
	34.2823814	39.4564095	76.4643476	83.6941461
<b>Promedio</b>	34.656898	38.018388	79.7240668	84.8441563
<b>Desv.estd</b>	0.62311668	1.52958382	2.53161572	2.94331136
<b>cv</b>	1.7979586	4.02327374	3.17547238	3.46907964

Tabla de Resultados de la metodología CLAR

	Peso de la muestra (mg)	Estándar (mg)	Volumen Final (mL)	Concentración teórica (ppm)	Alturas			Alturas promedio	Concentración (mg/L)	% recobro	%cafeína
<b>BAÑO ULTRASONICO</b>											
<b>Estándar</b>	30.005			49.8	12053	12041	12003	12032.3333	49.1962	98.7876±0.0213	
<b>café</b>	25.051		5	65.1326	16423	16393	16435	16417	67.0295	102.9123±0.1351	1.3380±0.0017
<b>café + estándar</b>	25.036	0.0249	5	70.0736	18285	18304	18297	18295.3333	74.6690	106.5580±0.0558	1.4912±0.0027
<b>té negro</b>	8.502		5	51.012	10675	10657	10676	10669.3333	43.6526	80.6828±0.0852	2.5672±0.0025
<b>te + estándar</b>	8.501	0.0249	5	55.986	11031	11054	11043	11042.6667	45.1710	85.5733±0.08356	2.6569±0.0027
<b>Pulpa</b>	25.025		5	50.05	8504	8511	8505	8506.66667	34.8566	69.6437±0.0307	0.6964±0.0030
<b>Pulpa + estándar</b>	25.021	0.0249	5	55.022	11927	11932	11923	11927.3333	48.7691	88.6358±0.0333	0.9746±0.0036
<b>FILTRO</b>											
<b>Estándar</b>	30.005			49.8	8337	8300	8355	8330.66667	34.1408	68.5560±0.2301	
<b>Café</b>	25.048		7	46.5177143	4133	4127	4121	4127	17.0437	36.6393±0.0524	0.4763±0.0068
<b>café + estándar</b>	25.002	0.0249	7	49.9894286	6212	6214	6199	6208.33333	25.5089	51.0286±0.06627	0.7142±0.0092
<b>té negro</b>	8.505		7	36.45	5323	5350	5339	5337.33333	21.9664	60.2645±0.1514	1.8080±0.0045
<b>te + estándar</b>	8.503	0.0249	7	39.9985714	6609	6617	6625	6617	27.171	67.9300±0.0813	2.2303±0.0026
<b>Pulpa</b>	25.025		7	35.75	5654	5654	5661	5656.33333	23.2638	65.0737±0.0460	0.6507±0.0045
<b>Pulpa + estándar</b>	25.046	0.0249	7	39.3371429	6380	6389	6387	6385.33333	26.2288	66.6770±0.0448	0.7331±0.0053
<b>BAÑO ULTRASÓNICO MÁS EL FILTRO</b>											
<b>Estándar</b>	30.005			49.8	5838	5816	5825	5826.33333	23.9552	48.1030±0.0903	
<b>Café</b>	25.051		6	54.2771667	7515	7527	7524	7522	30.8518	56.8413±0.0467	0.7390±0.0060
<b>café + estándar</b>	25.036	0.0249	6	58.3946667	8991	8998	8982	8990.33333	36.8238	63.0602±0.0558	0.8825±0.0078
<b>té negro</b>	8.502		6	42.51	4268	4278	4248	4264.66667	17.6036	41.4106±0.1461	1.2423±0.0043
<b>te + estándar</b>	8.501	0.0249	6	46.655	4683	4699	4691	4691	19.3376	41.4482±0.0708	1.3648±0.0022
<b>Pulpa</b>	25.025		6	41.7083333	5396	5389	5387	5390.66667	22.1833	53.1868±0.0461	0.5320±0.0046
<b>Pulpa + estándar</b>	25.021	0.0249	6	45.8516667	6477	6464	6472	6471	26.5772	57.9635±0.0582	0.6374±0.0063

