

61
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“ESPECTROFOTOMETRIA DE DERIVADAS
EN LA DETERMINACION DE CAFEINA
EN PRODUCTOS DE CAFE”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
GABRIELA RODRIGUEZ BARRON

ASESORES: DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ
M.C. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CHAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CHAUTITLAN
P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Especialización de compuestos de la determinación
de cafeína en productos de café.

que presenta la pasante: Gabriela Rodríguez Barrón
con número de cuenta: 22-02222 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biotécnica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Chautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 02 de Mayo de 1997

PRESIDENTE	M. en C. José Guillermo Benítez Carrillo	(67)
VOCAL	M. en C. Guadalupe B. Pineda Galante	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	Dr. Alberto Rojas Hernández	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	M. en C. María A. Morales Delgado	<i>[Firma]</i> 22/5/97
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Martha P. Zúñiga Cruz	<i>[Firma]</i> 23/5/97

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS.

Gracias porque a pesar del tiempo transcurrido, me es posible lograr uno de mis más grandes anhelos, mi formación como profesionista, gracias porque nunca me has desamparado y siempre has estado conmigo guiándome en el camino, dándome fortaleza para seguir adelante, enseñándome que hay que luchar por lo que anhelamos y aunque a veces tenemos tropiezos y caemos lo importante es levantarse y no darnos por vencidos. Pongo en tus manos está carrera para que me ayudes a servir a mis semejantes, gracias por dame una familia como la que tengo, este logro también es de ellos pues siempre me han apoyado y guiado en la vida

A MI PADRE BRUNO RODRÍGUEZ ORTA.

No existen palabras con las cuales pueda expresar el sentimiento de gratitud hacia ti, eres un gran ejemplo para mí, admiro tu esfuerzo y tu trabajo, te agradezco todo lo que me has dado y el sacrificio que has hecho para que yo sea alguien en la vida.

A MI MADRE EVANGELINA BARRÓN HERNANDEZ.

Por tu amor, comprensión, confianza, entereza, que brindas en todo momento, gracias por ser mi mejor amiga, solo en ti puedo confiar tu sabiduría de madre me ha enseñado que en la vida siempre hay un mañana mejor para el que se esfuerza, en este logro tu participación ha sido muy valiosa gracias por tu apoyo.

A MIS HERMANOS JESÚS Y SALVADOR.

Por todo su ejemplo, consejos, apoyo, confianza y empeño que ponen en mí para que siga siempre adelante, juntos hemos vivido momentos difíciles pero unidos siempre lograremos las metas propuestas.

A la Familia Meguro.

Muy en especial a Harumi por ser un ser humano tan especial para mí, gracias por ser un apoyo en momentos malos y buenos.

A el M en C. Edgar Aguilera Cerón.

Por la paciencia, tiempo, enseñanzas y sin sabores que pasó, sin su apoyo que incondicionalmente me brindó el presente trabajo no se hubiera realizado, gracias por todo.

A el Dr. Alberto Rojas Hernandez.

Por la confianza, apoyo, y seguridad que me brindo, por que sin el yo no hubiera podido alcanzar la culminacion de mi mas grande anhelo, mi formacion como profesionista

A la M en C Guadalupe Pérez Caballero.

Por su apoyo en los momentos mas dificiles por los que pase

A el M en C Enrique Angeles Anguiano.

Por despertar con su ejemplo la inquietud de buscar un apoyo para la culminacion del presente trabajo

A la Dr Susana Elisa Mendoza Elvira.

Por tu amistad, consejos y apoyo que siempre me ha brindado

A la Q.F.B. Carolina Moreno Ramos.

Por ser una persona que da sin esperar recibir nada a cambio gracias por tu amistad

Mi más profundo reconocimiento a los profesores que forman parte del H. Jurado.

Por el tiempo invertido en la revision del presente trabajo y por sus valiosas aportaciones, sinceramente gracias por acceder a revisar y corregir el trabajo en excelente forma sin tener ninguna responsabilidad para conmigo y por dedicar parte de su valioso tiempo y brindarme su ayuda de manera incondicional y desinteresada

A mis amigos

Carmen, Cergio, Claudia, Ernesto, Grisel, Guadalupe, Ivonne, José Luis, Leticia, Maribel, Nancy, Oscar, Raquel, Raúl y Rodolfo

A Todos los miembros del posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Porque estuvieron conmigo y siempre me escucharon en los momentos más difíciles por los que pasé para la culminación del presente trabajo, no los menciono pero cada uno de ellos sabe muy bien que yo les estoy muy agradecida por todo.

ÍNDICE

	PÁGINA.
Lista de figuras.	
Lista de tablas.	
1. Introducción	1
2. Justificación	3
3. Objetivos	5
4. Generalidades	6
4.1 Fundamentos teóricos de la Espectroscopia de derivadas	9
4.2 Ejemplos del uso de la Espectroscopia de derivadas	14
4.3 Factores que influyen en la derivada de los espectros	16
4.4 Cafeína	17
4.5 El café	20
5. Cuadro metodológico	24
6. Parte experimental	25
6.1 Diagrama 1 Método Segunda Derivada	28
6.2 Diagrama 2 Método Sin Derivar	29
6.3 Diagrama 3 Método A O A C	30
6.4 Diagrama 4 Método Kjeldahl	31
7. Resultados	32
7.1 Método Segunda Derivada	36
7.1.1 Método Segunda Derivada Longitud de onda 299 nm	40
7.1.2 Método Segunda Derivada Longitud de onda 290 nm	42
7.2 Método Sin Derivar Longitud de onda 299 nm y 290 nm	43
7.3 Método A.O.A.C. Longitud de onda de 276 nm	45
7.4 Método Kjeldahl	45
8. Análisis y discusión de cada método estudiado	47
9. Conclusiones	52
10. Referencias	54
Apéndice I	58
I.1 Cafeína	58
I.2 Síntesis	58
I.3 Importancia Farmacológica	58
I.4 Mecanismo de acción	58
I.5 Farmacocinética	59
I.6 Farmacodinamia	60
I.7 Toxicología	61
Apéndice II	63
II.1 Calidad de Café en México	63
II.2 Clasificación del café	63
II.3 Variedades de Café cultivadas en México	63
II.4 Composición del Café	64

	PÁGINA.
Apéndice III	69
III.1 Procedimiento del método Micro Kjeldahl	69
III.2 Procedimiento del método A O A C	70
III.3 Procedimiento del método Sin Derivar	71

LISTA DE FIGURAS.

PÁGINA

Figura

1. Pico Gausiano ideal, (a) Espectro de primera derivada, (b) Espectro de segunda derivada (c) ...	10
2. Espectrometría de primera derivada para la evaluación cuantitativa de una banda pequeña (a) sola y (b) oculta por una banda de traslape ancha	11
3. Segunda derivada del espectro de absorción de la guayanesina en agua 50µg/ml, el número de parámetros útiles en la cuantificación de dicha sustancia, se incrementa...	15
4. Fórmula estructural de la cafeína	18
5. Espectros de absorción de Cafeína en presencia y ausencia de NaOH	33
6. Espectros de absorción de Ácido tánico en presencia y ausencia de NaOH	34
7. Espectros de absorción de Caramelo en presencia y ausencia de NaOH	35
8. Espectros de absorción de absorción de la mezcla de Cafeína, Ácido tánico y Caramelo en presencia de NaOH	36
9. Espectros de segunda derivada para cafeína en ausencia de NaOH	37
10. Espectros de segunda derivada para cafeína en presencia de NaOH	37
11. Espectros de segunda derivada para ácido tánico en presencia de NaOH	38
12. Espectros de segunda derivada para caramelo en presencia de NaOH	39
13. Espectros de segunda derivada para la combinación cafeína, caramelo y ácido tánico en presencia de NaOH	40
14. Curvas de calibración para el producto (E)	42
15. Curva de calibración en presencia y ausencia de NaOH, para el método sin derivara una longitud de (299nm)	44
16. Curva de calibración en presencia y ausencia de NaOH, para el método sin derivara una longitud de (290nm)	44
17. Curva de calibración para cafeína por el método de la A.O.A.C.	45
18. Ácido Clorogénico uno de los más importantes encontrados en el café tostado	67
19. Taninos hidrosolubles	68

LISTA DE TABLAS.**PÁGINA.****TABLA**

1. Contenido de cafeína en bebidas	21
2. Especificaciones que deben cumplir el producto café 100% puro tostado en grano ó molido	22
3. Especificaciones que deben cumplir el producto de café tostado y café mezclado con azúcar	23
4. Especificaciones que deben cumplir los productos de café instantáneo	23
5. Aditivos que interfieren en la determinación de cafeína	32
6. Parámetros de regresión del método segunda derivada 299nm	41
7. Parámetros de regresión del método segunda derivada 290nm	41
8. Coeficientes de variación entre ensayos	48
9. Contenido de cafeína en los productos de café	48
10. Porcentajes de recuperación en los productos de café	49
11. Estructura química y actividad farmacológica de las xantinas	59
12. Componentes del café verde	65
13. Composición del café tostado	67

I. INTRODUCCIÓN

Para que el hombre pueda disfrutar de los alimentos que consume, éstos deberán de ajustarse a ciertas propiedades organolépticas y asociadas a ellas deberán estar presentes en la proporción adecuada, de tal forma que recuerden al producto natural, y de esta manera cumplir con diversas reglamentaciones para su comercialización. Todo esto, ha impulsado una demanda cada vez mayor del control analítico de los productos, debido a que es necesario realizar diferentes pruebas que varían desde simples determinaciones de las características de composición, hasta pruebas más complejas. Dentro de las reglamentaciones a las que han de ajustarse los alimentos para su análisis, es necesario contar con normas de calidad que contengan la documentación e información necesaria de que el sistema es conveniente, adecuado y que cumple con las especificaciones que rigen actualmente, con la finalidad de poder ofrecer al consumidor un producto de calidad. Ramírez (1995)

Los avances tecnológicos de los últimos años, han hecho necesaria una política de desarrollo capaz de obtener y mantener una calidad, con un criterio de competitividad internacional, que permita el aprovechamiento integral de sus materias primas y que, además, pueda evitar la dependencia que se tiene del exterior y, de esta manera, se pueda ofrecer una norma de operación y administración confiable que disponga de un sustento legal capaz de enfrentar reclamos contra el producto.

El café en sus diferentes presentaciones es, hoy día, uno de los productos de exportación de nuestro país y, como fuente captadora de divisas, sólo es superado por el petróleo y el turismo. Sabiendo la importancia de este producto, es conveniente contar con una tecnología apropiada que asegure una completa y adecuada explotación de dicho producto, y que además genere los suficientes recursos y que permitan ofrecer al consumidor una calidad a un precio que cumpla con lo preestablecido en las reglamentaciones a las que han de ajustarse este tipo de alimentos para su comercialización y, con esto, lograr su permanencia en el mercado. Immeccafe-Compañía Nestlé (1990), Luna (1994), Shmidt (1992)

En el mercado nacional se encuentran una gama amplia de cafés solubles descafeinados, con azúcar, solubles enteros y de grano. Hasta el momento, no existe en México una Norma Oficial que certifique adecuadamente la calidad de estos productos. Además, en la actualidad hay un gran interés de consumir cafés sin cafeína por los efectos adversos que ésta presenta.

En México como en algunos países se utilizan reglamentaciones que no han sido actualizadas desde el punto de vista de las nuevas tecnologías y, por lo tanto, el aseguramiento de la calidad no es confiable. Debido a la gran diversidad en la instrumentación analítica, se ha favorecido el desarrollo de técnicas altamente específicas, sensibles y confiables, es así que la espectroscopia de absorción es indudablemente una de las técnicas analíticas que proporciona ventajas para el análisis cuantitativo, de la cafeína ajustándose a las necesidades actuales de nuestra sociedad.

La Espectroscopia de derivadas ha favorecido este tipo de estudios gracias a la introducción del principio de diferenciación numérica, haciendo posible la obtención de

derivadas de orden superior con una instrumentación sencilla abriendo un amplio campo de aplicaciones accesibles, a la mayoría de los laboratorios de análisis. De León (1996).

Mucho se ha hablado y escrito en torno al origen del café, pero sin duda, las gratas sensaciones que produce el café para mucha gente, tienen una explicación, la cafeína. Esta es responsable de que el café actúe en el organismo como un estimulante del Sistema Nervioso Central (SNC).

Sin embargo, cuando la cafeína se ingiere en grandes cantidades puede causar una gran variedad de reacciones en el cuerpo, como son ansiedad, insomnio, cefalea, arritmias, vómito y confusión mental. El consumo excesivo de cafeína en el adulto sano (más de 600 mg al día ósea el equivalente a cinco o seis tazas de café cargado) puede provocar intranquilidad que puede llegar a delirio, alucinaciones sensoriales, taquicardia, extrasístoles, diuresis intensa, tensión y dolor en los músculos esqueléticos y adelgazamiento. Desde luego, en otras personas muchas de estas reacciones depende de la cantidad ingerida y de la tolerancia que posee cada persona. Se dice que la dosis tolerable de cafeína en el organismo es de alrededor de 125 mg, por lo que consumir 40 a 60 mg de este alcaloide (lo que en promedio tiene una taza de café instantáneo fuerte) no rebasa ese límite ni causa trastornos fisiológicos. Una persona no acostumbrada a la cafeína puede llegar a beber de dos a tres tazas de café sin padecer efectos negativos, especialmente si se acompaña el café con leche o alimentos. Sin embargo, son pocas las personas menores de 20 años que beben café, el máximo de los consumidores se encuentra entre los 30 y 50 años de edad y las personas aún mayores sacan ventaja de su estimulación. Esto provoca que se desarrolle una tolerancia a la cafeína y al café, de manera que los bebedores habituales necesitan más para lograr tener un efecto. Cabe mencionar que en algunas personas no les afectará el tomar 2 ó 3 tazas al día y, sin embargo, en otras, causará insomnios, trastornos corporales, dolor intestinal, dolores de cabeza o palpitaciones en el corazón, entre otras. Es por esta razón que se ha popularizado el café descafeinado, así como también se han utilizado sustitutos del café, productos saborizantes de café. Por esta razón, hoy día es más probable la adulteración y uno de los agentes adulterantes que merece especial mención es la achicoria, esta adulteración se da porque algunos consumidores prefieren el color oscuro y el sabor algo amargo, que un poco de achicoria imparte al café solo. Bowman (1984), Hart (1991), Person (1988)

2. JUSTIFICACIÓN

Generalmente, en una gran cantidad de casos es necesario recurrir a métodos físicos, químicos o fisicoquímicos con el fin de separar las posibles interferencias que presentan las muestras a analizar, por lo que resulta importante seleccionar adecuadamente el método de análisis, tomando en cuenta diversos factores como son selectividad, precisión, sensibilidad, reproducibilidad, tiempo de desarrollo así como el costo. En los métodos espectrofotométricos, la precisión está referida a la determinación de una concentración y ésta a su vez, depende en parte de la precisión de las medidas de la absorbancia. Debido a que una gran cantidad de estos métodos analíticos involucran procesos previos de separación, así como inconvenientes en el análisis de los productos actuales de consumo es necesario un método de análisis que sea rápido, simple, eficiente y específico, y que además pueda lograr, en lo posible, eliminar interferencias producidas por la mezcla de los componentes de la muestra. Ya que los métodos actuales no pueden resolver de una manera adecuada el problema, resulta interesante contar con un método de análisis capaz de poder ofrecer una vía más directa, económica, y confiable. De Leon (1996), Cepeda (1990), Oi-Wah Lau y col (1992)

En espectrofotometría de absorción las representaciones gráficas son especialmente útiles en casos en que el tratamiento cuantitativo de los espectros normales es difícil e incluso imposible, tanto para el análisis de productos puros como para ciertas mezclas, por lo que la determinación precisa de longitudes de onda de máxima absorción de una banda muy amplia o la resolución de mezclas de varios componentes donde existe traslape de los espectros representa enormes dificultades. Por todos estos inconvenientes se requiere de una técnica capaz de resolver todos estos problemas de tal manera que se pueda poner en evidencia una estructura fina del análisis de interés y poder seguir además los cambios más sutiles de todos y cada uno de los componentes que se encuentran presentes en la muestra de estudio, y más aun, poder medir la concentración de un analito cuyo banda está escondida por una gran traslape con otra banda debido a algo que se encuentra en la muestra y que impide la posibilidad de resolverlos por separaciones previas. Harris (1992), Skoog (1989), Skoog (1992)

En la actualidad, existe una amplia información de técnicas y procedimientos que se pueden aplicar para evaluar la calidad y la composición del café. Dentro de estas metodologías se pueden mencionar entre las más importantes, las técnicas oficiales las cuales son Norma oficial de método de prueba para la determinación de cafeína en cafés NOM-F-176-1968, café 100% puro tostado en grano o molido NOM-F-13-S-1980, café tostado y café mezclado tostado con azúcar NOM-F-173-S-1982, Método A.O.A.C. Official Methods of Analysis Of the Association of Official Analytical Chemists. Por otro lado, se han venido estableciendo metodologías más novedosas para el estudio del contenido de cafeína en los diferentes tipos de café. Cabe señalar que estos métodos actualmente no fueron proporcionadas por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial [SECOFI], sino por el Consejo Mexicano del Café, dentro de los cuales se encuentra la Norma ISO-4052 determinación del contenido de cafeína en café, así como la Norma ISO-10095 determinación del contenido de cafeína en café utilizando el método de cromatografía líquida de alta resolución. A.O.A.C. (1992), Estándar Internacional de Café

(1983),). Estandar Internacional de Café (1992), NOM- F-176 (1968), NOM-F-13-s (1980), NOM-F-173-s (1982)

Teniendo como base la necesidad de evolucionar de tal forma que las posibilidades con que el químico analista cuente puedan ampliarse, logrando así que éste pueda contar con la disyuntiva de elegir o seleccionar la metodología de acuerdo a sus necesidades. Dentro de estas metodologías, la más novedosa es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo esta una técnica que no puede ser aplicada convenientemente, en cualquier tipo de laboratorio debido al alto costo del equipo, así como de los reactivos que se utilizan. Se considero importante analizar las ventajas y desventajas del uso de la espectroscopia de derivadas frente a los métodos ya propuestos en la cuantificación de cafeína, ya que en la actualidad el mercado nacional cuenta con una amplia gama de cafés solubles, solubles descafeinados, solubles con azúcar, y de grano Cepeda (1990), Houpt (1977), Oi-Wah Lau y col (1992)

Tomando en cuenta que en años posteriores a 1968 no se han reportado métodos más actuales de análisis de cafeína en muestras de café, se considero que el objetivo del presente trabajo consistiera en resaltar las ventajas y conveniencia del uso de técnicas de espectroscopia de derivada en la resolución de los problemas actuales que presentan este tipo de productos Balestrieri (1978), Bowman (1984), Fell (1978), Such (1980)

3. OBJETIVO GENERAL.

Destacar la importancia y conveniencia del uso de técnicas de espectroscopía de derivadas en la cuantificación de cafeína en cafés del mercado Nacional Mexicano, el cual permita establecer la calidad de dichos productos

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Estudiar las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de cuantificación de cafeína en diferentes marcas de café comerciales.**
- 2. Estudiar la determinación de cafeína usando las derivadas del espectro UV como técnica alterna a las ya existentes.**

