

DETERMINACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA CAFEÍNA EN EL PROCESO DE TORREFACCIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

DETERMINATION AND STANDARDIZATION OF A METHOD FOR CAFFEINE IN THE ROASTING PROCESS CHROMATOGRAPHIC HIGH PERFORMANCE LIQUID (HPLC)



Rubiano Jesús A.¹, Zuluaga Domínguez Carlos Mario²

¹ *Café Colonial S.A.S., Ibagué, Colombia, janton936@gmail.com*

² *Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimento, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, carlosm493@gmail.com*

Recibido: 15/11/2011 • Aprobado: 15/12/2011

RESUMEN

El trabajo realizado en la organización Café Colonial S.A.S. consistió en evaluar, analizar y verificar información clave para la determinación y estandarización de un método para cafeína en el proceso de torrefacción por la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

Se realizaron diferentes ensayos al proceso de torrefacción hasta obtener las condiciones adecuadas de las muestras, apoyados en fenómenos de transporte como, energía, fluidos y calor, además de seguir los lineamientos de la Norma Técnica Colombiana NTC ISO 2859-1.

Con el fin de obtener una recta patrón, importante para interpolar las muestras de café, se preparó una solución con cafeína (Sigma-Aldrich, reactivo analítico) y agua Milli-Q (Merck Millipore 40 ppm), con miras a obtener una solución patrón; a partir de la solución de cafeína, se prepararon 5 soluciones más por microgramos de cafeína por mililitro.

Para determinar la fase móvil más adecuada, se empezó a ensayar con diferentes muestras de cafeína de café con la misma fase móvil agua- acetonitrilo en diferentes proporciones; una vez realizadas todas las pruebas necesarias y de acuerdo con los resultados obtenidos, la fase móvil que permitía una mejor separación e interacción con la fase estacionaria fue la compuesta por agua-acetonitrilo en proporción 20:80.

Después de obtener la recta patrón y la fase móvil más adecuada, se realizaron diferentes inyecciones, obteniéndose cromatogramas con bases y picos definidos, con lo que se precisó el coeficiente de

correlación, dando una linealidad cercana a uno; después de esto, el paso siguiente fue hallar el área bajo la curva para poder definir la concentración de la cafeína de las muestras y así poderlo expresar en porcentaje.

Palabras clave: *cafeína, estacionaria, fase cromatogramas, fase móvil, solución patrón, torrefacción*

ABSTRACT

The work done in the organization. COFFEE COLONIAL.SAS was to evaluate, analyze and verify key information for the identification and standardization of a method for caffeine in coffee roasting process by the technique of chromatography high performance liquid (HPLC).

Assays were performed at different roasting process to get the right conditions for the samples, supported by transport phenomena such as, energy, fluids and heat, in addition to following the guidelines of the Standard ISO 2859-1 Colombian NTC.

To obtain a standard curve, leading to interpolate coffee samples, prepare a solution with Caffeine (Sigma-Aldrich, Analytical Reagent) and Milli-Q water (Millipore Merck 40 ppm), to obtain a solution pattern, from the solution of caffeine more solutions were prepared by 5 micrograms per milliliter caffeine.

To determine the most suitable mobile phase, it began testing different samples of caffeine of coffee with the same water-acetonitrile mobile phase in different proportions, once all the necessary tests and according to the results obtained, the mobile phase allow better separation and interaction with the stationary phase was composed of water-acetonitrile mobile phase in 20:80 ratio.

After obtaining the calibration curve and the more appropriate mobile phase, where injections were made different chromatograms were obtained with bases and defined peaks, which are defined by giving a correlation coefficient of linearity close to one, after which the next step was to find the area under the curve to define the caffeine concentration of the samples and thus being able to express in percentage.