**Tabla de resultados de la metodología AOAC**

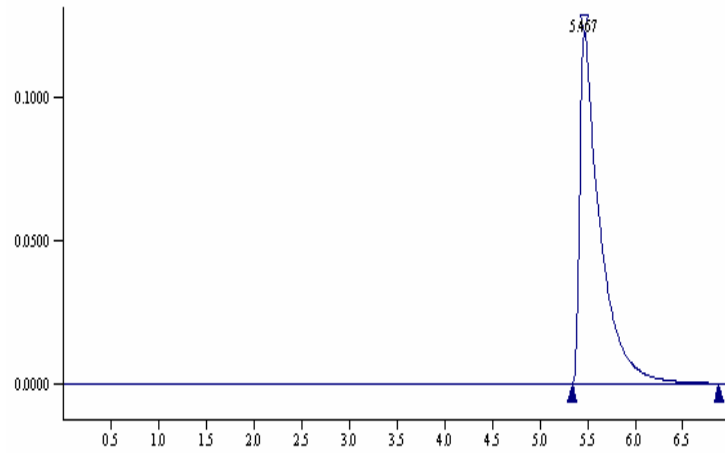
<b>Muestras</b>	<b>Muestra (g)</b>	<b>mL sulfúrico</b>	<b>mg cafeína</b>	<b>%cafeína</b>	<b>% recobro</b>
<b>Café</b>	2.0581	4	3.884	0.615383	47.3372281
<b>Café</b>	2.0291	3.8	3.6898	0.592970	45.6130855
<b>Café</b>	2.0266	3.5	3.3985	0.535195	41.168902
<b>Promedio</b>			3.6574333	0.581183	44.7064052
<b>Desv. estándar</b>				0.041373	3.1825482
<b>Café + estándar</b>	2.0549	4.5	4.3695	0.678632	49.3401812
<b>Café + estándar</b>	2.0455	4.5	4.3695	0.667547	48.5220513
<b>Café + estándar</b>	2.0589	6	5.826	0.884270	64.2980498
<b>Promedio</b>			4.855	0.743483	54.0534274
<b>Desv. estándar</b>				0.122051	8.8815285
<b>Pulpa de café</b>	2.0817	2.5	2.4275	0.349834	34.983427
<b>Pulpa de café</b>	2.0046	2.5	2.4275	0.363289	36.3289434
<b>Pulpa de café</b>	2.0817	3	2.913	0.437292	43.7292838
<b>Promedio</b>			2.5893333	0.383472	38.3472181
<b>Desv. estándar</b>				0.047093	4.7093074
<b>Pulpa + estándar</b>	2.0696	3.5	3.3985	0.502685	46.7666624
<b>Pulpa + estándar</b>	2.0329	3.5	3.3985	0.545135	50.6523021
<b>Pulpa + estándar</b>	2.0219	3.3	3.2043	0.505786	46.9779517
<b>Promedio</b>			3.3337666	0.517869	48.1323054
<b>Desv. estándar</b>				0.023664	2.1849366
<b>Té negro</b>	5.0168	4.7	22.795	1.155471	13.4829581
<b>Té negro</b>	5.036	5.1	24.735	1.236258	13.5446314
<b>Té negro</b>	5.0026	4.7	22.795	1.143030	12.5842487
<b>Promedio</b>			23.441666	1.178253	13.2039461
<b>Desv. estándar</b>				0.050617	0.5375588
<b>Té +estándar</b>	5.0204	6.5	31.525	1.597788	18.8521358
<b>Té +estándar</b>	5.0201	6.8	32.98	1.812549	18.1878424
<b>Té +estándar</b>	5.0266	7.1	34.435	1.862323	19.2978629
<b>Promedio</b>			32.98	1.757553	18.7792804
<b>Desv. estándar</b>				0.140581	0.5585851
<b>Estándar café y pulpa</b>	0.030093	6.5	6.3115		65.8451738
<b>Estándar café y pulpa</b>	0.030081	6	5.826		58.1911566
<b>Estándar café y pulpa</b>	0.030076	5.5	5.3405		53.876375
<b>Promedio</b>			5.826		59.304235
<b>Desv. estándar</b>					6.061538
<b>Estándar té negro</b>	0.150022	6	29.1		49.1814867
<b>Estándar té negro</b>	0.150013				
<b>Estándar té negro</b>	0.150008	5.3	25.705		43.3363187
<b>Promedio</b>			27.4025		46.2589027
<b>Desv. estándar</b>					4.1331579