4. GENERALIDADES

Los métodos espectroscópicos de análisis se basan en la medida de la radiación electromagnética absorbida o emitida por la materia

Los métodos espectrofotométricos no se limitan al uso de la luz visible, sino que también incluyen a aquellos que emplean energía radiante de otras regiones del espectro electromagnético, como el ultravioleta o el infrarrojo

Estas formas de radiación pueden describirse en función de dos modelos el ondulatorio el cual describe a la radiación como ondas viajando a la velocidad de la luz 3×10^{10} cm/seg en el vacío y el modelo corpuscular el cual se describe a la luz como un flujo de partículas en donde cada partícula (fotón) lleva asociada una cantidad definida de energía

La espectroscopia UV es un método instrumental que mide las transiciones electrónicas en las moléculas y consiste en la transición de un electrón desde un orbital ocupado (n, σ, π) hasta otro de antienlace desocupado (σ^*, π^*) La cantidad de energía absorbida en la región ultravioleta del espectro depende de la estructura electrónica de la molécula, y corresponde a la promoción de los electrones desde orbitales en el estado basal a orbitales de energía en estado excitado $n \rightarrow \pi^*, \sigma \rightarrow \pi^*$

En las moléculas que absorben en la región UV-VIS son importantes los siguientes tipos de electrones

1. Electrones en enlaces sencillos σ Estos electrones, están enlazados fuertemente, por lo que se requiere de gran energía para promoverlos a orbitales desocupados, por consiguiente su absorción se observará en el UV lejano
2. Electrones en orbitales π presentes en los dobles y triples enlaces los enlaces π son más débiles que los σ por lo que se requiere de menos energía para la excitación de sus electrones
3. Electrones de no enlace, conocidos como electrones n , son contribuyentes potenciales de rasgos espectrales distintivos de las moléculas que los poseen

Los cambios en una molécula ocasionados por absorción de luz pueden ser electrónicos (cambio en la energía de los electrones distribuidos alrededor de los átomos de la molécula), vibracionales (cambios en la separación promedio de los núcleos de dos o más átomos) y rotacionales (rotación de un dipolo químico) Se necesita una radiación de energía más alta para que se efectúen transiciones electrónicas (cambios), que la necesaria para que se efectúen transiciones rotacionales o vibracionales Por consiguiente, las transiciones electrónicas son ocasionadas por absorción de la luz visible y ultravioleta, en tanto que los cambios rotacionales y vibracionales son ocasionados por la absorción de radiación infrarroja o de longitud de onda mayor Connors (1980), Harris (1992), Skoog (1989), Skoog (1992)

La espectrofotometría analítica se basa en dos leyes fundamentales La primera ley, atribuida a Bouguer (1729), dice que la proporción de la luz absorbida en un medio es independiente de la intensidad de la luz incidente y que cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual a la luz incidente Connors (1980), Harris (1992), Skoog (1989)

La segunda ley es la de Beer (1852), introduce el concepto de número de entidades absorbentes (concentración)

La combinación de estos descubrimientos ha llegado a ser conocida como la ley de Beer, quizás porque la dependencia de la concentración es la que más se aplica en el análisis químico. Harris (1992)

De acuerdo con la Ley de Lambert- Beer La espectroscopia de absorción es, indudablemente, una de las técnicas analíticas con mayor ventaja; estas incluyen rapidez, sencillez especificidad y sensibilidad, siendo este uno de los métodos fisicoquímicos más empleados en el análisis

Las características más importantes de los métodos espectrofotométricos y fotométricos son:

- Amplia aplicabilidad - Esto se da tanto en especies orgánicas como inorgánicas que absorben en el margen del UV o del visible, pudiendo analizarse muchas otras especies absorbentes con un tratamiento químico adecuado
- Alta sensibilidad - Son normales absortividades molares comprendidas entre 10.000 y 40.000. Así, es posible realizar el análisis en el margen de concentraciones de 10^{-4} a 10^{-7} M, que pueden alcanzar límites inferiores de hasta 10^{-6} o 10^{-7} M
- Alta o moderada selectividad - La sensibilidad respecto a la concentración, depende de la velocidad de cambio de la absortividad molar (ϵ) a una longitud de onda determinada, $\frac{d\epsilon}{d\lambda}$, en lugar de hacerlo sobre la magnitud absoluta de (ϵ). Así, son posibles análisis más sensibles de compuestos con picos de absorción agudos, especialmente cuando se obtienen derivadas de tipo electrónico
- Buena precisión - En los procedimientos típicos de espectrofotometría, el error relativo en las medidas de concentración suele oscilar entre 1 y 3%. Con técnicas especiales, entre ellas la espectroscopia de derivadas, se reduce la imprecisión a varias décimas del porcentaje
- Sencillez y comodidad

La ecuación que describe a la ley de la absorción de la luz es la siguiente

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \log \frac{100}{\%T} = abc \quad \text{donde}$$

A = Absorbancia

T = Transmitancia

a = Coeficiente de absortividad, o simplemente absortividad. Es una constante de proporcionalidad que varía con la longitud de onda de la radiación empleada, es una propiedad molecular de la especie que absorbe luz

b = Trayecto por la celda, expresado en centímetros

C = Concentración de la sustancia absorbente.

La ley de Beer presenta limitaciones por el hecho de no tomar en consideración los efectos del pH, temperatura, longitud de onda o interacciones soluto-solvente y soluto-soluto, por lo que la ley de Beer se aplica generalmente a soluciones diluidas en que estas interacciones son insignificantes Connors (1980), Harris (1992), Hart (1991), Skoog (1989), Skoog (1992)

Las desviaciones de la ley de Beer caen en tres categorías reales, instrumentales y químicas Connors (1980), Harris (1992)

1.- Las desviaciones reales: Proviene de los cambios en el índice de refracción del sistema analítico, la ley de Beer se aplica solo a bajas concentraciones. A concentraciones de 10^{-3} M el índice de refracción es esencialmente constante, pero a concentraciones elevadas el índice de refracción tiene variaciones considerables y, por tanto, la absorptividad las representa también. Dentro de los errores de la ley de Beer están los relativos a la concentración, los cuales son función del ruido e incertidumbre en la calibración. El intervalo óptimo de concentraciones medible es aquel en el que las absorptancias caen entre 0.2 y 0.8, aunque en equipos modernos el valor máximo de absorptancia puede ampliarse hasta 3.0. Para evitar errores por luz dispersa, deben evitarse las longitudes de onda de los extremos del intervalo de UV-VIS Connors (1980), Harris (1992)

2.- Las desviaciones instrumentales: Proviene, en primer lugar, de los filtros de banda o monocromadores. La ley de Beer supone una radiación monocromática, si la absorptividad es prácticamente constante sobre una banda de radiación instrumental, entonces la ley de Beer puede cumplirse con pequeños intervalos de error Connors (1980), Harris (1992)

Realmente un sistema puede cumplir la ley de Beer si la intensidad de variación de la absorptividad, con la longitud de onda es constante en el intervalo de longitudes de onda que el sector del instrumento deja pasar (banda instrumental), siempre que el ajuste de la longitud de onda nominal sea muy reproducible Connors (1980), Harris (1992).

Las desviaciones a la ley de Beer son más grandes para bandas instrumentales anchas y para bandas de absorción estrechas, y viceversa. Por lo tanto lo más importante es la razón del ancho de rendija o ventana espectral (banda instrumental) y el ancho de banda en la banda de absorción Connors (1980), Harris (1992)

3.- Las desviaciones químicas: Son causadas por desplazamientos en la posición de un equilibrio, físico ó químico, que involucra especies absorbentes de radiación en un sistema Connors (1980), Harris (1992)

El control del pH afecta la ionización de una molécula, lo que afecta en gran medida su espectro, un cambio en el estado de protonación puede producir una variación en la longitud de onda máxima de hasta 40 nm o más Harris (1992)

Un disolvente presenta diferentes interacciones con un soluto absorbente, estas dependen de la polaridad del soluto y el disolvente. Las interacciones pueden conducir a un cambio en la longitud de onda máxima de un soluto absorbente cuando se utilicen dos disolventes diferentes. Harris (1992)

Otro efecto que hay que considerar para evitar los errores por factores químicos, son las interacciones soluto-soluto en que hay que tomar en cuenta la agregación molecular y los

equilibrios de asociación-disociación influidos también por el pH, además de reacciones ácido-base y de formación de complejos Harris (1992)

4.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ESPECTROSCOPÍA DE DERIVADAS.

Bajo el nombre de espectros de derivadas, se entiende la representación gráfica en un intervalo determinado de longitudes de onda, del cociente diferencial De León (1996), O'Haver (1979), O'Haver (1977), Skoog (1989), Skoog (1992)

$$\frac{dA}{d\lambda} \quad \text{Para la primera derivada.}$$

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} \quad \text{Para la segunda derivada.}$$

Siendo A la absorbancia y λ la longitud de onda. Con base en lo anterior, se puede decir que la primera derivada de un espectro de absorción, es la representación gráfica de la pendiente de la curva de absorción en cada longitud de onda del intervalo medido, o sea:

$$\frac{\Delta A}{\Delta \lambda} \quad \text{Cuando } \Delta \lambda \rightarrow 0$$

Podríamos decir también que la primera derivada de un espectro de absorción, es la velocidad de cambio en la absorción con respecto a la longitud de onda, mientras que la segunda derivada de un espectro de absorción, sería la aceleración de cambio de la absorción con respecto a la longitud de onda Harris (1992)

La derivada de los espectros se puede obtener de dos formas según el tipo de instrumentación:

1.- Espectrofotómetros que utilizan la señal de salida que permite la derivación mediante:

- a) Diferenciación electrónica.
- b) Tacómetro mecánico.
- c) Diferenciación numérica.

2.- Espectrofotómetros que emplean el sistema óptico, para lo cual debe tratarse de:

- a) Aparatos que emplean dos longitudes de onda.
- b) Mediante modulación de longitudes de onda.
- c) Sustracción de espectros desplazados.

Dentro de los métodos más importantes se encuentran:

- 1) El método de modulación de longitud de onda. En este método la longitud de onda se hace oscilar rápidamente sobre un intervalo de longitud de onda, produciendo una señal modulada, la cual puede ser descifrada para proporcionar ya sea la primera derivada o derivadas de mayor orden, a una longitud de onda estacionaria. Si el monocromador es simultáneamente registrado, se obtiene la derivada.
- 2) El método de doble longitud de onda. En éste, el espectro de la primera derivada es generado cuando existe simultáneamente un intervalo de longitud de onda

suficientemente pequeño entre los dos monocrómadores registradores en este tipo de aparatos, solo se proporciona la primera derivada de un espectro de absorción

- 3) El método de diferenciación electrónica. En este caso se conectan en serie módulos electrónicos entre el registrador y la salida del espectrofotómetro. Estos proporcionan tanto la primera derivada, así como derivadas de mayor orden. Dentro de las ventajas de este método, además de un costo menor, se encuentra la facilidad con que pueden ser adaptados registradores comunes

Algunos autores consideran que en los espectros de primera derivada existe un valor máximo y un valor mínimo, pero en realidad el número de máximos y mínimos dependerá del tipo de espectro de absorción en estudio. De Leon (1996), O'Haver (1977), Schmitt (1977)

Si se supone que un espectro de absorción tiene un solo máximo (Figura No 1(a)) y que cumple con la características de un pico Gaussiano (pico simétrico). Si se obtiene la primera derivada de dicho pico y se grafican dichos valores contra la longitud de onda, se observa que este nuevo espectro presenta un valor máximo y un valor mínimo y que el valor máximo del espectro de absorción, corresponde con cero en el espectro de primera derivada, tal como se observa en la Figura No 1(b)

A la distancia vertical existente entre el máximo y el mínimo de la primera derivada, se le conoce con el nombre de amplitud del espectro de primera derivada, siendo esta distancia proporcional a la concentración de la sustancia en estudio

Ahora, si se obtiene la segunda derivada del espectro de orden cero (Figura No 1(a)) y se grafican los valores de dicha derivada, se encuentra que el nuevo espectro presentará dos valores máximos y un valor mínimo (Figura No 1(c)). El valor mínimo de este espectro de derivada, se presenta a la misma longitud de onda a la cual se presenta el valor máximo de la absorción del espectro de orden cero. Balestrieri (1978), Fell (1978), O'Haver (1979), O'Haver, (1977), Schmitt (1977)

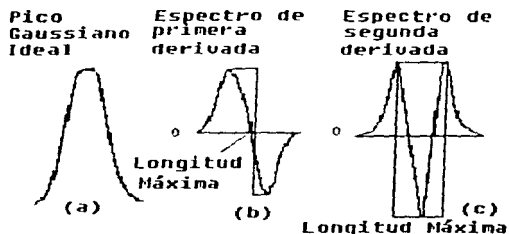


Figura No.1 (a) Pico Gaussiano ideal, (b) Espectro de primera derivada, (c) Espectro de segunda derivada.

La distancia vertical entre el valor mínimo y cualquiera de los valores máximos, siempre será proporcional a la concentración de la sustancia en estudio

En la Figura No 2, se observa que tanto en el espectro de primera derivada, como en el de segunda derivada, existen valores positivos y negativos de ordenadas. Estos valores de ordenadas, no son proporcionales a la absorción, sino a la pendiente de cada uno de los puntos del espectro de orden cero, siempre y cuando, el espectro de orden cero esté registrado en unidades de absorción

Otra de las características de la espectroscopia de derivadas, es la presentada por bandas de absorción muy amplias o por bandas de absorción constante ($dA \approx 0$), en este caso sus derivadas siempre serán cero, pero en el caso de las bandas de absorción muy amplias, es probable que presenten primera derivada no igual a cero, pero que su segunda derivada, se igual a cero. Balestrieri (1978), Fell (1978), O'Haver (1979), O'Haver (1977), Schmitt (1977)

Estas dos últimas propiedades de la espectroscopia de derivadas, son ampliamente usadas en la cuantificación de analitos, cuyo espectro de absorción se encuentra interferido por el espectro de absorción de otra sustancia este ejemplo se puede observar claramente en la Figura No 2.

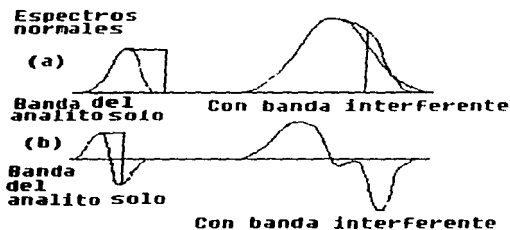


Figura No.2 Espectrometría de primera derivada para la evaluación cuantitativa de una banda pequeña (a) sola y (b) ocultada por una banda de traslape ancha.

En la resolución de espectros traslapados, es de gran importancia considerar los parámetros siguientes:

- Relación entre la altura de la banda que interfiere y la altura de la banda que se desea medir.
- Relación entre la anchura media de la banda que interfiere y la altura de la banda que se desea medir.
- Separación entre los máximos de absorción de los dos componentes en estudio.
- Velocidad de registro.

A continuación se mencionan algunas de las ventajas que se tienen con el empleo de la espectroscopia de derivadas:

- a) Medida exacta de λ_{max} . La primera derivada de un espectro determina la posición exacta de sus máximos de absorción, ya que el máximo en la derivada de un espectro se da en aquellas longitudes de onda en que el valor es igual a cero.
- b) Mejor resolución de los espectros - En este caso conviene más emplear la segunda derivada, ya que los máximos y mínimos del espectro convencional y de la segunda derivada aparecen prácticamente a las mismas longitudes de onda y la estructura fina se manifiesta mejor que en la primera derivada.
- c) Análisis de muestras turbias -En general, estas presentan un aumento continuo de absorbancia hacia longitudes de onda más cortas, no observándose variación espectral importante en la primera y segunda derivada, por lo que en el registro de los espectros en presencia de turbidez, se elimina el efecto de la absorción de fondo debida a ésta.
- d) Determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o más componentes -Esta es de gran utilidad cuando se presenta gran traslape entre los espectros de absorción de los componentes a determinar. En una espectroscopia convencional, estos picos solo pueden ser utilizados aceptando grandes errores sistemáticos. Por el contrario, la espectroscopia de derivadas permite su utilización con errores sistemáticos pequeños e incluso despreciables.

Con el objeto de resolver mezclas, se han empleado diversos métodos. En algunos se ha propuesto medir a una longitud de onda a la cual no contribuya el compuesto interferente, en otros el problema se resuelve planteando un conjunto de ecuaciones de cuya solución se obtengan las concentraciones deseadas.

Dentro de las técnicas empleadas en la resolución de mezclas se encuentran las siguientes:

Técnica de medida del cruce en cero

Método del cociente de los espectros

Método de regresión lineal a múltiples longitudes de onda

Análisis de multicomponentes

TÉCNICA DE MEDIDA DEL CRUCE EN CERO.

Utiliza el valor absoluto de la derivada del espectro del orden que se esté utilizando, a un valor de abscisa correspondiente a una longitud de onda a la que presente valor cero la derivada del espectro del componente puro, cuya interferencia se desee evitar. Las medidas realizadas a esa longitud de onda en el espectro mezcla podrán ser función solamente de la concentración del componente que se analiza. Esta técnica también permite determinaciones simultáneas en dichas mezclas. De León (1996), O'Haver (1979).

La exactitud conseguida en la resolución de una mezcla de componentes en la técnica de medida del cruce en cero, depende de los parámetros siguientes:

- a) Relación de la altura de la banda que interfiere y de la banda de interés analítico
- b) Lo mismo respecto a la anchura medida
- c) Separación entre los máximos de absorción de los componentes

MÉTODO DEL COCIENTE DE LOS ESPECTROS.

En la resolución de mezclas binarias cuyos espectros se encuentran solapados, la técnica del cociente de los espectros en sus dos variantes: derivada del cociente de los espectros y medición del área del cociente de los espectros, proporcionan una alternativa en la cuantificación de cada uno de los componentes en la mezcla

MÉTODO DE REGRESIÓN LINEAL A MÚLTIPLES LONGITUDES DE ONDA.

Para cada longitud de onda, la absorbancia de una mezcla de dos componentes se puede expresar por:

$$A_i = \epsilon_1 b C_1 + \epsilon_2 b C_2$$

donde ϵ_i y C_i son las absorptividades y concentraciones respectivas de los analitos

Las absorptividades se calculan a partir de los valores de la absorbancia de una solución patrón; así para cada componente

$$A_{pi} = \epsilon_i b C_{pi}$$

donde C_{pi} es la concentración patrón i y A_{pi} es la absorbancia de una solución patrón i

Operando con las ecuaciones anteriores, y si $C_{p1} = C_{p2} = 1$, se obtiene

$$\frac{A_1}{A_{p1}} = C_1 + \frac{A_{p2}}{A_{p1}} C_2$$

Representando $\frac{A_1}{A_{p1}}$ frente $\frac{A_{p2}}{A_{p1}}$, para cada longitud de onda, se obtiene una recta cuya ecuación se ajusta por mínimos cuadrados y en que las concentraciones de los dos analitos se deducen de los valores de la ordenada en el origen y de la pendiente

El coeficiente de correlación, r , de la recta y la desviación estándar, σ_a , son los parámetros que nos indicarán el grado de ajuste del espectro experimental frente al calculado

Este método sirve además como criterio de selección del intervalo de longitudes de onda más apropiado para la determinación, puesto que sólo se obtendrán líneas rectas para las longitudes de onda en las que se cumpla la aditividad de las absorbancias.

ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES.

En esta parte se hace referencia a la solución de espectros complejos correspondientes a mezclas de más de dos componentes.

La aditividad de la ley de Lambert - Beer a la mezcla de componentes distintos se puede expresar, para las distintas longitudes de onda, de la siguiente manera

$$A_1 = b_0 + C_1a_{11} + C_2a_{21} + \dots + C_ka_{k1} + e_1$$

$$A_2 = b_0 + C_1a_{12} + C_2a_{22} + \dots + C_ka_{k2} + e_2$$

$$A_n = b_0 + C_1a_{1n} + C_2a_{2n} + \dots + C_ka_{kn} + e_n$$

donde:

A_j , representa la absorbancia de la mezcla a las "n" diferentes longitudes de onda "j" (j = 1,2,3, ... n)

b_0 , es un término de corrección de la absorbancia

C_i , representa los valores de concentración de cada uno de los "k" componentes de la mezcla (i = 1,2,3, ... k)

a_{ij} , representa los valores de la absorptividad de los diferentes componentes "i" a las "j" longitudes de onda

e_j , es el error de ajuste, es decir, la diferencia entre la absorbancia experimental y calculada a cada longitud de onda "j"

Para que la solución de este sistema sea única es necesario que $n > k+1$

Una forma de resolver este sistema consiste en utilizar el método de mínimos cuadrados cuyo principio básico es minimizar la suma de los cuadrados de las diferencias entre valores arrojados por el modelo y los valores experimentales

4.2 EJEMPLOS DEL USO DE LA ESPECTROSCOPIA DE DERIVADAS.

Una descripción detallada de la interpretación de los espectros de derivadas y de su aplicación en el análisis cuantitativo, ha sido proporcionado por T. C. O' Haver. Para esto analizaremos el espectro de absorción de la guayanesina en solución acuosa

En el espectro de orden cero Figura No 3 (a), podemos observar que solo consta de un máximo de absorción, siendo éste el parámetro de mayor confiabilidad en el análisis de guaynesina. Si nosotros analizamos la primera derivada del espectro de absorción de la guaynesina Figura No 3 (b), veremos que existe un mayor número de parámetros utilizables en la cuantificación de dicha sustancia. Estos parámetros están constituidos por las distancias verticales entre máximos y mínimos (EF, EG Y FG). Siempre se debe procurar que la distancia medida, sea entre un máximo y un mínimo adyacentes. O' Haver (1977)

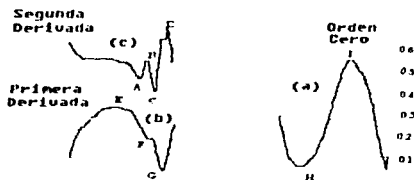


Figura No 3 Segunda derivada del espectro de absorción de la guayanesina en agua 50µg/ml, el número de parámetros útiles en la cuantificación de dicha substancia, se incrementa

Ahora bien, si se analiza la segunda derivada del espectro de absorción de la guayanesina, observaremos que el número de parámetros útiles en la cuantificación de dicha substancia, se incrementa, tal como puede observarse en la Figura No 3 (c)

Una vez seleccionado el parámetro más adecuado, lo único que tenemos que realizar para evaluar cuantitativamente una señal derivada, es comparar dicha señal con la señal derivada obtenida mediante un estándar, o extrapolarla en una curva patrón obtenida con señales derivadas procedentes de un estándar. Cuando se presenta el problema de espectros de absorción interferidos, la selección del parámetro que permita la cuantificación del analito en estudio, es bastante crítica lo primero que se debe realizar es el análisis de cada espectro de absorción por separado y localizar zonas en las cuales el analito en estudio no sea interferido

Uno de los ejemplos más recientes del empleo de los espectros de derivadas y su aplicación en el análisis cuantitativo, es el estudio realizado por De León Rodríguez. En este trabajo de investigación de colorantes azo, amarillos y rojos, que son ampliamente utilizados en alimentos como aditivos, más específicamente en bebidas refrescantes, jugos naturales, gelatinas y polvos para preparar bebidas, es importante resaltar que en el empleo de este tipo de sustancias se debe exigir un control riguroso, de modo que la presencia de estos aditivos no disfraza alguna propiedad no deseable de los alimentos, ya que estos se deben añadir a los alimentos con el fin de modificar sus características organolépticas o para mejorar su proceso de elaboración y/o conservación. Dentro de los colorantes estudiados tenemos al Amarillo-5, Amarillo-6, y Rojo-40, a los cuales se les aplicó la técnica de espectroscopia de derivadas para su determinación tanto individual como en mezcla en jugos y bebidas refrescantes. De León. (1996).

En lo que respecta a la aplicación del método desarrollado por espectrofotometría de derivadas en mezclas sintéticas, se observó, que se puede hacer la determinación de un colorante en presencia de otro en relaciones (C1/C2) (donde C = concentración), desde 0.14 a 7 siendo importante considerar que en los casos en los que el colorante determinado se presenta en bajas concentraciones respecto al otro, es en donde la precisión del método es más baja. El aplicar los métodos de análisis de factores a la derivada de los espectros, contribuye a la obtención de sistemas más simples. Además, se

observo que los parámetros estadísticos de calibración y predicción mejoran. El análisis por factores permitió "eliminar" interferencias de matriz y en conjunción con el empleo de espectros derivados ayuda notablemente a obtener métodos más precisos y sumamente sencillos, dado que la operación de derivación, disminuye notablemente interferencias por turbidez. De Leon (1996)

4.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DERIVADA DE LOS ESPECTROS.

Cuando se obtiene la derivada de un espectro normal o de orden cero, debe buscarse siempre la relación entre la fidelidad con que se calcula la derivada y la razón señal / ruido

La disminución de la relación señal/ruido puede conseguirse promediando el cálculo de la derivada sobre una zona de longitudes de onda que sea grande comparada con la estructura del ruido, esto es, empleando un $\Delta\lambda$ mayor para calcular la derivada. Sin embargo, al aumentar el intervalo de longitudes de onda, la derivada estará más distorsionada.

A continuación se tratarán los siguientes aspectos

DISTORSIÓN:

La derivada de una curva, calculada con un incremento de longitud de onda finito, se distorsiona debido a una disminución en la señal de la derivada y a una disminución en la resolución

Existe una medida cuantitativa de la disminución de la derivada de la señal que se obtiene definiendo el factor de distorsión, " $F_{\Delta\lambda}$ ", como la altura máxima medida del máximo al mínimo calculada con una longitud de onda finita ($\Delta\lambda$), dividida por la calculada exactamente ($d\lambda$)

$$F_{\Delta\lambda} = \frac{H_{n,\Delta\lambda}}{H_{n,d\lambda}}$$

Es importante señalar que la distorsión no afecta la linealidad de la derivada de la señal con la concentración, pues " λ " es un operador lineal.

RELACIÓN SEÑAL - RUIDO (S/N).

La relación (S/N) va disminuyendo al aumentar el orden de la derivada

El ruido de un espectro normal se puede expresar como la desviación estándar de la absorbancia blanco, σ_n . Para una derivada de orden "n", la desviación estándar, σ_n , se calcula a partir de σ_n empleando las reglas de propagación de errores

La relación (S/N) de la derivada de una señal depende de la forma del espectro, si la banda es gaussiana y se supone que (S/N) es uno en el espectro de orden cero, para la primera derivada sería $2.02 / M$, para la segunda derivada $3.26 / M^2$, para la tercera $8.10 / M^3$, para la cuarta $17.8 / M^4$, etc., donde M es el número de puntos del pico a mitad de altura.

Debido a esta disminución de (S/N), los métodos de derivación utilizados emplean técnicas de suavizado (filtrado) para controlar el incremento del ruido, el efecto de suavizado depende de dos variables

- a) La razón de suavizado, que es el cociente de la anchura del pico suavizado por el número "M" de puntos de anchura a mitad de altura.
- b) El número de veces que se efectúa el suavizado

SELECCIÓN DEL ORDEN DE LA DERIVADA.

La resolución y distinción de picos aumenta con el orden de la derivada, mientras que la relación (S/N) decrece. En cualquier caso, se estima que

La primera derivada es el orden óptimo sólo cuando el espectro de absorción es generalmente ruidoso

La segunda derivada proporciona mejor resolución, un intervalo característico más fácilmente identificable (un mínimo frente a una pendiente negativa) y una relación (S/N) satisfactoria

Cuando la estructura no es muy apreciable en el espectro de absorción, es necesario obtener la tercera o cuarta derivada para una buena resolución. De León. (1996)

4.4 CAFEÍNA.

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS.

Nombre Genérico: Cafeína

Nombres Químicos:

- a) 2,6-dioxo,3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1 H Purina
- b) 1,3,7-Trimetilxantina
- c) Metilteobromina.
- d) 1,3,7-Trimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropurina.
- e) 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1(H) 2,6 -purindiona.
- f) 1,3,7-Trimetil-4,6-dioxopurina.
- g) 7-metilteofilina.

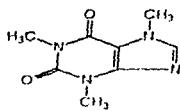
Nombres triviales: Cafeína anhidra, Coffeinum, Guavanina, Theina, Guanine, Metilteobromina.

Fórmulas:

Empírica:

$C_8H_{10}N_4O_2$

Estructural:



Cafeína

Figura No 4 Fórmula estructural de la cafeína

Composición Elemental

C, 49.48% ; H, 5.19% ; N, 28.85% ; O, 16.48%

Peso Molecular

Cafeína Anhidra $C_8H_{10}N_4O_2$: 194.19

Cafeína Monohidratada $C_8H_{10}N_4O_2 \cdot H_2O$: 212.21

Punto de Fusión 238.0 °C, determinado después de secado a 80.0 °C por 4 horas.

Empieza a sublimar hacia los 100°C, sublimando plenamente a los 180°C sin descomposición

pKa = 1. Kb a 19.0 °C 0.7×10^{-14} , a 25.0 °C menor de 1.0×10^{-14}

Absorción ultravioleta

En etanol: 273 nm $E_{1\%}^{1cm} = 519$

En ácido clorhídrico 0.1 N: 277 nm $E_{1\%}^{1cm} = 479$

Incompatibilidades

Con los yoduros, sales de plata, taninos y con soluciones fuertes de ácidos cáusticos.

No forma sales estables, sus sales de ácidos fuertes se hidrolizan con facilidad en el agua

Solubilidad

En agua : 1g en 46.0 ml

En agua a 80.0 °C : 1g en 5.5 ml

En H₂O en ebullición : 1g en 1.5 ml

En cloroformo : 1g en 5.5 ml

En acetona: 1g en 50 ml.

En acetato de etilo: soluble

En éter de petróleo: ligeramente soluble

En ácidos diluidos: soluble

En pirrol y tetrahidrofurano con 4% de agua: libremente soluble

La solubilidad de la cafeína se reduce al adicionar sacarosa

Co-Solventes: benzoatos alcalinos, cinnamatos o salicilatos

Datos para extracción: La cafeína es una base débil se extrae de soluciones acuosas con disolventes orgánicos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1994), Florey (1986), Luna (1994), The Merck Index (1989), The Pharmaceutical Codex (1979), The Pharmacopeia of the United States of America (1994)

Descripción:

Se presenta en forma anhidra o hidratada. Corresponde a polvo blanco, como agujas sedosas blancas, carece de olor y tiene sabor débilmente amargo. Cristaliza con una molécula de agua, formando un hidrato que efloresce al aire. British Pharmacopoeia (1993), Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1994), Florey (1986), The Pharmacopeia of the United States of America (1994)

La cafeína forma en parte un complejo π - molecular hidrófobo con el ácido clorogénico en la proporción molar 1:1. En el café para beber se encuentra aproximadamente al 1% de cafeína y 6% del ácido clorogénico Braverman (1984)

Densidad $d_{414} = 1.23$.

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS:

Tiempo de Vida media: en el plasma es de 4.9 horas

Volumen de distribución: es de 0.61 L/Kg

Depuración: en el plasma es de 1.4 ml/min /Kg

Unión a proteínas: en el plasma es de 35%

Se absorben bien por el aparato digestivo y constituyen el principio activo de diversas infusiones de plantas universalmente difundidas entre las que se cuentan el café, el té, el mate, la cola, el cacao, etc. García (1978), The Pharmaceutical Codex (1979).

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Dentro de los métodos de análisis que existen para la identificación de cafeína se encuentran los siguientes:

Titulación con ácido perclórico

Colorimétrico por formación de complejos coloridos.

Absorción al ultravioleta

Infrarrojo

Resonancia Magnética Nuclear

Espectrometría de Masas

Polarográfico

Cromatografía en papel.

Cromatografía en capa fina

Cromatografía de gases

Cromatografía de líquidos de alta resolución

Recientemente, el estudio del contenido de cafeína en los diferentes tipos de cafés, ha impulsado el desarrollo de numerosos métodos analíticos, en los cuales se usa principalmente la espectrofotometría ultravioleta con o sin aplicaciones de derivadas y los cromatográficos, tanto de gases como Cromatografía de líquidos de alta resolución. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1994), Florey (1986), Hart (1991), Higuchi (1961), Haupt (1977), Martindale The extra Pharmacopoeia (1989), O'Haver (1979), O'Haver (1977), Oi-Wah Lau y col (1992)

4.5 EL CAFÉ

Actualmente el café se conoce como una preparación, consistente en una infusión de semillas de café maduras y secas desprovistas de cutícula y después tostadas. Inmecafe-Compañía Nestlé (1990), Luna (1994)

La caficultura en México tuvo su inicio en Córdoba, Veracruz, esta fue la primera zona donde se cultivo el café procedente de Cuba a fines del siglo XVIII. Sin embargo, este cultivo no se propagó debido a la guerra de independencia y no fue hasta el año de 1817 cuando Don Juan Antonio Gomez importó plantas nuevas de Cuba, habiendose propagado por todo el Norte de Oaxaca, Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí. Belitz (1988), Luna (1994), Norman (1990)

En México el café constituye una de las principales fuentes de divisas y ocupa el tercer lugar dentro de la actividad económica nacional. A nivel mundial, nuestro país tiene el cuarto sitio como nación, después de Brasil, Colombia e Indonesia. Paradojicamente, solo llegamos a consumir alrededor de 2 Kg de café por persona al año, cifra que desconcierta toda vez que se trata de una cantidad entre 6 y 8 veces menor al consumo que realizan los habitantes de países desarrollados en Europa, de los Estados Unidos e incluso de países latinoamericanos como Colombia. Inmecafe-Compañía Nestlé (1990), Meyer & Ruiz (1977), Shmidt (1992)

El comportamiento en la producción mundial de café depende de varios factores, entre los que destacan el agrícola, climatológico, económico, mientras que los que condicionan el consumo mundial del café son

Económico:

Debido a que no es un bien necesario, cuando los precios de éste se disparan al alza desproporcionadamente, sus niveles de consumo se ven drásticamente reducidos. El efecto de los precios de bebidas competitivas (elasticidad cruzada de la demanda) es un elemento adicional que puede influir sobre el consumo de café

Asimismo, el bajo grado de desarrollo tecnológico que impera en la mayoría de los países productores, los ha condicionado a exportar el café que producen solo con un grado de procesamiento primario (el beneficiado) y los países consumidores desarrollados se han

casi reservado el derecho de desarrollar las fases propiamente industriales como son la torrefacción, la molienda, la solubilización, la liofilización y el envasado

Psicológico:

Se relaciona con los prejuicios mas o menos generalizados que existen hacia los efectos nocivos para la salud y frente al nulo valor nutritivo de esta bebida. Otro tipo de factor sobre el consumo mundial del café, es la competencia de otras bebidas como son los refrescos que cuentan con respaldos publicitarios bastante elevados, por lo que la tendencia a consumir bebidas frías debido a su disponibilidad inmediata en el mercado, es muy amplia

Debido a la gran diversidad de calidades de café que circulan en el mercado, a la peculiaridad ecológica de cada región y al tipo de beneficiado que se aplica, la Organización Internacional del Café (OIC) se vio en la necesidad de agrupar por tipos todas las calidades de este grano y por, consiguiente, sus respectivas cotizaciones a efecto de facilitar la implementación de un ajuste selectivo de las cuotas y de simplificar el manejo del complicado sistema de precios de este producto. El sistema de precios indicativos ha quedado estructurado en cuatro grupos. Otros Suaves, Robustas, Suaves Colombianos y No Lavados. Schmidt (1992)

ADULTERACIÓN

Se considera como adulteración, la utilización de materias extrañas, que al mezclarse con el café tostado y el café mezclado tostado con azúcar, modifiquen o reduzcan sus propiedades, incluyéndose el azúcar refinado, el blanco directo (estándar blanco), el mascabado y el piloncillo, si se emplean en porcentos mayores a los permitidos y si contienen edulcorantes no permitidos por la Secretaría de Salubridad y Asistencia Internacional Standar Coffe (1983), Internacional Standar Coffe (1992), Multon (1988), Nom- -F-176 (1968), Nom-f-13-s (1980), Nom-f-173-s (1982) Person (1988).

TABLA No. 1 CONTENIDO DE CAFFÉINA EN BEBIDAS	
Bebida	Contenido de Cafetina
Café	100 - 150 mg/taza
Café Instantáneo	50 - 90 mg/taza
Café Descafeinado	2 - 10 mg/taza
Café Percolado	80 mg en un rango de 40 - 170
Café por el método de Goteo	115 mg en un rango de 60 - 180
Té	50 - 150 mg/taza
Bebida de Cola	35 - 55 mg/350 ml
Cacao	230 - 280 mg Teobromina/taza
Analgésicos Corrientes	30 - 60 mg/dosis
Estimulantes Corrientes	100 mg/dosis

REQUISITOS LEGALES PARA DIVERSOS PRODUCTOS DE CAFÉ:

El contenido de cafeína en el producto estará en relación al porcentaje de café 100% puro usado en la mezcla

Estos valores deben expresarse siempre en base seca

TABLA No. 2 ESPECIFICACIONES QUE DEBEN CUMPLIR EL PRODUCTO CAFÉ 100% PURO TOSTADO EN GRANO O MOLIDO	
ESPECIFICACIONES	CAFÉ 100% PURO TOSTADO EN GRANO O MOLIDO
Cafeína, % mínimo	0.8
Humedad, % máxima	6.0
Cenizas, % máxima	5.0
Reductores totales en la infusión, % máximo	1.0
Extracto etéreo, %	10.5 a 16.5
Prueba del almidón	Negativa

CLASIFICACIÓN DEL CAFÉ TOSTADO Y CAFÉ MEZCLADO TOSTADO CON AZÚCAR:

Producto elaborado a partir de café 100% puro tostado en grano o molido, adicionado o incorporando durante el proceso del tostado, de hasta un 10% de azúcar en el caso del café tostado y de un 11% hasta un 30% como máximo para el café mezclado tostado con azúcar, pudiendo emplear los siguientes azúcares, caramelizados, solos o combinados: azúcar refinado, azúcar blanco directo (estandar blanco), azúcar mascabado y piloncillo u otros edulcorantes previamente autorizados por la Secretaría de Salubridad y Asistencia. Se prohíbe el empleo de mieles incristalizables.