Keywords: *caffeine, chromatograms, mobile phase, roasting, standard solution, stationary phase*



I. INTRODUCCIÓN

El café en Colombia, más que un producto agrícola de exportación, es ante todo un tejido social, cultural, institucional y político que ha servido de base para la estabilidad democrática y la integración nacional. Se estima que el cultivo del café, aporta 800 mil empleos directos anualmente, equivalentes al 40% del empleo del sector agropecuario. Caldas es considerado uno de los departamentos más productivos de café en Co-

lombia, ubicándose en los primeros puestos por cantidad y calidad. El cultivo del café, es de gran importancia para la economía del país, por tanto, cualquier problema fitosanitario que se presente, podría afectar significativamente a este sector agrícola [1].

Sobre la cafeína podemos decir que tras décadas de investigación, la comunidad científica no ha concluido que exista relación entre su



consumo y los riesgos para la salud. Al ser una sustancia de consumo ampliamente aceptado y generalizado, este, en forma excesiva, podría pasar inadvertido. Cuando la ingesta de cafeína se presenta en intervalos regulares, se genera una tolerancia a la sustancia, lo cual puede ocurrir en horas o días. Esto hace que el efecto que tiene la cafeína sobre los diferentes parámetros dependa de la cantidad que se consuma habitualmente [2]. En Estados Unidos, el consumo promedio es aproximadamente de 200 mg/día, aunque el 20-30% de los adultos estadounidenses superan los 500 mg/día. Las fuentes más consumidas de cafeína son el café, las gaseosas colas, chocolate y remedios prescritos o no prescritos [3]. Otro estudio con población norteamericana revela una ingesta de 4 mg/Kg peso [4].

La industria del café cuenta con diferentes líneas de producción, entre otras, el café tostado es el producto bandera. Con el ánimo de explorar nuevos mercados y aumentar las ventas Café Colonial S.A.S, ha querido determinar el porcentaje de cafeína en todos los procesos, ya que actualmente no existe un programa trazable para cuantificarlo a lo largo de las diferentes etapas de producción, aspecto importante para el cumplimiento de la normatividad nacional e internacional. La cuantificación de la cafeína se realiza por la técnica de Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en el proceso de torrefacción, para así poder realizar trazabilidad y determinar la pérdida de cafeína en los procesos de torrefacción, lixiviación, evaporación y secado; además de hacer avances importantes en la validación de la metodología para aplicar directamente en empresas involucradas en el sector cafetero.

II. PRODUCCION DE CAFÉ

A. Características

El café es una bebida de carácter universal que se consume en todos los países del mundo. Sin embargo, como grano, es una semilla que procede del árbol o arbusto del cafeto, pertenecien-

te al género *Coffea* de la familia Rubiácea, Este produce flores de color blanco que, a su vez, originan frutos de color rojizo. La parte interior del fruto contiene dos semillas o granos de café. Hay algunas especies de cafetos que solo producen una única semilla por fruto, y se conocen como “café perlado”. Los granos de café o semillas son la parte del fruto que contienen más cafeína.

El café es originario de Etiopía, África Oriental, exactamente del territorio denominado «Kaffa», de donde se deriva su nombre. En la edad media, el arbusto producía unas semillas aromáticas que los marineros africanos llevaron a la península de Arabia, país en el que se originó el cultivo del café. Desde Arabia, los peregrinos que se dirigían a la Meca lo llevaron a Europa; allí su consumo tardó bastante en ser aceptado y extenderse, tal vez a causa de su color negro [5].

B. Composición

En el café tostado se han identificado más de 700 sustancias volátiles, las cuales corresponden a cerca del 0,1% del total de la materia [6]. Las características químicas y el aroma de los constituyentes volátiles del café han sido motivo de importantes estudios; hoy en día, se conocen cientos de aromas, que según los expertos superan a los del vino [7]. El café también posee gran cantidad de contaminantes y sus concentraciones dependen de múltiples factores que intervienen en la selección, preparación y tostado del grano. Entre ellos, se encuentran las parafinas, [8] 7 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), trazas de N-nitrosaminas (Nnitrosopirrolidinas- NPYR) [9], aminas heterocíclicas, residuos de pesticidas como organoclorados, organofosforados y micotoxinas [10].