Tabla de resultados del analizador elemental

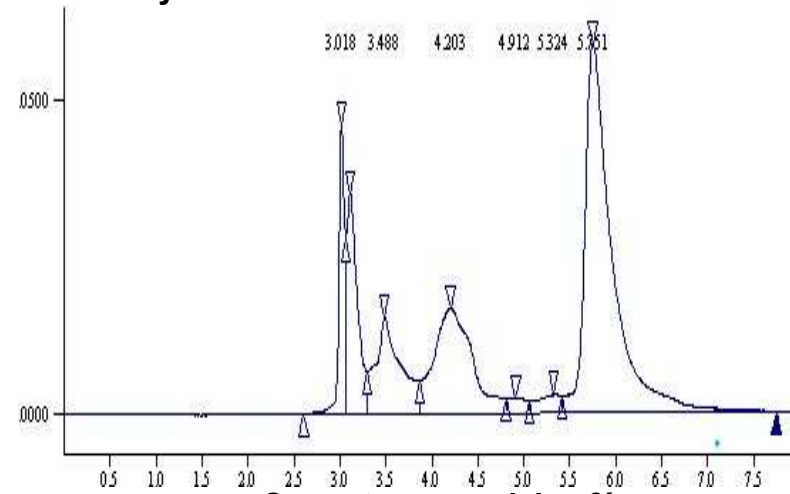
Muestras	%N	% N promedio	%Carbono	C/N	mg cafeína	% Cafeína	Desviación Estándar	% Recobro	Desviación estándar
Estándar cafeína	28.07714	28.07714	47.54499	1.69337012	1				
Estándar té	2.187456	2.187456	0.8328091	0.38072039	0.22482999			81.2729494	
Estándar café y pulpa	4.284776	4.284776	1.007779	0.23903659	0.14116028			59.9542647	
Café	5.436747	4.496745	0.5565847	0.12377502	0.0730939	0.72969847	0.36728108	42.0979888	8.66945153
Café	3.556743								
Café + estándar	5.015369	4.913772	0.6214845	0.12647809	0.07469016	0.74596917	0.42745409	42.6273166	3.85710228
Café + estándar	4.812175								
Pulpa de café	4.462479	4.3026065	0.4868381	0.11314956	0.06681916	0.50091826	0.00158469	33.3945506	0.06592755
Pulpa de café	4.142734								
Pulpa + estándar	5.293394	4.4086695	0.5148765	0.11419701	0.06743771	0.50542904	0.00484714	33.2795655	0.24629282
Pulpa + estándar	3.523945								
Té negro	2.637954	2.588242	0.6742409	0.26050149	0.15383612	1.53617984	0.10607647	40.9647956	6.51852637
Té negro	2.53853								
Té + estándar	3.300815	3.237136	0.9022434	0.27871656	0.16459282	1.64408678	0.06022919	43.7694468	3.70226528
Té + estándar	3.173457								



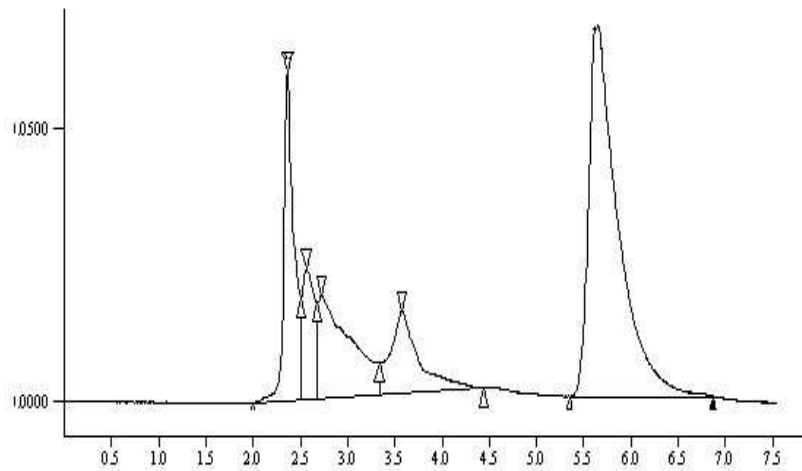
### Cromatogramas del café, té negro, pulpa de café y del estándar de cafeína