El café tostado y el café mezclado tostado con azúcar se clasifica en dos tipos cada uno, con un sólo grado de calidad, designándose como

Café tostado tipo A:

Café 100% puro tostado en grano o molido, "altura" "prima lavado" y "buen lavado", conteniendo hasta un 10% de los azúcares caramelizados

Café tostado tipo B:

Café 100% puro tostado en grano o molido, "desmanches" y "no lavados" o "naturales", conteniendo hasta un 10% de los azúcares caramelizados

Café mezclado tostado con azúcar tipo A:

Café 100% puro tostado en grano o molido "altura" "prima lavado" y "buen lavado" conteniendo desde 11 hasta 30% de los azúcares caramelizados

Café mezclado tostado con azúcar tipo B:

Café 100% puro tostado en grano o molido, "desmanches" y "no lavados" o "naturales" conteniendo de 11 hasta 30% de los azúcares caramelizados. Internacional Standar Coffe (1983), Internacional Standar Coffe (1992), Multon (1988), Nom-F-176 (1968), Nom-F-13-s (1980), Nom-F-173-s (1982) Person (1988).

TABLA No 3 ESPECIFICACIONES QUE DEBEN CUMPLIR EL PRODUCTO CAFÉ TOSTADO Y CAFÉ MEZCLADO TOSTADO CON AZÚCAR		
ESPECIFICACIONES	CAFÉ TOSTADO (HASTA 10% AZÚCAR)	CAFÉ MEZCLADO CON AZÚCAR (HASTA 10% AZÚCAR)
Cafeína % mínimo	0.72	0-56
Cafeína % máximo	8.0	8.0
Cenizas % máximo	5.0	5.0
Reductores totales %	11.0	10.0
Extracto etéreo, %	9.5 - 15	7.5 - 12
Prueba de almidón	Negativa	Negativa

En todos los "extractos" el rendimiento de sólidos de café secos del café crudo no deben exceder de 41.74% en peso William (1984)

TABLA NO. 4 ESPECIFICACIONES QUE DEBEN CUMPLIR LOS PRODUCTOS DE CAFÉ INSTANTÁNEO	
ESPECIFICACIONES	CONTENIDOS
Humedad	Menor del 5%
Cenizas	7 - 14%
Alcalinidad de las cenizas solubles	8- 14 ml de ácido 0.1N/g
Cafeína	2 - 8%
Azúcares totales (como azúcares reductores)	12 - 32%
Arsénico, cobre y plomo	Deben contener no menos del 96% de los sólidos solubles en agua, en base seca, de café

El café descafeinado o las mezclas de café no deben contener más de 0.1% de su café en base seca como cafeína anhidra, mientras los extractos descafeinados no deben contener más del 0.3% del café en base seca como cafeína anhidra. Person (1988), William (1984).

5. CUADRO METODOLOGICO

AGRUPACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PRODUCTOS



Grupo 1: Café Soluble 100% puro, producto A,B,C

Grupo 2: Café Soluble con 30% de azúcar, producto D.

Grupo 3: Café Soluble descafeinado, producto E,F,G,H.

Grupo 4: Café de Grano, producto I,J



MÉTODOS ANALIZADOS.



- 1.- Método Segunda Derivada a 299 nm. (2D299 nm)
- 2.- Método Segunda Dervada a 290 nm. (2D290 nm)
- 3.- Método Sin Derivar con hidróxido de sodio a 299 nm. (SDCNaOH 299)
- 4.- Método Sin Derivar con hidróxido de sodio a 290 nm. (SDCNaOH 290 nm)
- 5.- Método A.O.A.C. Official Methods of analysis / Of the association of official analytical chemists (A O A C)
- 6.- Método Kjeldahl (KJELDAHAL)



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.



CONCLUSIONES.

6. PARTE EXPERIMENTAL:

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se tomo como referencia principal los métodos analíticos reportados por Oi - Wah y colaboradores Oi-Wah Lau y col (1992)

ESPECTROFOTOMETRÍA MÉTODO SEGUNDA DERIVADA

Se utilizó un Espectrofotometro UV-V Modelo DU-65, Marca Beckman con celdas de cuarzo de 1cm de longitud de paso óptico.

Se realizó un barrido en la región UV de 200-400 nm para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia de la cafeína, caramelo, ácido tánico, así como una mezcla de los tres componentes antes mencionados, cabe señalar que se analizó la presencia y ausencia de la solución de NaOH en cada uno de ellos.

Por otro lado tomando como base 10 nm se realizaron para el cálculo de la segunda derivada, una serie de barridos de 270 a 340 nm, para cada una de los componentes arriba mencionados con y sin NaOH.

CÁLCULO PARA DETERMINAR LA SEGUNDA DERIVADA:

$$\text{Primera derivada} = \frac{dA}{d\lambda}$$

$$\frac{A_2 - A_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \text{ En donde}$$

A_1 = Absorbancia obtenida de la longitud de onda primaria.

A_2 = Absorbancia obtenida de la longitud de onda secundaria.

λ_1 = Longitud de onda primaria

λ_2 = Longitud de onda secundaria

$$\text{Segunda derivada} = \frac{d^2A}{d^2\lambda}$$

$$\frac{dA_2 - dA_1}{d\lambda_2 - d\lambda_1} \text{ En donde :}$$

dA_2 = Valor de la primera derivación para ($A_2 - A_1$)

$d\lambda_2$ = Valor de la primera derivación para ($\lambda_2 - \lambda_1$)

Para conocer la concentración de cafeína en la muestra fue necesario elaborar para cada producto una curva de adición patrón en orden, en presencia de hidróxido de sodio en un intervalo de concentración entre 45 - 100µg/ml cada una de las curvas sigue el siguiente comportamiento.

$P = K C_{\text{Total}}$ donde

P = Magnitud de la segunda derivada

C_{Total} = Es la concentración total, en (mg) en este caso esta dada por la concentración del problema más la concentración del estándar ($C_{problema} + C_{estándar}$)

K = Es la constante de proporcionalidad, que en este caso es la pendiente

Se determinó la concentración del problema a la longitud de onda de 299 y 290 nm respectivamente ya que esta ecuación sigue un comportamiento en el cual se utiliza la siguiente ecuación de regresión

$y = A + BX$ donde

A = Ordenada, Absorbancia del problema

B = Pendiente

Adicionalmente, se corrieron Barridos para el cálculo de la segunda derivada de

Cafeína estándar sin NaOH

Cafeína estándar con NaOH

Caramelo sin NaOH

Caramelo con NaOH

Ácido Tánico sin NaOH

Ácido Tánico con NaOH

Mezcla de Caramelo, Ácido Tánico y Cafeína, sin NaOH

Mezcla de Caramelo, Ácido Tánico y Cafeína Estándar con NaOH

MUESTRA.

PARA CAFÉS 100% SOLUBLE, CON 30% DE AZÚCAR Y SOLUBLE DESCafeINADO

Se pesaron 70 mg de café, los cuales se diluyeron con agua destilada a 50 ml, una alícuota de 1 ml de esta solución se colocó en un matraz aforado de 10 ml, al cual se le añadió 0.5 ml de hidróxido de sodio 0.05 M, y se aforó con agua destilada

PARA CAFÉ DE GRANO.

En el caso de Café de grano 5000 mg se calentaron con 150 ml de agua destilada y se percolaron hasta la obtención de 120 ml, de esta solución se colocó una alícuota de 20 ml en un matraz volumétrico de 50 ml llevando al aforo con agua destilada, de esta solución se colocó una alícuota de 1 ml en un matraz volumétrico de 10 ml y se añadió 0.5 ml de hidróxido de sodio 0.05 M, los cuales fueron llevados al aforo con agua destilada.

CURVA DE ADICIÓN PATRÓN.

PARA CAFÉS 100% SOLUBLE, SOLUBLE CON 30% DE AZÚCAR Y SOLUBLE DESCafeINADO

Para la elaboración de las curvas de adición patrón se utilizaron las condiciones descritas anteriormente tanto para cafés solubles como para cafés de grano con la única variante de que además de agregar la solución de hidróxido de sodio se colocaron los siguientes

volúmenes 0,5, 0,7, 0,9, 1,0, y 2,0 ml de cafeína estándar de 500µg/ml, y se afioró a 100 ml con agua destilada tanto para las muestras como para los porcentajes de recuperación en los cuales se utilizó 5 mg de cafeína. En el diagrama 1 se resume el método

MÉTODO SIN DERIVAR

El desarrollo de este método surgió gracias a los resultados proporcionados por el método de segunda derivada debido a que en estas condiciones de análisis muestran que la longitud de máxima absorción para la cafeína es a 290 nm. En este caso se consideró determinar la concentración del problema sin necesidad de realizar el cálculo de la segunda derivada, pero sin dejar a un lado los beneficios de la solución de hidróxido de sodio además, se realizaron extracciones con el fin de corregir las interferencias presentadas por la muestra. La longitud de onda a la cual se realizó el análisis fue de 290 y 299 nm. En el Apéndice No 3 se explica con detalle el procedimiento del método SIN DERIVAR. En el diagrama 2, se resume este método.

MÉTODO A.O.A.C.

En el Apéndice No 3 se explica con detalle el procedimiento del método A.O.A.C. La longitud de onda a la cual se realizó el análisis fue de 276 nm. En el diagrama 3 se resume el método.

MÉTODO MICRO KJELDAHL

En el Apéndice No 3 se explica con detalle el procedimiento del método KJELDAHL. Ayres (1970), Person (1988), Plaza (1994). En el diagrama 4 se resume el método.

6.4 DIAGRAMA 1

SEGUNDA DERIVADA (2D)

Muestra de café en solución



Alicuota de 1ml

+

0.5 ml de NaOH

+

En una serie de matraces aforados colocar los siguientes volúmenes de estándar de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0.5, 0.7, 1.0, 2.0 ml



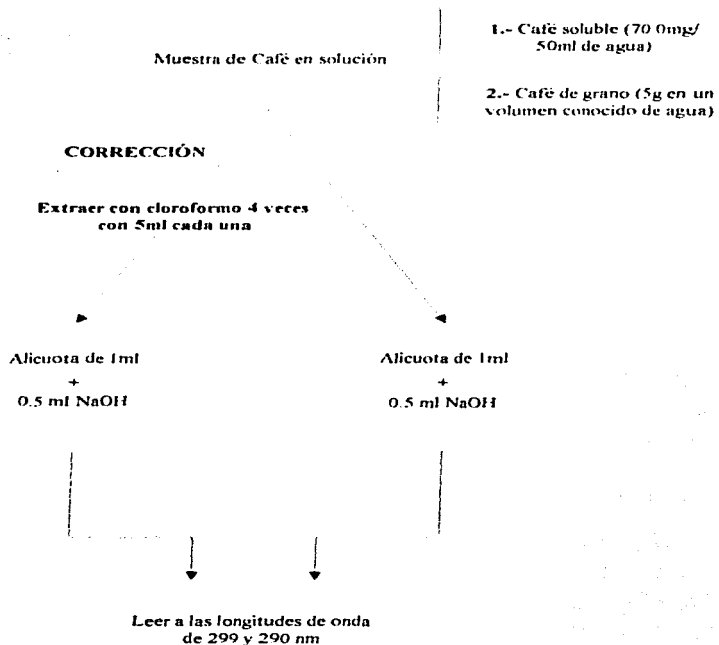
Barrido de 270 - 340nm

1.- Café soluble (70 Omg/ml de agua)

2.- Café de grano (5g/ en un volumen conocido de agua)

6.2 DIAGRAMA 2

SIN DERIVAR (SD)



6.3 DIAGRAMA 3

A.O.A.C.

Muestra de café en solución

Muestra 10 ml

+
KMnO₄ 5 ml 5 minutos

+
Solución Reductora 10 ml
(Na₂SO₃ + KSCN)

+
H₂PO₄ 1 ml

+
NaOH 1 ml

↓
1.- Extracción con 50 ml de cloroformo

Filtrar y lavar 2 veces c/u con
2 ml de cloroformo

2.- Extracción con 40 ml de cloroformo

Filtrar y lavar 2 veces c/u con
2 ml de cloroformo

↓
Completar el volumen a 100
ml y leer a 276 nm

1 - Café soluble (0 25 g)

2 - Café de grano (5 0 g)

6.4 DIAGRAMA 4

KJELDAHL

Muestra de café 0.1 g

CUSO₄ 0.2 g
+
NaSO₄ 1.0 g
+
H₂SO₄ 2.0 ml

DIGESTIÓN

- 1.- Tiempo aproximado 2 horas
- 2.- Calentar antes del punto de ebullición, hasta que cese la formación de espuma.
- 3.- Aumentar la temperatura a ebullición, y suspender hasta que la solución adquiera una coloración verde clara o incolora.
- 4.- Transferir la solución digerida a un aparato de destilación.

DESTILAR

Con 20 ml de NaOH 40%

Burbujear el gas obtenido en 50 ml de H₂BO₃ 40% con indicador

VALORAR

Con HCl 0.1N

Punto final, vire de la solución indicadora

7. RESULTADOS

Debido a que muchos aditivos en alimentos naturales están en mezcla como ingredientes que interfieren con la determinación UV de cafeína en café, Oi-Wah y colaboradores reportan una serie de estos, los cuales se presentan, en la Tabla No 5. Oi-Wah Lau y col (1992).

TABLA No. 5 ADITIVOS QUE INTERFIEREN EN LA DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA		
INGREDIENTES	Concentración dada en %	Relacion de masa (Ingrediente / Cafeína)
Acido acético	1.05	760
Acido ascórbico	15.6*	1.30
Aspartame	0.1	72.5
Acido benzoico	12.0*	0.87
Caramelo	185.0*	11.4
Acido cítrico	0.5	36.2
Etanol	32.4	23.500
Acido gálico	17.8*	2.74
Glucosa monohidratada	2.1	1520
Acido glutámico	0.19	138
Lactosa	0.83	601
Leucina	600.0*	43.5
Metronina	0.28	203
Naranja G	7.6*	0.55
Fenilalanina	0.27	196
Acido fosfórico (85% a)	1.69	1220
Serina	0.24	167
Sacarina soluble	7.9*	0.57
Sulfato de sodio	0.72	522
Sorbato ácido de potasio	0.5*	0.64
Susent Yellow FCF	6.5	4710
Sacarosa	2.9*	0.21
Acido tánico	41.4*	3.00
Acido tartárico	0.51	370
Tartrazina	6.5*	0.47
Taurina	0.36	261
Vitamina B1	3.1*	0.22
Vitamina B2	1.0*	0.07

* Concentración µg/ml

En la Figuras No 5, 6, y 7 se muestra la variación de la longitud de onda con respecto a la absorbancia, así como la longitud de máxima absorción que presenta la cafeína, el ácido tánico y el caramelo en presencia y ausencia de NaOH, en cada uno de los componentes la presencia de NaOH permite disminuir las interferencias presentadas en solución. Cabe destacar que la absorbancia de ácido tánico y cafeína a la misma longitud de onda, sigue provocando interferencia. Es importante resaltar que a pesar que el caramelo presenta una máxima absorbancia a 284.3 cuando se encuentra solo, en presencia de cafeína y ácido tánico no es posible distinguir su presencia.

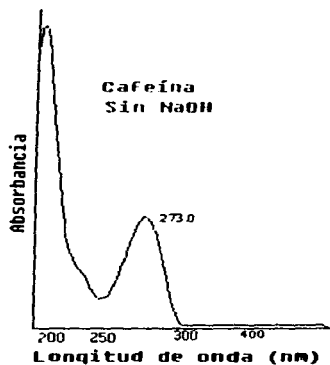
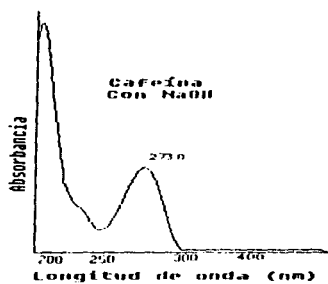


Figura No.5 Espectros de absorción de Cafeína en presencia y ausencia de NaOH

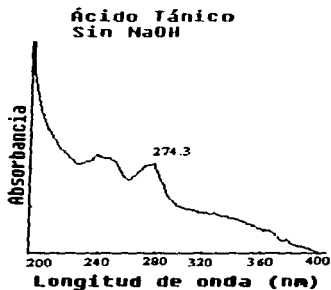
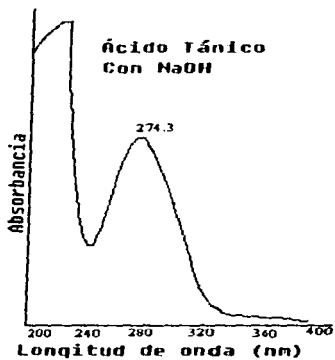


Figura No.6 Espectros de absorción de Ácido tánico en presencia y ausencia de NaOH

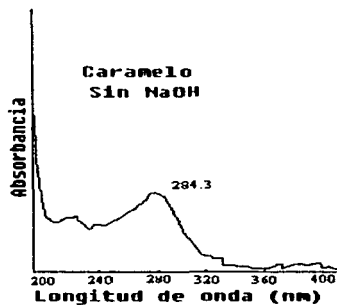
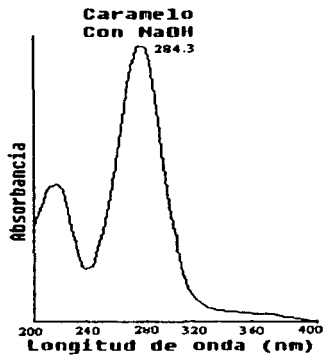


Figura No.7 Espectros de absorción de Caramelo en presencia y ausencia de NaOH

Una vez que se visualizo el efecto de la presencia de la solución de NaOH, en los componentes anteriores, se decide observar dicho efecto, pero para la mezcla de los tres componentes en solución, en la Figura No. 8 se muestra la variación de la longitud de onda con respecto a la absorbancia para la mezcla de los tres estándares

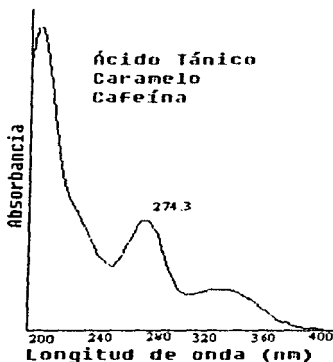


Figura No.8 Espectros de absorción de absorción de la mezcla de Cafeína, Ácido tánico y Caramelo en presencia de NaOH.