C. La cafeína

Presente en hojas, semillas y frutos de más de 63 especies vegetales de todo el mundo, en su estado puro, es un polvo blanco muy amargo. Químicamente, es una xantina que se absorbe en el tracto gastrointestinal y rápidamente se difunde hacia la sangre y los tejidos. A nivel hepático

y por acción enzimática, esta especie química (trimetilxantina) se degrada en tres metabolitos: paraxantina, teobromina y teofilina, por lo que se pueden alcanzar altos picos de concentración a la hora de consumirla. Se excreta a través de la orina y solo un 3-10% lo hace en forma inalterada. Por sus características lipofílicas atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y la placenta, hallándose también en la leche materna. A nivel celular, la cafeína compite directamente con los receptores de adenosina, nucleósido que actúa como vasodilatador local, e interviene sobre dos receptores diferentes: los receptores A1, de alta afinidad, que inhiben la enzima adenilato ciclasa disminuyendo las concentraciones de AMPC, y los receptores de baja afinidad (A2) que aumentan el AMPC al estimular esta enzima. Por ello, los efectos de la cafeína no se limitan sobre un solo órgano, sino que se presentan por todo el cuerpo, incluyendo el cerebro, el corazón y los vasos sanguíneos, el tracto respiratorio, los riñones, tejido adiposo, y el tracto gastrointestinal [2].

D. Procesamiento del café verde

Inicialmente, los granos de café verde se incorporan al proceso de torrefacción. Cuando llegan a su destino, se tuestan, lo que desarrolla su aroma y les da su color oscuro. En algunos países, el tueste se realiza añadiendo hasta un 15% de azúcar, en cuyo caso el proceso se denomina torrefacción; el café resultante, café torrefacto, es de un sabor algo más vigoroso, y sus granos son de brillo aceitoso, a consecuencia del caramelo depositado. A continuación, los granos se muelen y con el tueste, duplican su tamaño. Al principio de la aplicación del calor, el color de los granos verdes pasa a amarillo, luego a marrón canela. Es en ese momento, cuando el grano pierde su humedad. Cuando la temperatura en el interior alcanza alrededor de 200 °C, salen los aceites de los granos.

En general, cuanto más aceite hay, más sabor tiene el café. Durante el tueste, los granos se agrietan de una forma similar a la de las palomitas de maíz que explotan bajo calor. Hay dos momentos de «explosión» que se utilizan como indicadores del nivel de tueste alcanzado.



Fuente: <http://kafelondon.blogspot.com/2010/05/nivel-de-tueste-del-cafe.html>

Fig. 1 Niveles de tueste: rubio, canela, medio, ropa de monje, marrón, marrón oscuro, italiano (o seminegro), francés (negro).

Los granos se vuelven más oscuros y liberan aún más aceite hasta que finaliza el tueste, y se retiran de la fuente de calor. Hasta el Siglo XIX se compraban los granos verdes y su tostado se hacía en estufa. En 1900 la empresa *Hill Brothers* inventó el envasado en vacío de café tostado, con el fin de conservar el sabor y el aroma por más tiempo. Esto cambió la forma de consumir café y sentenció la vida de las tostadoras locales [6].

III. TECNICAS DE ANALISIS

A. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

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

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

se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. El fluido que entra por la columna se llama eluyente. El que sale por el extremo de la columna se llama eluato [11].

B. Materiales y métodos

El método a usar para cuantificar la cafeína en el proceso de torrefacción es la técnica de Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC), la NTC ISO 20481 y la NTC ISO 17025 para encontrar la fase móvil más adecuada para la cuantificación de cafeína.

C. Selección de la muestra

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

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

IV. METODOLOGIA

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

Se tomaron mediciones a partir de dos grupos distintos; por ejemplo, 50 muestras elegidas al azar recibieron un tratamiento y para las otras 50 se utilizó el método de la NTC ISO 20481 y la

NTC ISO 17025; así, se obtuvo los dos tratamientos independientes.