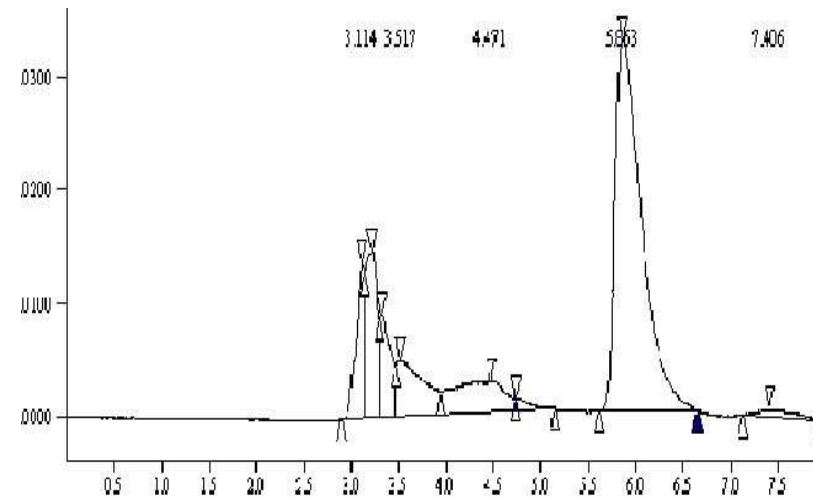
.....Cromatograma del estándar de cafeína



Cromatograma del café



.....Cromatograma de la pulpa del café



Cromatograma del té negro

ANEXO 2 Análisis Estadísticos

Estabilidad de la cafeína (ANdeVAS)

METANOL (Temperaturas)									
DÍA	Tamb	T 4°C	Tamb+T4°C						
				<i>Ho: No hay diferencia significativa entre las temperaturas de extracción</i>					
<b>N</b>	40.8567759	40.89341339	81.7501893	<i>H1: Si hay diferencia significativa entre las temperaturas de extracción.</i>					
	40.8567759	40.57995929	81.4367352						
	40.77128842	40.96261755	81.733906	<b>factor de corrección</b>					
	40.83235091	44.62636678	85.4587177	48610.3384					
	38.49569306	40.84049257	79.3361856	<b>Suma de cuadrados para muestras</b>					
	38.91091797	41.27200081	80.1829188	59.2238783					
	38.80914716	41.22722166	80.0363688	<b>Suma de cuadrados para n</b>					
	39.39534704	40.89748423	80.2928313	121.940115					
	36.06133523	40.52296764	76.5843029	<b>Suma de cuadrados total</b>					
	35.79673112	40.5311093	76.3278404	203.61409					
	36.3707185	40.23800936	76.6087279	<b>Suma de cuadrados de error</b>					
	36.05319357	40.7061551	76.7593487	22.4500964					
	34.37601058	36.67196011	71.0479707	<b>Cuadrados medios</b>					
	34.38008142	36.7208101	71.1008915	<b>CM muestras</b>	<b>CM n</b>	<b>CM error</b>	<b>Fm</b>	<b>Fn</b>	
	35.58911866	39.22437207	74.8134907	59.2238783	8.12934103	1.49667309	39.5703502	5.431607663	
	34.28238144	39.45640953	73.738791						
<b>T.J</b>	601.8378669	645.3713495	<b>Suma (Tamb+T4°C)</b>		1247.20922				
			1247.20922						
<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fisher calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>	<b>Fisher de tablas</b>	<b>Diferencia significativa</b>	<b>Criterio</b>	
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>g.l.</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>α</b>	<b>Ft</b>		<b>Fc vs Ft</b>	
<b>Muestras (Entre T)</b>	59.22387835	1	59.2238783	39.5703502	0.05	4.54	<b>Si</b>	Fc > Ft	
<b>Entre n</b>	121.9401154	15	8.12934103	5.43160766	0.05	2.4	<b>Si</b>	Fc > Ft	
<b>Error</b>	22.45009636	15	1.49667309						
<b>Total</b>		31							
<b>Conclusión: Se rechaza la Ho es decir, si hay diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento</b>									