7.1 MÉTODO DE LA SEGUNDA DERIVADA

Experimentos preliminares muestran que la magnitud de la segunda derivada a 299 nm es afectada por la presencia de ácido tánico, pero no por la de caramelo. Las condiciones de análisis pueden descomponer el ácido tánico y siendo que la concentración de ácido tánico-cafeína existente en las soluciones de café es de 3:1, una concentración de NaOH 0.05 M es suficiente para disminuir el efecto del ácido tánico que se presentan en este tipo de bebidas de café. Oi-Wah Lau y col (1992)

Para conocer el efecto de la solución de hidróxido en presencia de cafeína estándar se realizo un análisis con esta en ausencia y en presencia de hidróxido de sodio, en un intervalo de concentraciones de 50-250 µg/ml para la cafeína estándar en ausencia de hidróxido de sodio y en un intervalo de 30 µg/ml-200 0 µg/ml para la cafeína en presencia de hidróxido de sodio, esto se puede observar en las Figura No 9 y 10

FIGURA No 9 ESPECTROS DE SEGUNDA DERIVADA PARA CAFEÍNA EN AUSENCIA DE NaOH

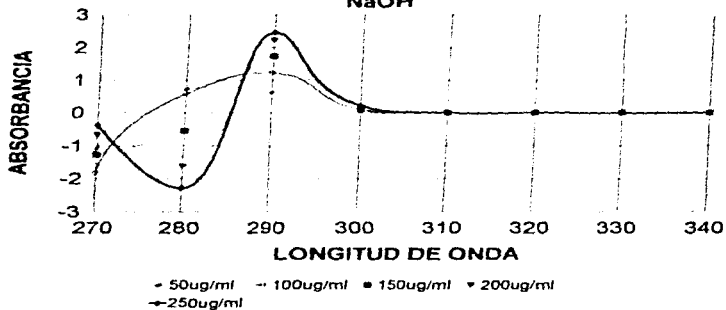
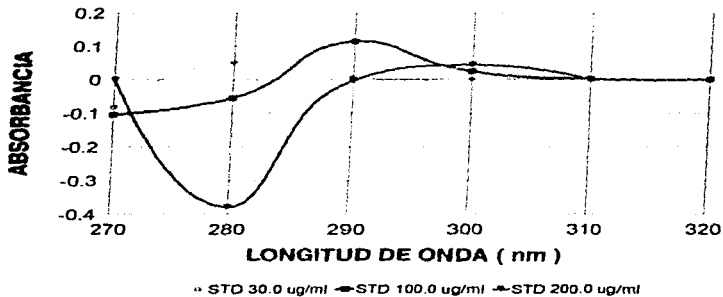


Figura No 10 ESPECTROS DE SEGUNDA DERIVADA PARA CAFEÍNA EN PRESENCIA DE NaOH



Como se puede observar en la Figura No 9 la cafeína presentó un comportamiento lineal entre 280-290 nm, en la Figura No 10 en un intervalo de 30 0 - 100 0 $\mu\text{g/ml}$ se observa un comportamiento lineal entre 280 - 290 nm

A partir del comportamiento observado en la Figura No 9 se determino cuales deberian ser las concentraciones a las que se elaborarian las curvas de adición patrón de cada producto analizado, como se menciono anteriormente , estas concentraciones se encuentran en un rango de 45 0-100 0 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, debido a las fluctuaciones que se presentan en cada uno de los productos se hizo necesario conocer la interferencia que provocan en la determinación de cafeína el acido tánico y el caramelo por lo que fue necesario, observar el comportamiento de estos componentes en presencia y en ausencia de hidróxido de sodio, este se muestra claramente en las Figuras No 11 y 12

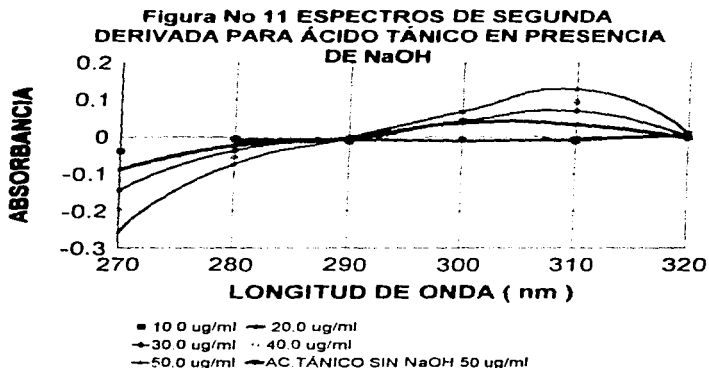
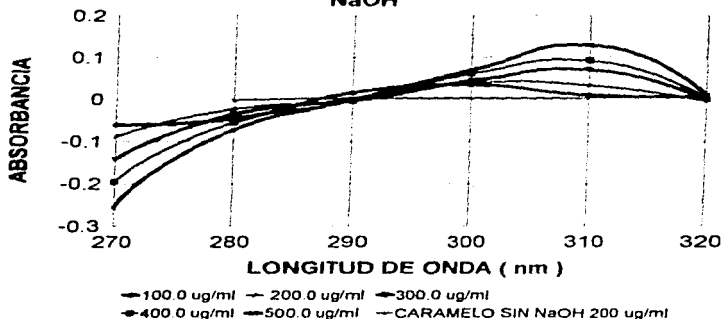


Figura No 12 ESPECTROS DE SEGUNDA DERIVADA PARA CARAMELO EN PRESENCIA DE NaOH

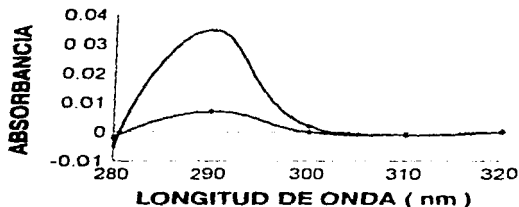


En la Figura No 11 el ácido tánico en presencia de hidróxido de sodio cruza en cero a 290 nm en un intervalo de concentraciones de 10.0 $\mu\text{g/ml}$ -50.0 $\mu\text{g/ml}$. En la Figura No 12 el caramelo cruza en cero a 290 nm en un intervalo de concentración de 200.0 $\mu\text{g/ml}$ -500.0 $\mu\text{g/ml}$. Como se puede observar, a una concentración de 100.0 $\mu\text{g/ml}$ el caramelo si es detectable.

Para corroborar el efecto que provocan componentes como el ácido tánico, caramelo y cafeína en solución, fue necesario tenerlos a los tres presentes al mismo tiempo, este comportamiento se puede observar en la Figura No 13; en ésta se muestra que a una concentración por arriba de 150.0 $\mu\text{g/ml}$ la absorbancia presentada es significativamente menor a la que se presenta a una concentración de 30.0 $\mu\text{g/ml}$, lo cual establece que a una concentración menor de 200.0 $\mu\text{g/ml}$ el comportamiento de la segunda derivada si es lineal a una longitud de onda de 290 nm.

Es relevante tomar en cuenta que en la combinación de cafeína, caramelo y ácido tánico, la interferencia que provoca una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de caramelo es significativa en el intervalo de concentración manejado para la cafeína, aunque es importante destacar que tal interferencia no significa que se afecte el comportamiento lineal de esta a una longitud de onda de 290 nm.

Figura No 13 ESPECTRO DE SEGUNDA DERIVADA PARA LA COMBINACIÓN CAFEÍNA CARAMELO Y ÁCIDO TÁNICO EN PRESENCIA DE NaOH



— STD 30.0 ug/ml, + Ac. Tánico 50.0 ug/ml, + Caramelo 200.0 ug/ml
— STD 150.0 ug/ml, + Ac. Tánico 50.0 ug/ml, + Caramelo 200.0 ug/ml

El comportamiento del ácido tánico y de caramelo que se observa en estas Figuras No 11-13 nos permite corroborar que con la solución de hidróxido de sodio si se minimiza la interferencia provocada por la presencia de ácido tánico, sin embargo, aunque también se puede observar dicho efecto para el caso de caramelo, es necesario destacar que a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ si es detectable su presencia, aunque en otros estudios se indica que la presencia de caramelo no afecta la determinación Oi-Wah Lau y col. (1992)

La magnitud de la segunda derivada a 290 nm para ácido tánico y caramelo es mínima y máxima para cafeína. Es importante destacar que la longitud de máxima absorción que presentaron los productos analizados fue de 290 nm, y cabe señalar que, aunque los productos no presentan una máxima absorción a una longitud de onda de 299 nm ya que la interferencia de ambos componentes sigue presente, se consideró relevante comparar la diferencia que presentan ambos métodos.

7.1.1 MÉTODO SEGUNDA DERIVADA A 299 nm.

En la Tabla No 6 se presentan los parámetros de regresión promedio de las tres determinaciones efectuadas en cada café analizado. Los resultados obtenidos muestran que para cada una de las curvas realizadas presentan un coeficiente de correlación por grupo mínimo de 0.9917, el cual corresponde al grupo 1 y máximo de 0.9960 para el grupo 2, así como un coeficiente de determinación mínimo de 0.9920 para el grupo 2 y máximo de 0.9865 para el grupo 3; como se puede observar, generalmente a esas concentraciones se trabaja dentro del rango donde se encuentra la linealidad.

TABLA No 6
PARÁMETROS DE REGRESIÓN DEL
MÉTODO SEGUNDA DERIVADA 299nm

GRUPO	PRODUCTO	2D299nm		B	M
		r	r ²		
1	A	0.9991	0.9983	0.067	0.002
1	B	0.9804	0.9613	-0.018	0.002
1	C	0.9956	0.9912	0.044	0.002
2	D	0.9960	0.9920	0.079	0.002
3	E	0.9887	0.9776	0.052	0.002
3	F	0.9993	0.9987	-0.005	0.001
3	G	0.9965	0.9920	0.039	0.002
3	H	0.9883	0.9767	0.025	0.002
4	I	0.9882	0.9766	0.020	0.002
4	J	0.9966	0.9932	0.005	0.002
Producto Soluble 100% puro A,B,C					
Producto Soluble con 30% de azúcar D					
Producto Soluble descafeinado E,F,G,H					
Producto de Grano I,J					

TABLA No 7
PARÁMETROS DE REGRESIÓN DEL
MÉTODO SEGUNDA DERIVADA 290nm

GRUPO	PRODUCTO	2D290nm		B	M
		r	r ²		
1	A	0.9999	0.9998	0.128	0.012
1	B	1.0000	0.9999	0.097	0.012
1	C	0.9999	0.9998	0.090	0.013
2	D	0.9934	0.9868	0.117	0.011
3	E	0.9996	0.9991	0.060	0.012
3	F	0.9989	0.9978	0.025	0.012
3	G	0.9990	0.9981	0.066	0.012
3	H	0.9886	0.9773	0.043	0.012
4	I	0.9992	0.9983	0.055	0.012
4	J	0.9998	0.9997	0.066	0.013
Producto Soluble 100% puro A,B,C					
Producto Soluble con 30% de azúcar D					
Producto Soluble descafeinado E,F,G,H					
Producto de Grano I,J					

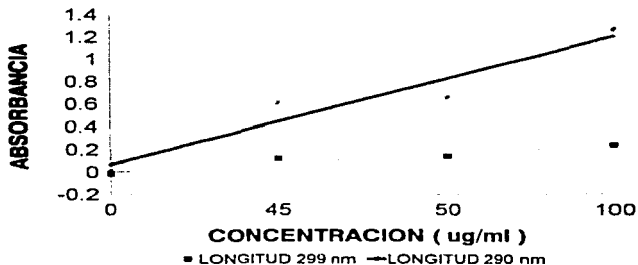
7.1.2 MÉTODO SEGUNDA DERIVADA A 290 nm.

En la Tabla No 7 se presentan los parámetros de regresión promedio de las tres determinaciones efectuadas en cada café analizado, los resultados obtenidos muestran que para cada una de las curvas realizadas presentan un coeficiente de correlación por grupos mínimo de 0.9934 el cual corresponde al Grupo 2 y máximo de 0.9999 para el Grupo 1, así como un coeficiente de determinación mínimo de 0.9868 para el Grupo 2 y máximo de 0.9998 para el Grupo 1. Es importante destacar que generalmente a una longitud de 290 nm estos parámetros mejoran.

Es importante resaltar la diferencia que presentan los métodos 2D299 nm y 2D290 nm ya que a la longitud de onda de 290 nm, como se observa en la Tabla No 7, cada uno de los productos presentan una mejor linealidad. Este hecho se puede explicar debido a que en este estudio las mejores condiciones para la determinación de cafeína se presentan a una longitud en la cual la máxima absorbancia se encuentra en 290 nm y no a una longitud de 299 nm. Cabe destacar que en la determinación de cafeína por el método de la segunda derivada este hecho es muy significativo, debido a que para el cálculo del contenido real de cafeína en los cafés es necesario utilizar la ordenada y pendiente de cada una de las curvas que se realizaron para cada producto de café, por lo que se requiere que estos parámetros se ajusten lo más que sea posible a un comportamiento lineal. Un ejemplo en que se resalta más este hecho es el que presenta la Figura No 14, en la cual se puede observar que el producto (E) presenta un mejor comportamiento lineal a una longitud de onda de 290 nm que a una de 299 nm.

**Figura No 14 CURVAS DE CALIBRACIÓN
PARA EL PRODUCTO (E)**

**COMPORTAMIENTO EN LAS DOS LONGITUDES
DE ONDA**



7.2 MÉTODO SIN DERIVAR:

Cabe señalar que para la realización del método se determinó estudiarlo de la siguiente manera:

Primero fue necesario conocer el efecto de la presencia y ausencia de la solución de hidróxido de sodio, por lo que para el análisis de las muestras fue necesario contar con una curva estándar para cada uno de los casos, la longitud a la cual se realizaron dichas curvas fue de 299 nm.

A continuación, se presentan las ecuaciones de regresión para las curvas de calibración a una longitud de onda de 299 nm en presencia y ausencia de hidróxido de sodio respectivamente, en un intervalo de concentraciones que varía de 0 - 500.0 µg/ml, con aumentos de 50.0 µg/ml en la Figura No 15 se observan dichas gráficas

$y = 0.0193 + 0.0012 X$ con NaOH la cual presenta un coeficiente de correlación de $r = 0.9996$ y un coeficiente de determinación igual a $r^2 = 0.9992$.

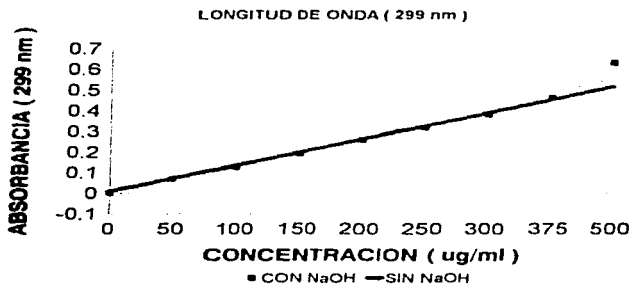
$y = 0.0074 + 0.0013 X$ sin NaOH la cual presenta un coeficiente de correlación de $r = 0.9980$ y un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9961$

Segundo se realizó una corrección, la cual se llevo a cabo con ayuda de el resultado que proporcionaron las muestras tras haberlas sometido a extracción Cabe señalar que la longitud de onda a la que se llevo a cabo el análisis fue de 290 nm , para lo cual fue necesario contar con una curva de calibración en presencia de hidróxido de sodio, la cual presenta la siguiente ecuación de regresión, en un intervalo de concentraciones de 0 - 100.0 µg/ml en la Figura No 16 se observa este efecto

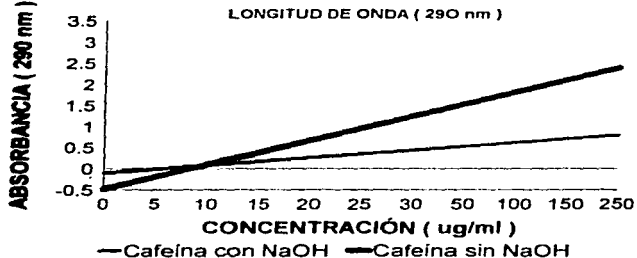
$y = -0.0985 + 0.0097 X$ con NaOH la cual presenta un coeficiente de correlación de $r = 0.9697$ y un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9403$

$y = -0.0706 + 0.0121 X$ sin NaOH la cual presenta un coeficiente de correlación de $r = 0.9967$ y un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9933$

**Figura No 15 CURVA DE CALIBRACIÓN
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE NaOH
POR EL MÉTODO SIN DERIVAR**



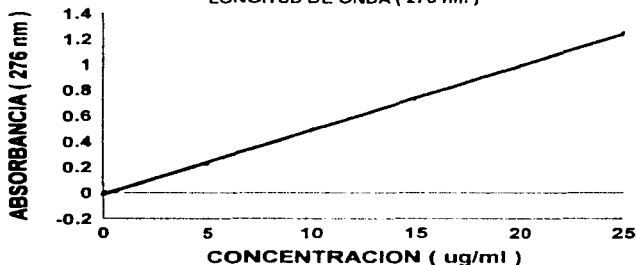
**Figura No 16 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA
CAFEÍNA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE
NaOH POR EL MÉTODO SIN DERIVAR**



7.3 MÉTODO A.O.A.C.

Para el desarrollo del método Official Methods of analysis / Of the Association of Official analytical chemists (A O A C), se necesitó para su implementación contar con una curva estándar de cafeína, en la cual sea posible interpolar los resultados obtenidos de cada producto analizado. La lectura de estas muestras se realizó en un espectrofotómetro en la región ultravioleta (276 nm), las concentraciones en las que se elaboró dicha curva son las que marca el método, las cuales se encuentran entre 0 µg/ml, y 25 µg/ml, con incrementos de 5µg/ml, como se puede observar en la Figura No 17, la cual presenta la siguiente ecuación de regresión y $r = -0.0126 + 0.0499 X$. El coeficiente de correlación $r = 0.9998$ y un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9996$ A O A C (1992)

**Figura No 17 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA
CAFEÍNA POR EL MÉTODO DE LA A.O.A.C**
LONGITUD DE ONDA (276 nm)



7.4 MÉTODO KJELDAHL.

Es sabido que este método se basa en la cuantificación volumétrica del amoníaco destilado equivalente al nitrógeno de los compuestos nitrogenados, que se forman al someterlos a digestión con ácido sulfúrico y posterior neutralización con hidróxido de sodio en exceso.

Es importante destacar que aún con los inconvenientes que el método presenta, se consideró importante su estudio por ser uno de los métodos alternativos que propone la literatura, además que en la Norma Oficial Mexicana NOM-F-176-1986 actualmente vigente, dentro de su etapa final contempla este procedimiento. Claro está que se presentan algunas variantes dentro de las cuales se encuentra el catalizador, el indicador, así como la valoración final, ya que en ésta reaccionan un ácido y una base fuertes, por lo que la disolución no es neutra en el punto estequiométrico, debido a la presencia del ion

amonio, presente en solución que acidifica el medio. La modificación del ácido, bórico del método kjeldahl presenta la ventaja sobre el método clásico, de que sólo se necesita una disolución patrón de ácido. El amoníaco es absorbido en una disolución de ácido bórico al 4 % en exceso, cuya concentración no es crítica, pues lo que se valora es el ion borato formado en la reacción. Avres (1970), Person (1988), Plaza (1994)

$\text{NH}_3 + \text{HBO}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{BO}_2^-$ Con una disolución patrón de ácido $\text{BO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HBO}_2$

El ácido consumido en esta valoración es equivalente al amoníaco obtenido y al contenido en nitrógeno de la muestra. Avres (1970)

8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE CADA MÉTODO ESTUDIADO

A continuación se presentarán y discutirán los resultados obtenidos para cada método estudiado, así como para cada producto y grupo analizado. En la Tabla No 8 se muestra los coeficientes de variación promedio de cada uno de los productos en ésta se observa que en general éstos se encuentran dentro de los valores permitidos para un estudio de esta naturaleza.

En lo que respecta al coeficiente de variación para el método (2D299nm) que se muestra en la Tabla No.8 uno de los componentes del Grupo 1 producto (B) así como el componente del Grupo 2 rebasan el valor permitido.