V. MUESTREO

Para el plan de muestreo se tomó como referencia la NTC ISO 2859-1 que determina los procedimientos correspondientes, para inspección por atributos; esta norma proporciona un límite superior para el riesgo del consumidor al no tener un lote diferente u ocasional. En este caso es necesario remitirse a la tabla 1, Letra código del tamaño de la muestra, A (2 y 8) con un nivel de inspección II. Se tomaron 2 muestras compuestas por día durante 16 días de producción de cafés naturales de un tuste marca (PROBAT).

TABLA I
COMPOSICIÓN DE LOS GRANOS DE CAFÉ
TOSTADO MEDIO (PORCENTAJE EN BASE SECA)

Componentes	Especie	
	Arábica	Canephora
Cafeína	1,3%	2,4%
Minerales	4,5%	4,7%
Proteínas	10%	10%
Ácidos alifáticos	2,4%	2,5%
Ácidos clorogénicos	2,7%	3,1%
Carbohidratos	38%	41,5%
Lípidos	17%	11%
Trigonellinas	1%	0,7%
Aromas volátiles	0,1%	0,1%
Melanoidinas	23%	23%

Fuente: Viani, 1991

A. Preparación de las muestras patrón

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

B. Muestras de café para ser inyectada

Se pesaron aproximadamente 100 g de café y se pusieron a reflujo con 200 ml de agua Milli-Q durante 15 minutos. Posteriormente, se filtró la

solución al vacío en caliente y se añadieron 5 g de carbonato de sodio Na_2CO_3 hasta la total disolución. Se dejó enfriar y se agregaron 15 ml de cloroformo $CHCl_3$ que se extrajo agitando suavemente durante unos minutos; se repitió este procedimiento una vez más. A continuación, en un matraz de fondo redondo se introdujeron las dos fases orgánicas recolectadas de las dos extracciones anteriores. Se añadieron pequeñas cantidades de sulfato de sodio Na_2SO_4 para absorber el agua y se dejó en baño maría por un espacio de 30 minutos. Una vez separada la glucosa y los demás componentes de la cafeína, se extrajo con una jeringa con un filtro micro poroso el cual eliminó el total de los sólidos suspendidos quedando la muestra lista para ser inyectada en el HPLC.

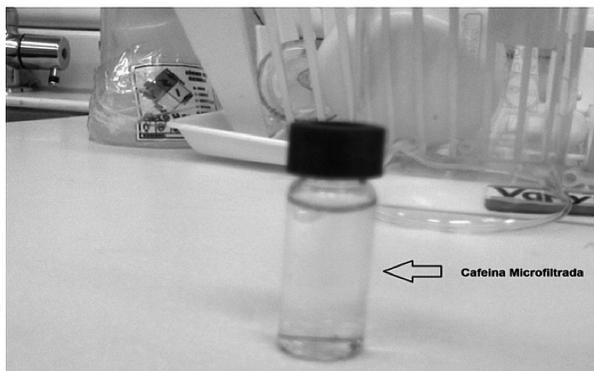


Fig. 2 Muestra lista para ser inyectada

VI. EQUIPOS

- Unidad de purificación de agua para laboratorios ELGA, *Purelab Classic*.
- Balanza analítica Mettler, AB-104-S
- Estufa Selecta, *Digitheat*.
- Reactivos: cafeína (Sigma-Aldrich, reactivo analítico)
- Agua Milli-Q (*Merck Millipore*).
- Ácido clorhídrico 0,01 M.
- Equipo de filtración de HPLC
- Cubetas (o celda) de cuarzo para espectrofotómetro UV
- Equipo de reflujó.
- Filtros de jeringa HPLC.