AGUA (Temperaturas)								
<b>Día</b>	<b>Tamb</b>	<b>T 4°C</b>		<i>Ho: No hay diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento</i>				
	100.282789	100.079247	200.362035	<i>H1: Si hay diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento.</i>				
	101.46333	100.413055	201.876385	<b>Factor de corrección.</b>				
	99.9611928	99.9856177	199.946811	271873.154				
	97.9420598	100.763147	198.705207	<b>Suma de cuadrados para muestras</b>				
	95.727527	97.06276	192.790287	93.1544432				
	97.4535599	95.3570812	192.810641	<b>Suma de cuadrados para n</b>				
	92.9267942	98.2555139	191.182308	1493.19347				
	95.9351394	98.035689	193.970828	<b>Suma de cuadrados total</b>				
	88.3430368	93.9485732	182.29161	1693.74591				
	85.5463749	91.8480236	177.394399	<b>Suma de cuadrados de error</b>				
	87.8545369	91.3961612	179.250698	107.397999				
	85.1515042	95.5606228	180.712127	<b>Cuadrados medios</b>				
	78.9882638	89.1572033	168.145467	<b>CM muestras</b>	<b>CM n</b>	<b>CM error</b>	<b>Fm</b>	<b>Fn</b>
	81.9192632	83.9913169	165.91058	93.1544432	99.5462312	7.15986657	13.0106396	13.903364
	81.5243924	82.5339589	164.058351					
	76.4643476	83.6941461	160.158494					
<b>T.J</b>	1447.48411	1502.08212	<b>Suma (Tamb+T4°C)</b>		2949.56623			
			2949.56623					
<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fisher calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>	<b>Fisher de tablas</b>	<b>Diferencia significativa</b>	<b>Criterio</b>
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>g.l.</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>α</b>	<b>Ft</b>		<b>Fc vs Ft</b>
<b>Muestras (Entre T)</b>	93.1544432	1	93.1544432	13.0106396	0.05	4.54	<b>Si</b>	Fc > Ft
<b>Entre n</b>	1493.19347	15	99.5462312	13.903364	0.05	2.4	<b>Si</b>	Fc > Ft
<b>Error</b>	107.397999	15	7.15986657					
<b>Total</b>		31						
<b>Conclusión: Se rechaza la Ho es decir si hay diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento</b>								

AGUA (Días)								
		Día 1	Día 2	Día 4	Día 7			
	T amb	100.282789	95.727527	88.3430368	78.9882638	363.341616		
	Tamb	101.46333	97.4535599	85.5463749	81.9192632	366.382528		
	T amb	99.9611928	92.9267942	87.8545369	81.5243924	362.266916		
	T amb	97.9420598	95.9351394	85.1515042	76.4643476	355.493051		
	Suma	399.649371	382.043021	346.895453	318.896267	1447.48411		
						1447.48411		
<b>Ho: No hay diferencia significativa entre los días de almacenamiento, utilizando agua a T amb</b>								
<b>H1: Si hay diferencia significativa entre los días de almacenamiento, utilizando agua a T amb</b>								
Factor de corrección		Suma de cuadrados para días			Suma de cuadrados para T			
130950.641		976.302604			15.8378947			
Suma de cuadrados total		Suma de cuadrados de error						
1020.39441			28.2539068					
Cuadrados medios								
CM días		CM T		CM error		Fd	FT	
325.434201		5.27929822		3.13932298		103.663817	1.68166775	
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Nivel de significancia	Fisher de tablas	Diferencia significativa	Criterio
F.V.	SC	g.l.	CM	FC	$\alpha$	Ft		Fc vs Ft
Muestras (Entre días)	976.302604	3	0	103.663817	0.05	4.26	si	Fc > Ft
Entre T	15.8378947	3	5.27929822	1.68166775	0.05	4.26	no	Fc < Ft
Error	28.2539068	9	3.13932298					
Total		15						
<b>Conclusión: Se rechaza la Ho es decir si hay diferencia significativa entre los días de extracción utilizando agua a T amb</b>								

AGUA (Días)								
		Día 1	Día 2	Día 4	Día 7			
	T 4 °C	100.079247	97.06276	93.9485732	89.1572033	380.247783		
	T 4 °C	100.413055	95.3570812	91.8480236	83.9913169	371.609477		
	T 4 °C	99.9856177	98.2555139	91.3961612	82.5339589	372.171252		
	T 4 °C	100.763147	98.035689	95.5606228	83.6941461	378.053605		
		401.241067	388.711044	372.753381	339.376625	1502.08212		
						1502.08212		
<b>Ho: No hay diferencia significativa entre los días de almacenamiento, utilizando agua a T 4°C</b>								
<b>H1: Si hay diferencia significativa entre los días de almacenamiento, utilizando agua a T 4 °C</b>								
Factor de corrección		Suma de cuadrados para días			Suma de cuadrados para T			
141015.668		537.393657			13.8193484			
Suma de cuadrados total		Suma de cuadrados de error						
580.19706			28.9840549					
Cuadrados medios								
CM días		CM T		CM error		Fd	FT	
179.131219		4.60644946		3.22045054		55.6230305	1.43037423	
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Nivel de significancia	Fisher de tablas	Diferencia significativa	Criterio
F.V.	SC	g.l.	CM	FC	$\alpha$	Ft		Fc vs Ft
Muestras (Entre días)	537.393657	3	179.131219	55.6230305	0.05	4.26	si	Fc > Ft
Entre T	13.8193484	3	4.60644946	1.43037423	0.05	4.26	no	Fc < Ft
Error	28.9840549	9	3.22045054					
Total		15						
<b>Conclusión: Se rechaza la Ho es decir si hay diferencia significativa entre los días de extracción utilizando agua a T 4 °C</b>								