Con respecto al contenido de cafeína en los grupos de estudio la Tabla No 9 resume los resultados obtenidos. Como podemos observar, las concentraciones fluctúan en un intervalo de 0.59 - 3.17%. El resultado promedio obtenido (3.17%) para el miembro del Grupo 2 resulta ser el dato más alto encontrado para este método; esta diferencia se asume es debida a la interferencia provocada por sacarosa, en la Tabla No 5 se presenta que la sacarosa interfiere en una concentración mayor o igual a $2.9 \mu\text{g/ml}$, por lo que en un café con 30% de sacarosa adicionada, se espera debido a las diluciones manejadas una concentración de $42 \mu\text{g/ml}$ de sacarosa, es decir más del parámetro mínimo que se presenta en dicha tabla, como consecuencia se infiere que es posible que este fuera el motivo que influyo que dicha determinación diera una concentración más alta, otro de las causas que pudiera haber influido es la longitud de onda a la cual se esta haciendo la determinación.

TABLA No 8 COEFICIENTES DE VARIACIÓN ENTRE ENSAYOS

GRUPO	PRODUCTO	2D 299 nm	2D 290 nm	SDCNaOH 299 nm	SDCNaOH 290nm	A.O.A.C. 276 nm	KJELDAHL
1	A	1.96	1.88	1.54	0.84	1.99	1.55
1	B	*2.65	*2.96	*3.81	0.95	*2.60	1.85
1	C	2.07	2.03	1.12	0.85	2.35	2.54
2	D	*3.02	*3.17	0.83	1.62	1.19	*2.69
3	E	2.14	*2.80	1.49	0.24	1.16	1.67
3	F	1.55	1.46	1.88	0.86	0.83	0.83
3	G	2.19	2.04	1.31	0.87	1.04	2.35
3	H	2.30	2.36	1.47	2.27	1.84	1.70
4	I	*2.68	2.38	2.06	2.43	2.38	1.12
4	J	2.47	1.88	1.44	0.73	2.01	0.92

Promedio de tres Determinaciones para cada producto * Datos que rebasan el valor permitido

TABLA No 9 CONTENIDO DE CAFEÍNA EN LOS PRODUCTOS DE CAFÉ

GRUPO	PRODUCTO	2D299nm	2D290nm	SDCNaOH 299nm	SDCNaOH 290nm	A.O.A.C.	KJELDAHL
1	A	2.73 +/- 0.55	0.77 +/- 0.2	10.0 +/- 0.8	2.00 +/- 0.9	4.38 +/- 0.1	10.24 +/- 0.2
1	B	ND	0.58 +/- 0.1	0.04 +/- 0.7	1.39 +/- 0.1	3.95 +/- 0.1	8.89 +/- 0.2
1	C	1.61 +/- 0.12	0.51 +/- 0.2	0.00 +/- 0.8	1.82 +/- 0.1	3.58 +/- 0.1	9.49 +/- 0.3
2	D	3.17 +/- 0.12	0.75 +/- 0.15	0.12 +/- 0.8	1.65 +/- 0.1	2.09 +/- 0.1	6.27 +/- 0.2
3	E	2.23 +/- 0.4	0.35 +/- 0.6	5.58 +/- 0.8	1.33 +/- 0.1	0.32 +/- 0.1	6.77 +/- 0.1
3	F	ND	0.14 +/- 0.1	0.67 +/- 1.0	1.12 +/- 0.1	0.92 +/- 0.9	9.43 +/- 0.1
3	G	1.44 +/- 0.3	0.39 +/- 0.6	7.30 +/- 0.9	1.20 +/- 0.1	11.78 +/- 0.1	5.05 +/- 0.1
3	H	0.92 +/- 0.5	0.25 +/- 0.19	0.06 +/- 0.8	0.80 +/- 0.2	0.43 +/- 0.1	6.10 +/- 0.1

Contenido de Cafeína en (%) Promedio de Tres Determinaciones en cada producto — ND Datos no determinados

En lo que respecta al coeficiente de variación encontrado en el método (2D290nm), se presenta un comportamiento similar al método de (2D299nm) con excepción que en uno de los componentes del Grupo 3 producto (E) sobrepasa el valor permitido. Como se puede observar, en cuanto al contenido de cafeína este varía entre 0.14-1.26 %. En general, se tiene un contenido bajo, esto puede ser debido a que en este método se utilizó una muestra de 70 mg de café con un contenido promedio de 2% de cafeína, la dilución que se experimentó durante el ensayo fue de 1.500, por lo tanto la concentración final sería alrededor de (28 µg/ml). Como puede observarse de la Figura No 13 el límite de sensibilidad para la determinación es de (30 µg/ml) por lo que si se considera la forma en que se construyeron las curvas de adición patrón, la cantidad de cafeína aportada por la muestra es despreciable y, por lo tanto, los valores obtenidos solo tienen una pequeña variación.

Es importante resaltar que como ya se mencionó, en el presente trabajo se analizaron dos productos de café de grano, en este caso estos se agruparon con el número 4, pero por considerar inadecuados los resultados se decidió no presentar los contenidos de cafeína en cada uno de los métodos analizados, aunque cabe destacar que como se puede observar en la Tabla No 8 los coeficientes de variación indican que estos productos fueron tratados bajo condiciones adecuadas de análisis, ya que en general todos estos productos presentan en cada uno de los métodos valores que se encuentra dentro del intervalo permitido.

Los resultados que se presentan para el método de (SDCNaOH 299nm) en lo que se refiere a coeficientes de variación estos varían entre un 0.83 a un 1.81, resulta importante destacar que el componente que sobrepasa el valor permitido es el mismo que se presentó para los métodos de 2D299nm y 2D290 nm.

El contenido presente de cafeína en este método oscila entre 0.06-10 % el intervalo en el que se encuentran los porcentajes de recuperación varía entre 65-243%, es importante resaltar que a excepción del producto (F) los miembros del Grupo 3 son los que presentan un mayor porcentaje de recuperación, este hecho puede atribuirse a que la longitud de onda a la cual se está haciendo la determinación es de 299 nm.

TABLA No 10 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN EN LOS PRODUCTOS DE CAFÉ					
GRUPO	PRODUCTO	SDCNaOH 299nm	SDCNaOH 290nm	A.O.A.C.	KJELDAHL
1	A	111.00	68.40	116.16	108.45
1	B	ND	80.52	97.44	106.54
1	C	ND	70.36	111.48	94.95
2	D	69.31	83.49	113.83	82.72
3	E	171.00	80.94	84.42	102.98
3	F	65.00	87.70	132.21	99.77
3	G	195.14	82.72	128.16	101.43
3	H	243.12	79.65	105.97	105.09

Promedio de tres Determinaciones en cada producto — ND Datos no determinado

Resultado interesante destacar que a esta longitud de onda se analizaron los productos con la diferencia de que estos no fueron tratados con hidróxido de sodio. Estas muestras presentaron coeficientes de variación entre 0.53-2.97%. El método resultó inadecuado para la determinación de cafeína, por lo que se consideró no presentarlo, sin embargo, en este caso el producto B es el que presenta el menor porcentaje de recuperación siendo este de 51.70%, cabe resaltar que a excepción de este producto los porcentajes de recuperación en este caso se encuentra por arriba del 85%.

En el método (SDCNaOH 290 nm), se presenta un coeficiente de variación que oscila entre un 0.73 a un 2.43. En cuanto al contenido de cafeína se puede observar que este varía entre un 0.26 y 2.00%, con respecto al porcentaje de recuperación de la cafeína los resultados fluctúan entre 68-87%. El método representa un porcentaje de recuperación con poca dispersión respecto a los demás métodos.

Es importante resaltar que para que este método presente mejores porcentajes de recuperación se deben realizar extracciones como en el caso de SDCNaOH 290 nm para que de esta manera se pueda corregir alguna posible interferencia que pudiera estar presente.

La Tabla No 8 presenta el resultado promedio para el coeficiente de variación del método A.O.A.C el cual fluctúa desde 0.83 hasta 2.60, cabe hacer notar que el producto B del Grupo 1 es el único valor que sobrepasa los valores permitidos.

Aplicando el método, de la A.O.A.C se encontró que el contenido de cafeína de los cafés oscila entre 3.58-4.38 para el Grupo 1, de 2.09 para el Grupo 2 y de 0.32-0.43 y para el Grupo 3, como se observa en la Tabla No 9.

Es importante destacar que los resultados presentados por los productos F y G del Grupo 3 indican por su comportamiento que se encuentran fuera de la norma establecida para este tipo de cafés, debido a que el contenido de cafeína de un café descafeinado no debe ser mayor al 0.3 g / 100 g de Café, según la Norma ISO-10095 "determinación del contenido de cafeína en café", la cual utiliza método de HPLC.

La Tabla No 10 presenta los porcentajes de recuperación los cuales fluctuaron entre 84.42-132.21% lo que en general representa un porcentaje alto, Cabe señalar que en el caso del Grupo 4 no fue posible hacer las determinaciones.

Los resultados indican que los valores obtenidos se encuentran por encima del contenido real, en este tipo de productos. Cabe mencionar que durante la parte experimental, los productos D, F y G presentaron dificultades debido a la gran formación de emulsiones. En algunos trabajos (Cepeda 1990) abordan esta problemática y proponen la utilización de Óxido de Magnesio tras una extracción y purificación con minicolumnas Sep Pak C18 con objeto de evitar la extracción cloroformica y con esto evitar la formación de emulsiones, pues es sabido que otros autores han propuesto purificaciones en las cuales sea comprobado que no se elimina por completo las sustancias interferentes (dentro de estas sustancias se encuentra la trigonelina). En este estudio proponen una digestión en caliente con el fin de eliminar el ácido clorogénico y otras sustancias. A O A C (1992), Cepeda (1990)

El comportamiento particular de este método puede explicarse, pues además de lo que se menciono anteriormente, la longitud de onda a la cual se lleva acabo el análisis de los productos es de 276 nm, y debido a que ingredientes como el caramelo y los taninos interfieren en la determinación de cafeína, ya que su absorbancia máxima está en 276.4 y 275.8 nm, respectivamente. El método presenta tanto para el grupo de Cafés Soluble 100 % puro, así como para el grupo de Cafés Soluble con 30 % de Azúcar un mayor contenido de cafeína

El método **kjeldahl** presentó un coeficiente de variación que oscila entre un 0.83 a un 2.69, como puede observarse en la Tabla No 8.

La Tabla No 9 resume los resultados obtenidos, en lo que respecta al contenido de nitrógeno total en los diferentes grupos en estudio como se puede observar estos fluctúan entre 5.05 -10.24%

En cuanto al porcentaje de recuperación este fluctua entre 82.72 -108.45%. Como se puede observar, el método representa el más alto porcentaje con respecto a los demás métodos analizados, este comportamiento es debido a que el método kjeldahl se basa en la cuantificación volumétrica del amoniaco destilado el cual equivale al nitrógeno total de los compuestos presentes en la muestra, por lo que resulta interesante observar que los resultados presentes en este método confirman este comportamiento

9. CONCLUSIONES

En una norma se establecen las características que debe satisfacer un material, artículo o producto para garantizar la aptitud para el uso al que está destinado

Es importante estar consciente de la existencia de normas y saber sobre todo que el conocimiento de estas pueden ofrecer una protección y un desarrollo, no importando el papel que estamos desempeñando, ya sea como consumidor o como productores

La normalización se convierte en una herramienta de soporte que ayuda a impulsar a cada una de las empresas del país, ya que incrementa el nivel de calidad de todos los productos mexicanos, logrando con esto ofertar cada día y mejorar las condiciones de competitividad con el mercado interno y externo

La absorción de radiación por moléculas a longitudes de onda existente se usa frecuentemente para el análisis cuantitativo debido a la relación directa existente entre la absorbancia y la concentración, es por eso que la espectroscopia es uno de los medios más útiles de que dispone el químico para el análisis de muestras, es indudable que esta técnica analítica cuenta con una gran difusión debido a que presenta diferentes modos de interacción con las especies químicas, maneja un amplio intervalo de longitudes y cuenta con la existencia en el mercado de instrumentos de medida cada vez más precisos. Estudiar la determinación de cafeína usando las derivadas del Espectro UV como técnica alterna a las ya existentes, para que se pueda llevar a cabo una utilización más adecuada, ya que ésta nos ofrece un amplio campo de aplicaciones a un precio accesible debido a que presenta varias ventajas dentro de las cuales podemos mencionar una medida exacta de λ_{max} , mejor resolución de los espectros, análisis de muestras turbias, así como determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o más componentes

Se presentaron en este trabajo las bases teóricas generales del método de espectroscopia de derivadas, así como los principales avances y aplicaciones en relación a estos métodos de análisis, con el propósito de que exista una mayor versatilidad en las técnicas para la determinación de cafeína en café

A la fecha, los métodos utilizados en la determinación de cafeína en café han tenido una gran problemática y aunque algunos son más eficientes que otros, así como más sencillos y fáciles de realizar e implementar, es necesario hacer uso de la nueva tecnología ya que ésta puede ayudarnos a ofrecer al consumidor un producto de calidad que se ajuste más a las necesidades actuales de vida. La capacidad de disponer de una técnica que pueda ser aplicable para cualquier producto de café que se expendiera en el mercado nacional y que pueda verificar con rapidez, eficacia y confiabilidad, sin dejar de prescindir de una especificidad y sensibilidad en cuanto al contenido de cafeína presente, es una necesidad que no es proporcionada por los métodos actualmente vigentes, sin embargo, aunque métodos como la espectroscopia de derivadas pueden ofrecernos varias ventajas para resolver estas necesidades, el implementar una técnica que resuelva la problemática actual no es sencillo de realizar, pues se necesita afinar meticulosamente diversos parámetros, para que éstos aporten la suficiente información para establecer un método con el cual se pueda confirmar con precisión el contenido real de cafeína en el producto pues si no está cometiendo un fraude, así como también se está poniendo en juego la salud del consumidor

Es importante señalar que este trabajo pretende hacer conciencia de la necesidad de resolver el problema que se presenta en la cuantificación de cafeína, sin embargo aunque los resultados presentes indiquen que el mejor método es el de Sin derivar a 290 nm, la afirmación de este resultado debe confirmarse mediante una validación del método, teniendo siempre presente las ventajas que no ofrece la espectroscopia de derivadas en la cuantificación de cafeína no solo en cafés sino en diversos productos que la contienen, no olvidando que hay aditivos que muchas de estas muestras contienen que provocan interferencia en la cuantificación. Resulta interesante comentar que el método que nos ofrece más apoyo en la resolución de los problemas que presentan los productos existentes en el mercado es el de Segunda derivada a 290 nm debido a que este nos permite seguir los cambios más sutiles de todos y cada uno de los componentes de la muestra. Es importante señalar que los resultados indican que el método nos permite determinar de una manera conveniente el contenido de cafeína que presentan los cafés decafeinados. Una de las inquietudes que el presente trabajo plantea es la necesidad de exigir y poner en evidencia los productos que no cumplen con la calidad que se requiere para su óptimo consumo, así como la urgencia de que [SECOFI] tenga un control más riguroso en la desarrollo e implementación de las normas que rigen la calidad de dichos productos.

10. REFERENCIAS

1. A.O.A.C.(1992) Official Methods of Analysis Official Analytical Chemists, De By Sidney Williams Arlington, Virginia Association of Official Analytical Chemists Edición 4 a
2. Ayres Gilbert H. Analisis Quimico Cuantitativo Newyork Harper & Row . Segunda Edición (1970) pp 342-344
3. Balestrieri C. Second Derivative Spectroscopy of Proteins A Method for the Quantitative Determination of Aromatic Amino Acids in Proteins Eur J Biochem . 90. (1978) pp 433-40
4. Belitz, Hans-Dieter Quimica de los Alimentos Zaragoza España Acriba (1988) pp 47-760
5. Bowman, William Cameron, Rand M. Farmacologia. Bases Bioquimicas y Patologicas 2a Edición (Ed) Interamericana México (1984) pp 42 34-42 35, 42 13
6. Braverman, Joseph BS Introduccion a la Bioquimica de los Alimentos Ed el Manual Moderno S.A de C V Compuestos Fenolicos (1984) Capitulo 16. pp 267-291.
7. British Pharmacopoeia Volumen, II United Kingdom (1993)
8. Bruneton, Jean Elementos de Fitoquimica y Farmacognosia (Ed) Zaragoza, España Acriba (1991)
9. Cepeda A., Paseiro P., Simal J y Rodriguez J L. (1990) Contribucion a la determinacion por espectrofotometria ultravioleta del contenido de cafeina en cafes solubles Tecnologia e Higiene de los alimentos 27 pp 23-27
10. Charley, H. Tecnologia de Alimentos (Ed) Limusa S A de C V (1987) pp 139-152
11. Connors Kenneth A Curso de Analisis Farmaceutico Ed Reverté, S.A (1980), Capitulo 8
12. Craig, Charles R , Stitzel, Robert E. Farmacologia Médica. (Ed) Interamericana S.A. de C V 1a Ed en español, (1985) pp 489-493
13. De León Rodriguez Luis Manuel. Estudio quimico analitico de colorantes derivados azo, amarillos y rojos, utilizados en Alimentos. Trabajo de investigacion para obtener el título de Quimico en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Cientificas de la Universidad de Guanajuato, Capitulo II, (1996) pp 23-27
14. Derache, Coords. R. Tr Por Ester Boix Toxicologia y Seguridad de los Alimentos (Ed) Omega (1986)
15. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaria de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1994) 6a Edición. pp 422-423.
16. Fell Anthony F The Analysis of Pharmaceutical Dosage Forms by Second Derivative Ultraviolet - Visible Sepectrophotometry Proc. Analyt Div Chem. Soc.,15,260-7 (1978).

17. Fell Anthony F. The Analysis of Phenol and Aromatic Alcohols by Second Derivative UV -Spectroscopy J Pharm Pharm., (1978) pp 30, 36
18. Florey, K. Analytical Profiles of Drug Substances. Volumen 15 (Ed) Academic Press Inc London (1986) pp 74-78 , 102-109
19. Frias Hurtado José Alejandro. Desarrollo y validacion de un método analítico para determinar cafeína en un jarabe que también contiene acetaminofen, maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilpropranolamina Tesis de Licenciatura de la facultad de Química Capitulo II (1995)
20. Fritz Eichholtz. Tratado de Farmacología Impreso en España por Tipografía Artística, Palleteer (1963) pp 468-475
21. Garcia Valdecasas Santa Maria Farmacología (Ed) Barcelona Expans 7a Ed (1978) pp 126-128, 338-339
22. Good & Gilman A y cols. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 8a edición. Edit Médica Panamericana México (1991) pp 606-611
23. Harris, D C. Analisis Químico Cuantitativo Grupo Editorial Iberoamerica, S A de C V, México, (1992) pp 451-473
24. Hart ,D Leslie. Análisis Moderno de los Alimentos, (Ed) Acriba zaragoza España 2a Reimpresión (1991) Capitulo 5
25. Hidalgo y Mondragón, María del Consuelo. Farmacia Química (Ed) Alhambra, Madrid (1969) pp 362-365
26. Higuchi, Takeru and Bodin, J I. Pharmaceutical Analysis Edit John Wiley & Sons U.S.A (1961) pp 241
27. Houpt P.M. Combination of Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometer and Gas Chromatograph Appl Spectrosc , 31, (1977) pp 473-474
28. Inmecafe- Compañía Nestle, S.A. DE C.V. El cultivo del café en México (Ed) La fuente, S A 1a Ed (1990) pp 29-40
29. Internacional Standar. Coffe - Determination of caffeine content (Reference method) (1983).
30. Internacional Standar. Coffe - Determination of caffeine content - Method using high - performance liquid chromatography. ISO 10095 1992 (E)
31. Katzung, G B. Pharmacology Examination & Board Review. 3th Edition Appleton & Lange U S A (1993) pp 35
32. Kirk Raymond Eller, Othmer Donald F. Enciclopedia de tecnología química Tomo III. México. D F (1962) pp 408-427.
33. Korolkovas, A., Burckhalter, J H., Compendio esencial de química farmacéutica 1a. Edición. (Ed) Reverté España (1979) pp 236-265
34. Lehninger, L. A. Bioquímica 2a edición (Ed) Omega México (1982) pp 822-825.