VII. ANÁLISIS DE DATOS

A. Determinación y cuantificación de cafeína

Se presenta el desarrollo y puesta a punto de una metodología analítica por espectrofotometría UV-VIS para determinar y cuantificar la cafeína. Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del principio activo por evaluar, así como el disolvente utilizado para la preparación de las muestras, se decide realizar espectros UV en el rango de longitudes de onda entre 300 y 190 nm ya que teóricamente a 273 nm, la cafeína presenta un máximo de absorción.

En la puesta a punto del método espectrofotométrico se pensó empezar a ensayar con las soluciones patrón y las soluciones de cafeína de café obtenidas mediante extracción, con el fin de poder comparar las concentraciones de cafeína y, así, conocer las cantidades necesarias de café para realizar la extracción: *Patrones: 10, 20, 40, 60 y 80 pm.*

La preparación de las soluciones diluidas con 10, 20, 40, 60 y 80 microgramos por mililitro de cafeína se puede encontrar ampliamente detallada en la NTC ISO 20481. Una vez preparados los patrones y efectuada la recta de calibrado que relaciona concentraciones y valores de absorbancia, se observó que el rango de concentraciones no era el adecuado, ya que a partir de los 20 ppm no se cumplía con la ley de Beer, la cual indica que tiene que haber una relación exponencial entre la transmisión de la luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia. Se decidió, entonces, disminuir las concentraciones de los patrones: patrones: 4, 8, 16, 24 y 32 ppm. Siguiendo los pasos descritos en la preparación de las muestras patrón, se prepararon soluciones diluidas con 4, 8, 16, 24 y 32 microgramos por mililitro de cafeína.

Una vez preparados los patrones y efectuada la recta de calibrado, se observó que las concentraciones eran óptimas, ya que en ese rango se

cumplía la ley de Beer. Se realizaron una serie de pruebas para garantizar la recta que mejor se ajustara a los datos experimentales.

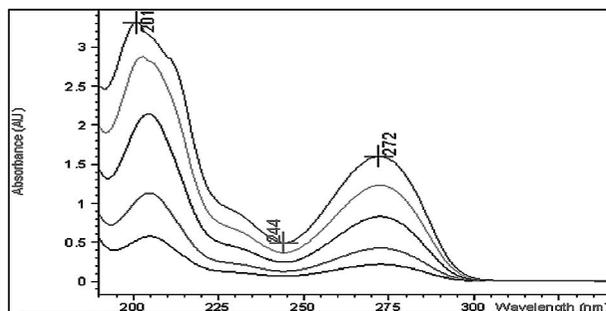


Fig. 3 Espectro de las muestras patrón de la cuarta prueba.

VIII. RESULTADOS

Para la identificación y cuantificación de la cafeína se prepararon las muestras tal y como se indica anteriormente. Dentro de las muestras de café, se han analizado varias, según sus características. Las soluciones después de la extracción se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y por espectrofotometría UV, hallándose de esta manera la concentración de cafeína presente en cada una de las muestras. A partir de los resultados obtenidos en la puesta a punto del sistema cromatográfico, se definió que la fase móvil que permitía una mejor determinación cuantitativa de la cafeína era la compuesta por agua-acetonitrilo en proporción 20:80.

Se empezó a inyectar las soluciones patrón realizadas nuevamente y las soluciones de cafeína obtenidas por extracción en las diferentes muestras de cafés. Se inyectaron 20 μ l de muestra (volumen del loop de inyección) con una velocidad de flujo de fase móvil de 1 ml/min con elución de modo isocrático y a temperatura ambiente. Las soluciones patrón de cafeína con concentraciones, 4,00 ppm, 8,00 ppm, 16,00 ppm, 24,00 ppm y 32,00 ppm se inyectaron por separado en el sistema cromatográfico y se registraron los siguientes cronogramas (se muestran el primero y último cromatograma de las inyecciones).