METANOL (Días)								
		Día 1	Día 2	Día 4	Día 7			
	T amb	40.8567759	38.4956931	36.0613352	34.3760106	149.789815		
	Tamb	40.8567759	38.910918	35.7967311	34.3800814	149.944506		
	T amb	40.7712884	38.8091472	36.3707185	35.5891187	151.540273		
	T amb	40.8323509	39.395347	36.0531936	34.2823814	150.563273		
	Suma	163.317191	155.611105	144.281978	138.627592	601.837867		
						601.837867		
<b>Ho: No hay diferencia significativa entre los días de extracción, utilizando metanol a T amb</b>								
<b>H1: Si hay diferencia significativa entre los días de extracción a T amb</b>								
Factor de corrección		Suma de cuadrados para días			Suma de cuadrados para T			
22638.0511			92.5037687		0.47313381			
Suma de cuadrados total		Suma de cuadrados de error						
94.2561158		1.27921333						
Cuadrados medios								
CM días		CM T		CM error		Fd	FT	
30.8345896		0.15771127		0.14213481		216.939036	1.10958931	
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Nivel de significancia	Fisher de tablas	Diferencia significativa	Criterio
F.V.	SC	g.l.	CM	FC	$\alpha$	Ft		Fc vs Ft
Muestras (Entre días)	92.5037687	3	30.8345896	216.939036	0.05	4.26	no	Fc > Ft
Entre T	0.47313381	3	0.15771127	1.10958931	0.05	4.26	si	Fc < Ft
Error	1.27921333	9	0.14213481					
Total		15						
<b>Conclusión: Se rechaza la Ho es decir si hay diferencia significativa entre los días de extracción utilizando metanol a T amb.</b>								

METANOL (Días)								
		Día 1	Día 2	Día 4	Día 7			
	T 4°C	40.8934134	40.8404926	40.5229676	36.6719601	158.928834		
	T 4°C	40.5799593	41.2720008	40.5311093	36.7208101	159.10388		
	T 4°C	40.9626175	41.2272217	40.2380094	39.2243721	161.652221		
	T 4°C	44.6263668	40.8974842	40.7061551	39.4564095	165.686416		
	Suma	167.062357	164.237199	161.998241	152.073552	645.371349		
						645.371349		
<b>Ho: No hay diferencia significativa entre los días de extracción, utilizando metanol a T 4°C</b>								
<b>H1: Si hay diferencia significativa entre los días de extracción, utilizando metanol a T 4°C</b>								
Factor de corrección		Suma de cuadrados para días			Suma de cuadrados para T			
26031.5112		31.8598613			7.45068404			
Suma de cuadrados total		Suma de cuadrados de error						
50.1340959		10.8235506						
Cuadrados medios								
CM días		CM T		CM error		Fd	FT	
10.6199538		2.48356135		1.20261674		8.83070511	2.0651312	
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fisher calculada	Nivel de significancia	Fisher de tablas	Diferencia significativa	Criterio
F.V.	SC	g.l.	CM	FC	A	Ft		Fc vs Ft
Muestras (Entre días)	31.8598613	3	10.6199538	8.83070511	0.05	4.26	si	Fc > Ft
Entre T	7.45068404	3	2.48356135	2.0651312	0.05	4.26	no	Fc < Ft
Error	10.8235506	9	1.20261674					
Total		15						
<b>Conclusión: Se rechaza la Ho es decir si hay diferencia significativa entre los días de extracción utilizando metanol a T 4° C</b>								