35. Linder, Ernst. Toxicología de los alimentos (Ed) Zaragoza España Acriba (1980) pp 61-62
36. Litter, M. Compendio de farmacología 4a Edición, (Ed) El Ateneo Argentina (1988) pp 418-429
37. Luna Munguía M. Edith. Anteproyecto de Norma Para Licor de Café Tesis de Licenciatura de Facultad de Química (1994) Capítulo II
38. Martindale. The extra Pharmacopoeia 30 edition (Ed) The Pharmaceutical press London (1989) pp 1314-1316
39. Mayanna and B Jayaram. Determination of Caffeine Using Sodium N - Cholo -p-toluenesulphonamide. Analyst 106 (1981) pp 729-732
40. Meyer Rodriguez Maximiliano, Ruiz Verdugo Luis (1977) Una planta Refinadora de Cafeína a partir de los crudos provenientes del Café Capítulo I, II
41. Meyers, Frederik H., Ernest, J., Alan, G. Manual de Farmacología Clínica (Ed) El Manual Moderno, S.A 4a (Ed) (1980) pp 139-143, 329
42. Moffat A.C Jackson J V y Cols. Clarkes Isolation and Identification of Drug 2a Edition (Ed) The Pharmaceutical Press London (1986) pp 420-422
43. Multon J.L. Aditivos y auxiliares de fabricación en las Industrias Alimentarias De Acriba, S.A. Zaragoza (España) (1988) pp 31
44. Norma Oficial De Método de Prueba para la determinación de cafeína (en cafés) Nom.-F-176- 1968
45. Norma Oficial Mexicana " Café 100% puro tostado en grano o molido " Nom-f-13-s-1980.
46. Norma Oficial Mexicana " Café tostado y café mezclado tostado con azúcar " Nom-f-173-s-1982.
47. Norman W. Desrosier, Ph.D Elementos de Tecnología de Alimentos (Ed) continental, S.A. de C.V., México 7a Ed (1990) pp 607-619
48. O'Haver T.C Derivative and Wavelength Modulation Spectrometry Anal. Chem., 51, 91A - 100A (1979)
49. O'Haver T.C. Numerical Error Analysis of Derivative Spectrometry For The Quantitative Analysis of Mixtures Anal. Chem., 48, (1977) pp 312-318
50. Oi-Wah Lau, Shiu - Fai Luk, Oi-Ming Cheng and Teresa P. Y. Chiu Background-correction Methods for the Determination of Caffeine in Beverages, Coffe and Tea by Using Seccon - derivative Ultraviolet Spectrophotometry (1992) Analyst 117, pp 777
51. Person, Harol E, Ronald S. K., Ronald Sawyer. Análisis Químico de Alimentos. (Ed).Churchill Livingstone 3a Ed (1988) pp 301-308.
52. Plaza Almanza Arnulfo La fijación del Nitrógeno y su Relación con Algunos Microorganismos. Tesis de licenciatura de FES-cuautitlan Capítulo I. (1994)

53. Ramírez Zermeño, R.M. Aplicación de los lineamientos del programa HACCP (Análisis de peligros y puntos Críticos de Control), a una industria elaboradora de yoghurt. Tesis de licenciatura de FES-Cuautitlan (1995).
54. Remington's Pharmaceutical Sciences. 18 ava Edition (Ed) Mack Publishing company. U.S A. (1990) pp 1132-1134
55. Schmitt A. Derivative Spectroscopy Perkin- Elmer Applications Data Bulletin ADS 103, Perkin-Elmer Ltd, Norwalk, Conn, (1977)
56. Shmidt Schimael Edward Alexander Tesis de Licenciatura en Economía Universidad Anahuac. (1992) Capitulo II
57. Skoog, D A and West, D M., Análisis Instrumental, Segunda edición, Editorial McGraw-Hill, México, (1989) Capitulo 7 y 8
58. Skoog, D.A and West, D.M Fundamentos de Química Analítica. Cuarta Edición, Editorial Reverté, S.A. España (1992) Capitulo 15.
59. Such Vicente. Stability Assays of Pharmaceutical Formulas For Thiamine and Pyridoxine by High Performance Thin-Layer Chromatography and Derivative Ultraviolet Spectrometry. Anal Chem., (1980) pp 412-419.
60. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemical, drugs, and Biologicals. Susan Budavari. (1989). 11 Edition. Merck & Co., Inc., U.S.A. pp 1635.
61. The Pharmaceutical Codex. 11ava Edition (Ed) The Pharmaceutical press London. (1979). pp 118-119
62. The Pharmacopeia of the United States of America XXIII. United States Pharmacopoeial Convention Inc. U.S A (1994) pp 1982-1984
63. William, O. Foye. Principios De Química Farmacéutica (Ed) Reverté, S.A. (1984) pp 326-328.

APÉNDICE I:

1.1 CAFEÍNA

USOS:

Estimulante ligero del Sistema Nervioso Central

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA CAFEÍNA: Braverman (1984)

Debido a la gran demanda de la cafeína, al igual que muchos otros alcaloides, no siempre es posible obtenerlos de sus fuentes naturales debido a la imposibilidad de obtenerlos en cantidades suficientes o por la dificultad que pueda presentar tal o cual proceso de obtención, se ha tenido que recurrir a métodos de síntesis orgánica. Estos procesos son innumerables teniendo su origen en 1861, cuando Strecker la obtiene a partir de la teobromina (3,7 dimetilsantina) que es el alcaloide específico del cacao Meyer & Ruiz (1977)

La cafeína, puede ser obtenida de varias formas

- 1.- Como cafeína natural, a partir de los vegetales que la contienen, por medio de métodos extractivos, ya sea en forma de sales o complejos solubles
- 2.- Por síntesis parcial, en las cuales se emplean materias primas naturales o sintéticas

1.2 SÍNTESIS:

- a) A partir del ácido úrico. Florey (1986), Meyer (1977)
- b) A partir de la teobromina
- c) A partir de la teofilina cálcica

1.2 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA:

La cafeína se considera como un estimulante del Sistema Nervioso Central. Pertenecen a la familia de las purinas denominadas xantinas García (1978)

La importancia farmacológica de las xantinas resulta de la introducción de grupos metilo en los átomos de nitrógeno heterocíclicos originándose la teofilina, la teobromina y la cafeína, que es una trimetilkantina. Forman diversos compuestos que en su mayoría son poco estables, sobre todo en medio ácido. Están distribuidas en diferentes bebidas que son usadas ampliamente en todas partes del mundo Hidalgo (1969), Luna (1994), The Pharmaceutical Codex (1979)

Estos compuestos tienen actividades farmacológicas del mismo tipo, pero en grado diferente en la tabla No. 11 se muestra esta relación Hidalgo (1969), Linder. (1980).


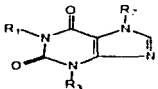
1.4 MECANISMO DE ACCIÓN:

Las tres acciones celulares básicas de las metilkantinas que explican sus diversos efectos, son: Bowman (1984), García 1978), Katzung (1993), Kirk. (1962), Korolkovas (1979), Linder. (1980)

- 1.- Las asociadas con las translocaciones de calcio intracelular
- 2.- Las mediadas por el bloqueo de los receptores de la adenosina.

3.- Las mediadas por la acumulación creciente de nucleótidos cíclicos.

Todas estas acciones se interpretan hoy como consecuencia de la inhibición de la fosfodiesterasa, enzima intracelular que degrada el cAMP. Este nucleótido cíclico es el mediador intracelular de la acción de diversas hormonas a través de los receptores correspondientes y en especial los receptores beta y dopaminérgicos. Fritz (1963)

TABLA NO. II ESTRUCTURA QUÍMICA Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LAS XANTINAS							
FARMACO		ESTRUCTURA QUÍMICA			ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA		
Imidazol  Purina		 Xantina (R ₁ , R ₂ , R ₃ = H) 2,6-Dioxapurina			Estimulación del Sistema Nervioso Central	Estimulación Cardíaca	Acción Diurética
Teofilina	R ₁ -CH ₃	R ₂ -CH ₃	R ₃ -H	++	+++	+++	
Teobromina	-H	-CH ₃	-CH ₃	++	++	+	
Cafeína	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	+++	+	++	

1.5 FARMACOCINÉTICA:

La cafeína es distribuida con relativa lentitud en el organismo humano, presenta una buena absorción después de una administración oral, siendo ésta, más rápida que en una administración intramuscular. La absorción después de una administración rectal es baja y errática. Higuchi (1961), Linder. (1980), Remington's (1990), The Pharmaceutical Codex. (1979).

Una vez distribuida por todos los órganos, sufre después la biotransformación, sobre todo en el hígado. La cafeína es metabolizada casi completamente via oxidación, desmetilación (dimetil y monometilxantina) y acetilación; con respecto a la absorción digestiva de la cafeína, hay que señalar que la cafeína liberada a nivel del estómago se comporta como base sumamente débil y se encuentra parcialmente ionizada en el jugo gástrico e intestinal, por lo que se absorbe también parcialmente en el estómago e intestino. Con menos rapidez se verifica en el tubo gastrointestinal, la absorción de las sales dobles en las cuales también la acción excitante está más acentuada (Schuller). La mayor parte de la cafeína pasa finalmente a urea, no a ácido úrico como sería de esperar, si bien sólo pequeñas cantidades de cafeína aparecen en la orina. La mayor parte es desintegrada en el curso de 5-6 horas y durante este periodo se elimina también la casi totalidad de cafeína por la orina; el resto

tarda aún, por el contrario, unas 24 horas por tanto la acción psíquica de la cafeína dura también de ordinario unas 5-6 horas. Frias (1995)

1.6 FARMACODINAMIA:

La cafeína hace aumentar la síntesis y liberación de noradrenalina en el cerebro y en las terminaciones simpáticas periféricas. Además, la cafeína y teofilina fortalecen la acción de la adrenalina y noradrenalina endógenas sobre la circulación y el metabolismo reprimiendo la 3,5-adenosinmonofosfato-fosfodiesterasa. García (1978), Linder (1980), Luna (1994), Remington's (1990)

Actúa tanto central como periféricamente, produciendo un efecto simpaticomimético suave. Centralmente produce euforia, sensación de bienestar, suprime la fatiga, el hambre, el sueño y estimula el centro respiratorio y el centro vasomotor. En la periferia es un estimulante cardíaco, además potencia los efectos de los adrenérgicos, aumenta la fuerza de contracción del miocardio y también del músculo esquelético.

Dilata los vasos y promueve diuresis. Sobre el metabolismo, promueve la glicogenólisis, y la lipólisis etc. Fritz (1963)

Las xantinas tienen acciones opuestas. Se comprueba que aumentan el riego sanguíneo coronario, pero al mismo tiempo tienen efectos estimulantes directos sobre el músculo cardíaco que aumentan la demanda de oxígeno. Craig (1985).

La administración o ingestión de cafeína produce primero estimulación cerebrocortical, apareciendo las acciones cardiovasculares y diurética como "efectos colaterales". Meyers (1980)

A.- Estimulación del SNC

1.- Cortical: Las xantinas pueden producir falta de sueño y mejoría de la ejecución psicomotora

2.- Bulbar: Grandes dosis pueden estimular a la respiración. Sin embargo el efecto específico se debe a la etilendiamina. La estimulación del centro vasomotor bulbar, que causa vasoconstricción periférica, eleva la presión sanguínea si esta acción no fuera usualmente antagonizada por los efectos periféricos directos. La estimulación del centro vagal del bulbo (cardioinhibitorio) conduce a disminución de la frecuencia cardíaca.

B.-Efectos cardiovasculares

1.-Sobre el miocardio: La frecuencia sinusal normal, la formación de impulsos ectópicos y la fuerza de la contracción cardíaca son aumentadas. Se pueden producir extrasístoles o arritmias ventriculares importantes y el gasto cardíaco aumenta por lo regular.

2.-Dilatación periférica: Las xantinas son relajantes directos del músculo liso, los vasos sanguíneos serán dilatados. Este efecto es reducido al mínimo por los efectos presores de la estimulación bulbar y cardíaca.

3.- Circulación coronaria: La vasodilatación periférica causada por las xantinas, actuará reduciendo el trabajo cardíaco, pero el incremento de la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción actuarían en una dirección desfavorable.

C.-Relación del Músculo Liso El efecto sobre el músculo bronquial es el de importancia terapéutica.

D.- Diuresis Las xantinas bloquean la absorción del sodio por los túbulos renales .

E.- Secreción gástrica Las xantinas estimulan la secreción gástrica de ácido y la producción de enzimas por el estomago Sin embargo, tanto el café ordinario como el descafeinado estimulan la secreción de ácido más que la cafeína sola, lo que sugiere que el constituyente importante en el café es alguna otra cosa distinta a la cafeína Meyers (1980).

1.7 TOXICOLOGÍA:

El empleo moderado de las bebidas que contienen cafeína no parece plantear problemas para la mayor parte de personas Sin embargo, es indudable que tal uso crea hábito que surge con su administración a largo plazo La dependencia física y el síndrome de abstinencia han sido demostrados en situaciones experimentales controladas y se ha observado que el consumidor crónico de bebidas con cafeína que bruscamente las suprime suele experimentar con frecuencia cefaleas, y una sensación general de fatiga que puede durar incluso años Aunque no se ha comprobado que estos síntomas constituyan un tipo verdadero de síndrome de abstinencia, tal posibilidad no debe excluirse No está demostrado que se desarrolle tolerancia para los efectos estimulantes del sistema nervioso central que posee la cafeína Craig (1985), Katzung (1993), Luna (1994), Meyers (1980), Remington's (1990)

La dosis fatal estimada para la cafeína en humanos es de unos 10g William (1984)

Una sola taza de café puede elevar la frecuencia del pulso y la presión sistólica ligeramente, Cantidades mayores que pueden causar extrasístoles ventriculares, Otras arritmias, por ejemplo taquicardia auricular paroxística usualmente aparecen sólo cuando el efecto de la cafeína es reforzado por el tabaco y la fatiga Los aceites irritantes que están en muchas de las bebidas a base de xantinas pueden originar gastritis e incluso diarrea, y activar una úlcera péptica latente Las bebidas descafeinadas aun poseen estas sustancias irritantes Fritz (1963), Meyers (1980)

Las xantinas no se deben considerar estimulantes centrales importantes o útiles, en el tratamiento de la intoxicación por medicamentos, no se debe permitir que interfieran con formas de tratamiento más específicas o más efectivas Meyers (1980)

Algunos autores han relacionado a la bebida de café o te con la frecuencia de infarto de miocardio, En los pacientes con enfermedades coronarias se ha encontrado una relación significativa entre la concentración de lípidos y lipoproteínas del suero y la ingestión de café, que no aparecen en las personas sanas La cafeína tiene acción directa sobre la fibra, muscular, que se manifiesta especialmente en el músculo cardíaco, libera iones calcio de los grana del retículo endoplasmático y aumenta la permeabilidad celular de forma que se facilita el flujo de calcio, con el consiguiente aumento de la fuerza de contracción cardíaca en dosis altas, que normalmente no se alcanzan bebiendo café, impide que el calcio vuelva a fijarse al retículo endoplasmático García 1978), Linder (1980), Meyers (1980)

Paul encontró que existía una correlación entre el desarrollo de enfermedades coronarias y el consumo de café, aunque el nivel de colesterolina en suero permanecía normal. Es posible

que el favorecimiento de la aparición de la esclerosis coronaria guarde relación con la acción de la cafeína sobre el metabolismo de las catecolaminas. Tanto las catecolaminas como la cafeína aumentan el flujo del calcio. Linder (1980), Meyers (1980)

La cafeína puede producir úlcera de estómago por aumento de la secreción gástrica. En algunas personas los ácidos grasos libres del plasma pueden triplicarse cuando se ingiere una cantidad de café que corresponde a 200-250 mg. de cafeína

La inyección intramuscular de cafeína aumenta los ácidos grasos libres del suero, lo que puede inducir un aumento de la síntesis de lipoproteínas en el hígado. En apariencia esto ocurre sólo en determinadas personas

Los embarazos mal logrados, las malformaciones congénitas y el bajo peso al nacer también se han asociado al consumo de cafeína, aunque no hay nada concluyente en torno a tales efectos. De cualquier modo, por lo general se recomienda a las mujeres embarazadas que moderen la ingestión de esta sustancia

Debido a la semejanza estructural entre las xantinas y los nucleótidos de la purina, se han efectuado numerosas investigaciones acerca de los efectos mutágenos de la cafeína. Se ha observado la inducción de mutaciones en bacterias, hongos, plantas, moscas de la fruta, ratones y en células humanas in vitro, también puede producirse un incremento de los efectos mutágenos de otros compuestos químicos o de las radiaciones. Sin embargo, la ingestión de cafeína no representa un riesgo significativo de mutaciones para el hombre. Aunque los estudios con animales han demostrado que la cafeína posee cierto poder teratogéno, no existe ningún dato que relacione la teratogenia con la cafeína, en humanos William (1984)

Challis y Bartlett (1975) han evidenciado que los compuestos fenólicos fácilmente oxidados, constituyentes del café, catalizan la formación de nitrosaminas a partir de nitrato y de anina secundaria al pH gástrico. Estos experimentos muestran que el 4-metilcatecol y el compuesto fenólico del ácido clorogénico (aproximadamente 13% del peso seco de los constituyentes solubles del café) ejercen efectos catalíticos sobre la formación de nitrosaminas. Este resultado implica que diversos alimentos y bebidas, incluyendo el café, pueden tener propiedades cancerígenas. Derache R (1986)

APÉNDICE II:

II.1 CALIDAD DEL CAFÉ EN MÉXICO

La mayoría del café que produce México es del tipo Arábica con una pequeña porción de Robustas. Su calidad está clasificada de la siguiente manera:

Altura, Prima Lavado, Buen Lavado y Consumo Nacional. El tipo Consumo Nacional está considerado como el de más baja calidad y es el que normalmente se destina al mercado Nacional. Sin embargo, sólo se diferencia por el porcentaje de defectos físicos. El tipo Altura se cultiva a alturas mayores entre mayor sea la altura a la que se siembra el café, mayor es su calidad mientras que el Prima Lavado y el Buen Lavado crecen a menos alturas. Shmidt (1992).