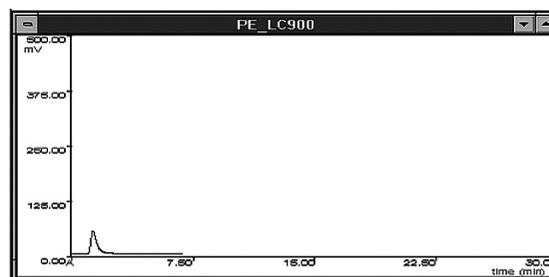


Fig. 4 Cromatograma de la solución patrón 4 ppm.

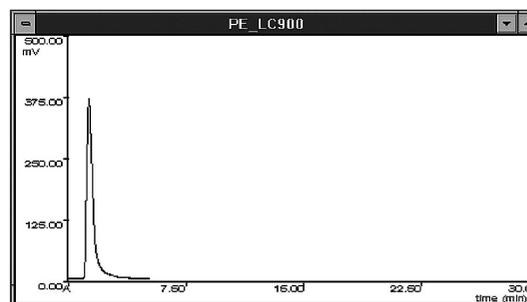


Fig. 5 Cromatograma de la solución patrón 32 ppm.

A. Determinación de la concentración de cafeína de cada muestra.

Se utilizó la recta de calibrado obtenida, la cual relaciona concentraciones de cafeína (abscisas) y áreas de pico (en ordenadas), para interpolar en ella las áreas de cada pico, correspondientes a cafeína (aprox. $t_r = 1,28$ min), en las diferentes muestras, y así conocer su concentración. En la tabla 2 se muestran los resultados de las inyectadas de las soluciones patrón.

TABLA II
CONCENTRACIONES PATRÓN DE
CAFEÍNA Y SUS ÁREAS

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

En la Fig. 6 se representan gráficamente las áreas obtenidas con las soluciones patrón, frente a sus correspondientes concentraciones (ppm).

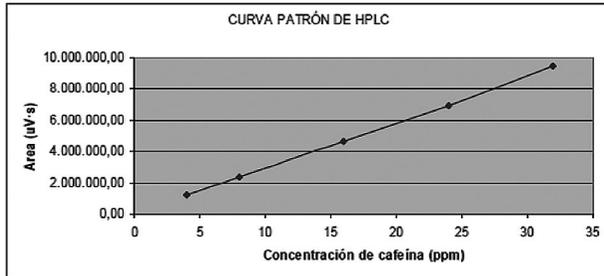


Fig. 6 Curva de calibrado obtenida con HPLC.

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

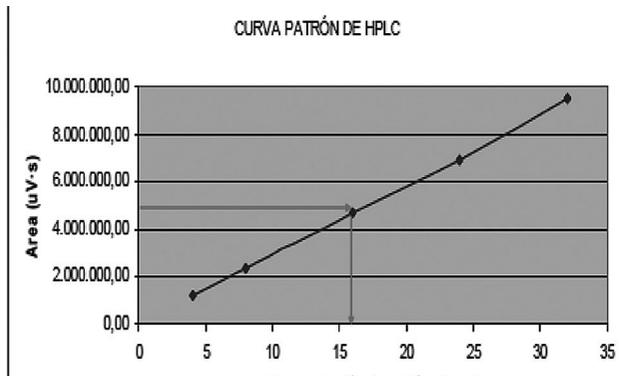


Fig. 7 Interpolación de solución patrón en la curva de calibrado

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

$$Y = 294.506 * x - 22.523 \quad R^2 = 0.99940061 \quad (1)$$

Así, la ecuación obtenida en la curva de calibrado es:

$$Y = m * x + b \quad (2)$$

Donde:

Y: Área

M: Pendiente de la curva de calibrado.

X: Concentración de cafeína de las muestras inyectadas (ppm).

B: Ordenada en el origen de la curva de calibrado.