## **GLOSARIO**

Adsorción	Acción y efecto de adsorber
Adsorber	Atraer y retener en la superficie de un cuerpo moléculas o iones de otro cuerpo
Alveolar	Relacionado con los alvéolos o alveolos
Alvéolo, alveolo	Cada una de las fositas hemisféricas en que terminan las últimas ramificaciones de los bronquiólos
Amplitud	Valor máximo que adquiere una variable en un fenómeno oscilatorio
Análisis gravimétrico	Consiste en determinar la cantidad proporcionada de un elemento, radical o compuesto presente en una muestra, eliminando todas las sustancias que interfieren y convirtiendo el constituyente o componente deseado en un compuesto de composición definida, que sea susceptible de pesarse
Analito	Componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra
Baño ultrasónico	Aparato emisor de ondas ultrasonoras
Cromatógrafo	Aparato que sirve para realizar cromatografías
Desorción	Antónimo de adsorción; la eliminación de materia desde un medio adsorbente
Ensilado	Acción y efecto de ensilar
Ensilar	Meter los granos, semillas y forraje en el silo
Flavinas	Grupo de sustancias heterocíclicas que presentan tres ciclos nitrogenados
Frecuencia	Número de veces que se repite un proceso periódico por unidad de tiempo
Glomerular	Relacionado con los glomérulos
Glomérulo	Es la unidad anatómica funcional del riñón donde radica la función de aclaramiento o filtración del plasma sanguíneo



Lixiviado	Relacionado con lixiviar
Lixiviar	Tratar una sustancia compleja, como un mineral, con un disolvente adecuado para separar sus partes solubles de las insolubles
Neurotransmisor	Una sustancia, producto o un compuesto que transmite los impulsos nerviosos en la sinapsis
Peristaltismo	Relacionado con peristalsis
Peristalsis	Se dice principalmente del movimiento de contracción a lo largo de los intestinos para impulsar los materiales de la digestión
Propiedades coligativas	Son aquellas que dependen sólo de la cantidad de partículas de soluto que están presentes en la solución y no de la naturaleza o tipo de soluto
Propiedades reológicas	Son aquellas que estudian el movimiento de los fluidos

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Anónimo. 2007a. Búsqueda en redes internacionales (Internet). Dirección electrónica (Consultada en febrero de 2007): <http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenu/MenudeInformaciones/LosTes/Proceso-y-clasificacion-del-te-negro.htm>
- Anónimo. 2007b. Búsqueda en redes internacionales (Internet). Dirección electrónica (Consultada en marzo de 2007): <http://www.chem.utoronto.ca/coursenotes/CHM416/extraction.pdf>.
- Anónimo. 2007c. Búsqueda en redes internacionales (Internet). Dirección electrónica (Consultada en mayo de 2007): [http://www.ingenierias.uanl.mx/5/pdf/5\\_Boris\\_uso\\_del\\_ultrason.pdf](http://www.ingenierias.uanl.mx/5/pdf/5_Boris_uso_del_ultrason.pdf)
- Anónimo. 2006a. Búsqueda en redes internacionales ("Internet"). Dirección electrónica (Consultada en agosto de 2006): [http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/SP\\_AG/sp\\_cafe.html](http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/SP_AG/sp_cafe.html)
- Anónimo. 2006b. Búsqueda en redes internacionales (Internet). Dirección electrónica (Consultada en septiembre de 2006): [www.fao.org/docrep/field/003/AB459S/AB459S05.htm](http://www.fao.org/docrep/field/003/AB459S/AB459S05.htm)
- Anónimo. 2006c. Búsqueda en redes internacionales (Internet). Dirección electrónica (Consultada en febrero de 2006): <http://www.revfacagronluz.org.ve>
- Anónimo. 2006d. Búsqueda en redes internacionales (Internet). Dirección electrónica (Consultada en febrero de 2006): <http://www.unet.edu.ve/~frey/varios/decinv/VIJCT/CIENCIAS%20RESUMENES.htm#C16>
- Anónimo. 2001. Guidance for industry **Bioanalytical method validation**. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Veterinary Medicine. EEUU. Dirección electrónica (Consultada en agosto de 2006): <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf>
- Anónimo. 2000. Operator's Manual Brasonic Ultrasonic Cleaners. Danbury, CT. EEUU.