México cuenta con alrededor de 1500 beneficios húmedos y 300 beneficios secos, los cuales se encuentran ubicados por orden de importancia en Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Hidalgo, Guerrero, San Luis Potosí, Nayarit y Colima. Shmidt (1992).

Se estima que el 40% del consumo realizado en México es de café instantáneo. Del 60% restante, la mayoría del consumo es café tostado con azúcar, mientras que sólo una pequeña porción es café tostado puro. Shmidt (1992).

II.2 CLASIFICACIÓN:

Las especies de café que se cultivan en México son *Coffea Arábica* y *Coffea Canephora*. La primera es de mayor importancia por su calidad, valor en el mercado nacional e Internacional y por su extensión territorial. A las variedades pertenecientes a *C. Arábica* se les conoce como cafés árabes, mientras que la única variedad producida de *C. Canephora* se le denomina café Robusta. Como su nombre lo indica, es una variedad de gran vigor, su productividad es elevada pero su tamaño dificulta su cosecha. Se le señala como tolerante a la roya del café y a los nemátodos. Inmecafé-Compañía Nestlé (1990), Meyer & Ruiz (1977), Shmidt (1992).

II.3 PRINCIPALES VARIEDADES:

Existen cuatro tipos de variedades de cafetos: Arábica, Robusta, Excelsa, Libérica. Inmecafé-Compañía Nestlé (1990).

La variedad en los cafés árabes se debe principalmente a la ocurrencia de mutaciones o a la hibridación, ya sea entre variedades de la misma especie o entre especies diferentes, las variedades que se cultivan en México son:

Typica, Bourbon, Caturra, Mundo Novo, Catuai, Garnica, Maragogipe, Pacamara, San Bernardo, San Ramón, Villalobos, Villa Sarchi, Pacas, Blue Mountain, Catimor, Sarchimor, Colombia. Inmecafé-Compañía Nestlé (1990).

La clasificación del café crudo se realiza atendiendo al aroma y sabor, pero además examinando el tamaño, color, forma, consistencia y corte de los granos, las causas que obedecen a un mal sabor, son el ácido acético, acetoina, dincetilo, butanol e isobutanol que contienen semillas congeladas y verdes. Belitz (1988).

II.4 COMPOSICIÓN:

El café verde crudo contiene agua, proteínas, cafeína, varios carbohidratos y ácidos (especialmente solubles y no volátiles), trigonelina y materia mineral Person (1988)

El mucilago del café de la fruta está compuesto por 85% de agua y 9% de proteína, azúcar 4%, ácido péptico 1% y cenizas 0.6%. La composición del aceite en el café varía de acuerdo con los tipos de los granos, siendo su composición aproximada, la siguiente: ácido mirístico 3%, palmítico 28%, esteárico 10%, oleico 21% y linoleico 28%. Además contiene 3% de araquídico y 7% insaponificable Norman (1990). En la tabla No 11 se resumen algunos de los componentes del café verde

El grano de café verde se tuesta, adquiriendo con este proceso aroma y sabor característico

El tostado se caracteriza por la disminución de los componentes originales y por la aparición de otros nuevos

En este proceso se distinguen cuatro fases principales

Dsecación

50 °C Primeros cambios en las capas tisulares, y se coagulan proteínas

Crecimiento

100 °C. Por encima de esta temperatura se evapora el agua y se pardean los granos debido a la descomposición térmica y a la pirólisis de los compuestos orgánicos acompañada de destilación seca.

Disgregación

150 °C. Aparecen productos gaseosos (vapor de agua, CO₂, CO)

Tostado completo

180-200 °C. Se inicia la fase de descomposición, caracterizada por el estallido de los granos, además se presenta la producción de humo azulado y la aparición del aroma del café. A continuación se alcanza, con óptima caramelización, el estadio de tostado completo. El dióxido de carbono componente del café tostado es el que contribuye a la calidad de la bebida, ya que le da vigor al sabor de la bebida. Charley (1987)

TABLA No.12 COMPONENTES DEL CAFÉ VERDE

CLASES Y COMPONENTES	SOLUBILIDAD EN AGUA	PORCIENTO EN EL CAFÉ VERDE		
		INDIVIDUAL	TOTAL	SOLUBLE
Carbohidratos			60	
Azúcares reductores	Solubles	1.0		
Sacarosa	Solubles	7.0		
Pectinas	Solubles	<u>2.0</u>		
		10.0		10.0
Almidón	Fácilmente solubilizable	10.0		
Pentosas	Fácilmente solubilizable	<u>5.0</u>		
		15.0		
Hemicelulosas	Hidrolizable	15.0		
Haloceululosas	No hidrolizables	18.0		
Lignina	No hidrolizables	<u>2.0</u>		
		20.0		
Acetes	Insolubles		13	
Proteínas	Depende del % de desnaturalizado		13	4.0
Cenizas	(como óxidos)		4	2.0
Ácidos no volátiles				
Clorogénico	Soluble	7.0		
Oxálico	Soluble	0.2		
Málico	Soluble	0.3		
Cítrico	Soluble	0.3		
Tartárico	Soluble	<u>0.4</u>		
		8		
			8	8.0
Trigonelina	Soluble		1	1.0
Cafeína	Soluble		1	1.0
			100	26.0

Composición del café verde (Base seca aproximada). Moffat. (1986)

El tostado es un proceso en el cual se extrae 10 a 12 % de humedad seguido por una caramelización de la sacarosa y una pirólisis final de los carbohidratos y proteínas. Dependiendo de la temperatura final de los granos tostados, casi siempre cercanas a 202°C, hay un 16% de pérdida de peso de los granos verdes al tostar. Se desprende humedad, aceite, dióxido de carbono, carbon y 1.2% de cafeína, constituyente amargo que le da a la bebida su efecto estimulante. Charley (1987)

El tiempo y la temperatura, pero más que nada el color del grano tostado se utiliza para establecer el punto final del tostado que corresponde al sabor deseado. Es necesario hacer un enfriamiento brusco para detener con rapidez la pirólisis y con frecuencia se utiliza un rocío de agua antes del enfriado con aire. Norman (1990)

El tostado da lugar a dos tipos de cambios en la cereza verde de café.

Los cambios estructurales. Esto hace al café tostado ligero y poroso.

Los cambios químicos.

Algunos de éstos liberan o forman compuestos en el grano que influyen en el sabor, aroma y apariencia del extracto. El color del grano, que depende del grado de tostado, por supuesto, afecta el color de la bebida. Los carbohidratos caramelizados contribuyen al color de la bebida. Charley (1987)

El café tostado contiene azúcares reductores, azúcares caramelizados, hemicelulosa, fibra, proteína, ácidos no volátiles (caféico, clorogénico, cítrico, málico, oxálico, quínico, tartárico), Cafeína, aceite, trigonelina y las cenizas en las cuales los principales elementos que existen son potasio, fósforo y magnesio. Los productos volátiles que provienen de la pirólisis de las proteínas tienen cierta importancia en relación a los sabores del café. La metionina y la cisteína se han identificado junto con el indol y el triptofano. Los compuestos volátiles son numerosos, tales como ácidos, alcoholes, aldehídos (que predominan), diacetilo, furfural, sulfuro de hidrógeno, cetonas, mercaptanos y fenoles en la Tabla No 12 se resumen algunos componentes del café tostado. Belitz (1988), Meyer & Ruiz (1977), Person (1988)

Los granos de café tostado se enmohecen en aire a temperatura ambiente durante 10 a 14 días. El enmohecimiento se debe principalmente a la oxidación de los aldehídos y otros productos químicos en el café que se acentúa por la pérdida de productos aromáticos. El empaque al vacío sacrifica aún más esta pérdida de sustancias aromáticas, así como la frescura o calidad, aunque esta pérdida es comercialmente tolerable. Norman (1990)

Los ácidos cuantitativamente más importantes del café son los ácidos clorogénicos, la degradación de estos trae como consecuencia la formación de compuestos aromáticos entre los que destaca el fenol.

Dos de los ácidos encontrados en el café tostado son compuestos fenólicos. Uno de éstos es el ácido caféico. El otro es el ácido clorogénico, tal como se muestra en la Figura No. 18 este es el principal constituyente soluble en el café, es una sustancia algo ácida y ligeramente amarga, ya que pertenece al grupo de las Antoxantinas. Charley (1987).

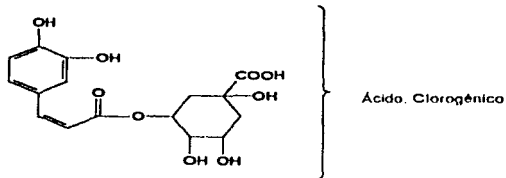


Figura No 18 Ácido Clorogénico uno de los más importantes encontrados en el café tostado

TABLA No 13 COMPOSICIÓN DEL CAFÉ TOSTADO*	
COMPONENTE	CANTIDAD (%)
Agua ¹	2,5
Proteína ¹	9
Polisacáridos, insolubles en agua	24
Polisacáridos, solubles en agua	6
Sacarosa	0,20
Glucosa, Fructosa, Arabinosa	0,10
Lípidos	13
Ácido fórmico	0,10
Ácido acético	0,25
Ácidos no volátiles	0,40
Ácidos clorogénicos	3,7
Calcina	1,2
Tronelina	0,4
Ácido nicotínico	0,02
Sustancias aromáticas volátiles	0,1
Minerales (cenizas)	4 ¹
Componentes sin identificar	35*

* Café arábica, tostado normal

¹Expresado como suma de aminoácidos tras hidrólisis ácida, son hidrosolubles el 1,5%.

²Ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico.

³Son hidrosolubles el 3,5%

⁴Son hidrosolubles el 7,5%

Los substratos fenólicos en las frutas y hortalizas intervienen en el fenómeno de pardamiento enzimático, la estabilidad de muchos alimentos depende de la presencia de ciertos compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes naturales

El fenilpropano es la unidad estructural principal de la lignina, una sustancia fenólica macromolecular, que es constituyente principal de las paredes celulares en los vegetales.

Los taninos son polifenoles de alto peso molecular, que desnaturalizan las proteínas precipitándolas y son responsables de la astringencia de muchos alimentos

El ácido gálico es uno de los mas importantes constituyentes de los taninos y sus ésteres se encuentran ampliamente difundidos

Los Taninos se Clasifican en dos Grupos

Los taninos hidrosolubles

Son poliésteres de azúcares con ácido gálico (galotaninos), o ácido elágico, (elagitaninos) estos se pueden observar en la Figura No 19

El componente de hidrato de carbono suele ser D- glucosa

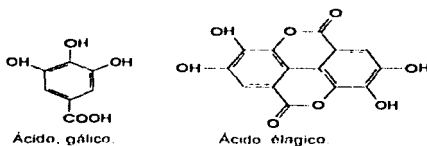


Figura 19 Taninos hidrosolubles

Los taninos condensados Se forman por polimerización de los flavan 3-oles (catequinas) o flavan-3-,4-dioles (antocianidinas) Behitz (1988)

Otros ácidos orgánicos encontrados en el café tostado incluyen el cítrico, málico, tartárico y cantidades algo más pequeñas de, oxálico. Estos ácidos son fácilmente extraídos del café tostado, lo que explica por qué el sabor del café débil es predominantemente ácido. Ahora se considera que el envejecimiento del café molido está relacionado con la pérdida de constituyentes volátiles del aroma, la cual se acelera al aumentar la humedad y no tanto a causa de rancidez del aceite de café Charley (1987), Person (1988)

En la torrefacción, se asegura que la mayoría de los componentes del sabor y aroma del café-bebida provienen de la oxidación y desdoblamiento que muchos de los componentes originales del café sufren durante esta operación, mismos que serán extraídos por cualquier método extractivo con mayor facilidad que del café verde, debido al aumento del volumen del grano, a la apertura de poros y al arrastre que muchas sustancias sufren por la humedad saliente. Cabe mencionar que la cafeína no sufre alteración alguna y disminuye su proporción en forma poco apreciable, por lo que puede ser extraída de esta etapa en forma más sencilla, sin embargo, obvio es decir que el café torrado constituye en sí mismo un producto sumamente valiosos como materia prima del café bebida y sufrirá cuantiosa pérdida en sabor, aroma, color y textura con la descafeinación, por lo que sería imposible su utilización posterior

APÉNDICE III:

MÉTODOS.

III.1 MÉTODO MICRO KJELDAHL.

FUNDAMENTO:

Determinación de Nitrógeno total orgánico (nitrógeno amino, amido y aminoácidos) y no proteico (nitrógeno inorgánico) por la oxidación de proteínas y materia orgánica con H_2SO_4 . Fijándose en nitrógeno con sulfato de amonio, el cual se cuantifica por su desprendimiento en forma de amoníaco al reaccionar con una base fuerte

VENTAJAS:

Método común de comparación

Determina todo el contenido de nitrógeno en una muestra alimenticia

DESVENTAJAS:

Puede haber pérdidas de nitrógeno

El contenido de nitrógeno puede variar con la proteína

Presenta factores que afectan a la determinación si no son controlados

Efecto de la temperatura durante la digestión, la recuperación cuantitativa de nitrógeno depende de la temperatura siendo la óptima de $500^{\circ}C$.

Influencia del catalizador, debe ser eficaz en la descomposición del material. El óxido de mercurio causa menos pérdidas que los reactivos de selenio y cobre. Recientemente se encontró que el titanio puede sustituir al mercurio, el cual no es tóxico y es de menor costo.

Causas de pérdidas en la digestión cuando una muestra tiene baja concentración de nitrógeno, grandes cantidades de carbohidratos, grasas y otras sustancias dificultan la digestión además si el álcali no es suficiente para liberar todo el amoníaco habrá pérdidas de nitrógeno

Presenta factores que afectan a la determinación general. Cantidad de ácido y de muestra, facilidad de descomposición, velocidad de calentamiento, tiempo de digestión y tiempo de aclaramiento.

PROCEDIMIENTO:

1. Se pesaron 200 mg de sulfato de cobre, mas 100 mg de sulfato de sodio anhidro y 0.100 mg de muestra los cuales se colocaron en matraces de destilación Kjeldahl, a estos se les añadió 2 ml de ácido sulfúrico concentrado
2. Se digieren las muestra, antes del punto de ebullición, y hasta que cesó la formación de espuma por aproximadamente 2 horas. La temperatura se incremento hasta ebullición y se suspendió cuando la muestra no presentó ningún punto negro. La digestión se consideró completa hasta que la muestra se tornó azul o verde claro
3. La solución digerida se transfirió a un aparato de destilación, esta se adicionó con 20 ml de hidróxido de sodio al 40%, lo que provocó la liberación de amoníaco el cual se

burbujeo a una solución de 50 ml de ácido bórico al 4% la cual contenía una solución indicadora de rojo de metilo y verde de bromocresol, en proporción (1:4), y se valoró con ácido clorhídrico al 0.1N

- 4 El cálculo del % de cafeína se realizó en base a lo reportado en la literatura, de la siguiente manera

$\% = (\text{ml del ácido}) (\text{Normalidad del ácido}) (0.014 \text{ meq de Nitrogeno}) 3.464 (100) / \text{g de muestra}$

Factor para la Cafeína = 3.464

Cabe destacar que en este método se adicionaron un promedio de 100 mg de Cafeína estándar para determinar el porcentaje de recuperación

II.2 PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO A.O.A.C.

El comportamiento de este método en las muestras tratadas provocó la formación de emulsiones duraderas lo cual hace que se alargue enormemente el proceso de extracción.

Para café soluble 100% puro, con 30% azúcar y descafeinado se pesaron (250.0 mg), en cada caso se hicieron diluciones, las cuales se presentan a continuación

1. Café descafeinado 250.0 mg en 10 ml
2. Café soluble 100% puro y con 30% azúcar 250.0 mg en 50 ml de agua destilada, de esta solución se colocó una alícuota de 5 ml la cual se diluyó a 10 ml con agua destilada

En el caso de café de grano 500.0 mg se calentaron con 150 ml de agua destilada y se percolaron hasta la obtención de 120 ml, de esta solución se colocó una alícuota de 20 ml en un matraz volumétrico de 50 ml llevando al aforo con agua destilada

Para determinar el porcentaje de recuperación se utilizó 1 mg de cafeína en todos los casos

1. Una alícuota de 10 ml de muestra, se colocó en un embudo de separación a este se le añadió 5 ml de permanganato de potasio al 1.5% y se dejó reposar por espacio de 5 minutos
2. Se agregó 10 ml de una solución que contiene sulfato de amonio 5% - tiocianato de potasio al 5%, así como 1 ml de ácido fosfórico al 15% y 1 ml de hidróxido de sodio al 25%
3. Se extrajo primeramente con 50 ml de cloroformo y después con 40 ml lavando en cada caso el papel filtro, y se llevó al aforo de 100 ml con cloroformo
4. Se toma la lectura a 276 nm .

La concentración de Cafeína presente, en la muestra fue interpolada y determinada con base a una curva estándar

Uno de los métodos más conocidos para la determinación de cafeína es el de Bailey Andrew del A.O.A.C. No 15.019 el método de se basa en la determinación del nitrógeno total de la muestra, el inconveniente es que ese nitrógeno determinado puede provenir de

las proteínas y de otras sustancias nitrogenadas no proteicas, que se encuentran presentes en el grano de café

Otro método del A.O.A.C. es el cromatográfico - espectrofotométrico No 15 020, que consiste en la separación del compuesto por medio de columnas cromatográficas (una ácida con ácido sulfúrico y Celite 545 y una básica con hidróxido de potasio y Celite 545). Se pasa una muestra de café, primero por la columna básica y luego por la columna ácida, se colecta la muestra en un matraz volumétrico que se afora con agua y luego se lee en un espectrofotometro a 276 nm contra un estándar de cafeína. Este método basado en la absorción de la luz ultravioleta por los alcaloides es muy complicado, tiene muchas manipulaciones debido a la preparación de las columnas y a la separación y obtención de las muestras en las columnas

III.3 PROCEDIMIENTO MÉTODO SIN DERIVAR.

PARA CAFÉS SOLUBLE 100% PURO , SOLUBLE CON 30% DE AZÚCAR Y SOLUBLE DESCAFEINADO

Se pesaron 70 mg de café, los cuales se diluyeron con agua destilada a 50 ml, 1 ml de esta solución se coloco en un matraz aforado de 10 ml, al cual se le añadió 0.5 ml de hidróxido de sodio 0.05M, y se aforó con agua destilada

PARA CAFÉ DE GRANO.

Se pesaron 5000.0 mg de café, los cuales se calentaron con 150 ml de agua destilada y se percolaron hasta la obtención de 120 ml, de esta solución se colocaron 20 ml en un matraz volumétrico de 50 ml y se diluyo con agua destilada, en un matraz aforado de 10 ml se coloco 1 ml de esta solución más 0.5 ml de hidróxido de sodio 0.05M, y se aforó con agua destilada

Para determinar la concentración de cafeína fue necesario

EN LOS SIGUIENTES MÉTODOS :

SDCNaOH 299 nm y SDCNaOH 290nm:

- Contar con una Curva Estándar de Cafeína en presencia de NaOH 0.05M a una longitud de onda de 299 nm y 290 nm

En el caso de SDCNaOH 299 nm y SDCNaOH 290nm se realizaron extracciones a cada uno de los casos, estas se hicieron cuatro veces con 5 ml de cloroformo cada