A partir de las áreas de los cromatogramas obtenidos y con la ecuación de la curva de calibrado, se conoce la cantidad de cafeína contenida en las muestras de café. En los cálculos para cuantificar la cantidad de cafeína en café tostado, se utilizaron todos los valores de las áreas resultantes de las diversas muestras de café inyectadas, a excepción de los valores de áreas que despreciamos, ya que se consideró que pudo haber pérdidas en el proceso de extracción. Se puede observar la totalidad de los resultados obtenidos de las diferentes muestras de cafés, así como los resultados tabulados.

En la tabla 3 se representan las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos de las muestras de cafeína y los tiempos de retención de las diferentes inyectadas realizadas.

TABLA III
MUESTRAS DE CAFEÍNA DE CAFÉ, TIEMPO DE RETENCIÓN Y ÁREAS

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

La concentración del café tostado se desarrolla con los resultados obtenidos de todas las extracciones.

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

Área media del café tostado (uV·s) = **3.155.682,75**

$$Y = 294.506 * x - 22.523 \quad (3)$$

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

$$3.155.682,75 = 294.506 * x - 22.523 \quad (4)$$

Despejando x se obtiene la concentración de cafeína por HPLC que es igual a: 10,79 ppm.

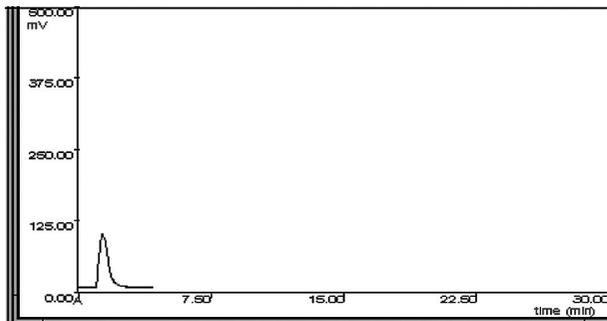


Fig. 8 Cromatograma de la muestra de cafeína de café tostado.

Cálculos para la determinación del porcentaje de cafeína de las diferentes muestras analizadas

Una vez establecidas las áreas de cada una de las muestras, se determinó la concentración de cafeína, en tanto por ciento (%).

En los cálculos iniciales se supuso que los cafés contenían un 1,2 % de cafeína y se trabajó pesando 300 mg de café. Se procedió a determinar la cantidad de cafeína hallada mediante las áreas de los picos correspondientes a la cafeína en los distintos cromatogramas obtenidos, y, posteriormente, se determinó el porcentaje.

Datos:

Peso de café = 300 mg

Solución A = mg cafeína extraída / 100 ml agua MilliQ

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

$$100mlsol(A) * \frac{25mlsol(B)}{10mlsol(A)} * \frac{3,03mgcafeina(encafe)}{1000mlsol(B)} = 0,7575cafeina(encafe)$$

Se halla el porcentaje:

$$\frac{0,7575cafeina(encafe)}{300mg(decafe)} * 100 = 0,25\%$$

Por lo tanto, se estaría hablando que el café tostado posee una concentración real de 0,25% de cafeína.

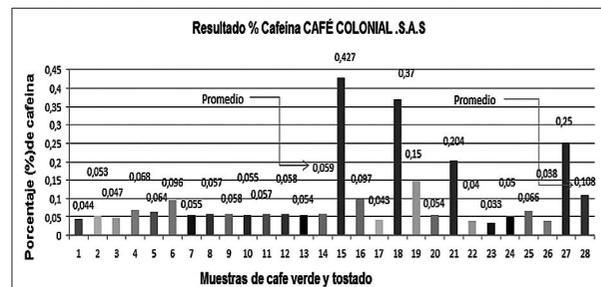


Fig. 9 Representación de la concentración de cafeína en % de todas las muestras analizadas

V. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la puesta a punto del sistema cromatográfico, se definió la fase móvil que permitía una mejor determinación cuantitativa de la cafeína: la compuesta por la fase móvil agua-acetonitrilo en proporción 20:80. Con las áreas de los cromatogramas obtenidos y la ecuación de la curva de calibrado, se obtuvo la cantidad de cafeína contenida en las muestras en proporción de 10.75 ppm en café tostado con un promedio del 0.11%.