- Anónimo. 1999. Chromatography Catalog Alltech. México D.F. México.
- Anónimo. 1998. Guide ***The fitness for purpose of analytical methods***. EURACHEM. (Consultada en agosto de 2006): <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>
- Anónimo. 1994. ***Reviewer guidance. Validation of chromatographic methods***. Center for drugs evaluation and research. EEUU. Dirección electrónica (Consultada en agosto de 2006): <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/cmc3.pdf>
- Apgar J.L., Tarka S.M. 1998. ***Methylxanthine composition and consumption patterns of cacao and of chocolate products***. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Arnaud M. 1993. ***Caffeine***. En: Encyclopaedia of food science, technology, and nutrition. Macrae R., Robinson R. y Sadler J. Academic Press. Pp. 566-571. Londres, Gran Bretaña.
- Balentine D.A., Harbowy M.E., Graham H.N. 1998. ***Tea: The plant and its manufacture; chemistry and consumption of beverage***. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Cedillo-Ramírez, V. 2002. Validación de técnicas analíticas en cromatografía de líquidos. ***Tesis profesional***. UNAM, Facultad de Química, México D.F. México.
- Clarke J., Macrae R. 1993. ***Coffee***. En: Encyclopaedia of food science, technology, and nutrition. Macrae R., Robinson R. y Sadler J. Academic Press. Pp. 1131-1146 Londres, Gran Bretaña.
- Coste R. 1986. ***El Café***. Blume. Pp. 167-193. Zaragoza, España.
- González-Medina J. 2001. Aprovechamiento integral de pulpa de café. ***Tesis profesional***. UNAM, Facultad de Química, México D.F. México.
- Graham H.N. 1998. ***Mate***. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Horwitz W. 2000. ***Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods of Analysis***. Publishing by ADAC. 17a Ed. Washington D.C. EEUU.

- Hurst W.J., Martin R.A., Tarka S.M. 1998. **Analytical methods for quantitation of methylxanthines**. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Iciar A. 2000. **Alimentos. Composición y Propiedades**. McGraw Hill. Pp. 241-244. Madrid, España.
- Kreiser W.R., Martín R.A. 1980. High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** **63**(3):591-594.
- Manson T., Paniwnyk L., Lorimer J. 1996. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics sonochemistry.** **3S**:253, 255, 256, 260.
- Nair H. 1973. **Cromatografía de líquidos de alta presión**. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Pp. 1-10, 15-25, 39-45. Washington D.C. EEUU.
- Popl M., Fährnirch J., Tatar V. 1990. **Chromatographic analysis of alkaloids**. Marcel Dekker, Inc. Pp. 1-55. Nueva York. EEUU.
- Robinson J., Owuor O., Dowelland I., Taylor S. 1993. **Tea**. En: Encyclopaedia of food science, technology, and nutrition. Macrae R., Robinson R. y Sadler J. Academic Press. Pp. 4521-4542 Londres, Gran Bretaña.
- Saag K. 1992. **HPLC in food analysis**. En Determination of food additives by HPLC. Macrae R., Robinson R. y Sadler J. Academic Press. Pp. 224-227. Londres, Gran Bretaña.
- Sawyer R., Kirk R. 1991 **Pearson's composition and analysis of foods**. Longman Scientific and Technical. Pp. 356-537, 362-365. Londres, Gran Bretaña.
- Skoog D., West D. 2001. **Principios de análisis instrumental**. Mc Graw Hill. Pp. 703-709, 912, 913. México D.F. México.
- Solís J.A. 1995. **Enfoque de aprovechamiento en el manejo de residuos sólidos y líquidos de la agroindustria**. El caso de la pulpa de café por vía húmeda. Pub. Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., México.

- Solís-Fuentes J.A., Méndez-Dauzón J., Castellanos-Hernández M.T., Rojano-Hernández F.I., Jiménez-Bermúdez M., Sánchez-López L., Durán-de-Bazúa M.C. 1998. **Los residuos agroindustriales, su potencialidad de uso, cinco ejemplos**. Vol. 4. Serie Tecnologías más limpias. Cap. 2. La pulpa y el mucílago de café. Pp. 64-94. Pub. PIQAYQA, UNAM. México, D.F. México.
- Spiller A. 1998a. **The coffee plant and its processing; the chemical components of coffee**. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Spiller G. 1998b. **Basic metabolism and physiological effects of methylxanthines**. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Stephens J., Spiegel R. 2002. **Estadística**. Mc Graw-Hill. México D.F.
- Tarka S.M., Hurst W.J. 1998. **Introduction to the chemistry, isolation and biosynthesis of methylxanthines**. En Caffeine. Spiller G. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU.
- Toma M., Vinatoru M., Paniwnyk L., Manson T. 2001. Investigation of effects of ultrasound on vegetable tissues during solvent extraction **Ultrasonics sonochemistry**. 8(137):138-139,142.
- Tzanavaras P., Themelis D. 2006. Development and validation of high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column. **Analytica chimica acta**. Doi:10.1016/j.aca.2006.07.081.
- Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics sonochemistry**. 8:303-305, 307-313.
- Zuluaga V.J. 1989. Utilización integral de los subproductos del café. En Memorias del Primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. Roussos, Licono-Franco y Gutiérrez-Rojas, Eds. INMECAFÉ/ORSTOM/UAM. Pp. 63-76. México D.F. México.