Al terminar el trabajo se comprobó que se han conseguido resultados parciales importantes para la estandarización y cuantificación de cafeína; a pesar de esto, son resultados significativos

para intentar establecer una comparación entre el método de la NTC ISO 20481 y la que busca la organización Café Colonial S.A.S; sin embargo, para realizar una validación es necesario realizar nuevos ensayos.

REFERENCIAS

- [1] P. S. Baker.. "La broca del café en Colombia; Informe final del proyecto MIP para el café" DFID – Cenicafé – CABI Bioscience (CNTR 93/1536 A).Chinchiná (Colombia), DFID. 154p., 1999.
- [2] T. Chou, "Wake up and smell the coffee-Caffeine, coffee, and the medical consequences." West J Med; 157: 544-553, 1992.
- [3] H. Kaplan y B. Sadock., *Sinopsis de Psiquiatría*. 9º Ed., Waverly. Hispanic, 2005.
- [4] J, J. Baronet y H, R. Robert. "Foods and Chemical Toxicology." vol. 34, pp. 119-129, 1996.
- [5] R, S. Peysson..*Historia del café. En el mundo del café*. Barcelona: Ultramar Eds. S.A, 5-21, 2001.
- [6] O. Nishimura y S. Mihara. "Investigation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones in roasted coffee"; J. Agric. Food Chem. vol. 38, pp. 1038-1041, 1990.
- [7] M. Shimoda y T. Shibamoto, "Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with an on-column GC/MS method" Journal Agricola Food Chemistry, vol. 38, pp. 802-804, 1990.
- [8] K. Grob, M. Lanfranchi,, J. Egli y A. Artho « Determination of food contamination by mineral oil from jute sacks using coupled LC-GC" Lebensm Unters Forsch, vol. 193, pp. 213-219, 1991.
- [9] N, P. Sen, y S, W. Seaman, " N-Nitrosamines in dried foods" Journal Association Analytic Chemistry, vol. 64, pp. 1238-1242, 1981.
- [10] J, P. McCarthy, J. Adinolfi and S, L. McMullin. NCA Survey of pesticides residues in brewed coffees. 14Th ASIC Symp: 154-182, 1991.
- [11] S. Mihara, y O. Nishimura, "Chromatogram: Retention indices of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones".J. Hi. Res. 12, pp., 763-764, 1989.

PÁGINAS WEB DE CONSULTA

- [1] arabo@cafearabo.com. (22 de 9 de 2008). Descafeinamiento. Recuperado el 12 de 1 de 2012, de arabo@cafearabo.com: <http://www.cafearabo.com/proceso-descafeinado.html>.
- [2] Fundación Wikimedia, Inc.,. (25 de 7 de 2008). Cromatografía líquida de alta eficacia. Recuperado el 11 de 2 de 2012, de Fundación Wikimedia, Inc.,: http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_de_alta_eficacia.
- [3] Vida media y eliminación de la cafeína. (25 de 9 de 2011). Recuperado el 14 de 04 de 2012, de Wikimedia Foundation, Inc.: [http://www.news-medical.net/health/Caffeine-Pharmacology-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Caffeine-Pharmacology-(Spanish).aspx).
- [4] Baco Café Express. (7 de 7 de 2010). Propiedades fisiológicas del café. Recuperado el 12 de 2 de 2012, de CafeExpressCafe @CafeExpressCafe: http://www.cafeexpress.co/2-café_excelso?gclid=CJS31uivrrECFW1j7AodG2kAYw.
- [5] cafedecolombia.com/publicaciones@scc.org.co. (8 de 3 de 2005). Tueste y torrefacción. Recuperado el 22 de 2 de 2012, de © 2012 Sociedad Colombiana de Cardiología: <http://www.cafedecolombia.com/elcafe.html>.
- [6] CENICAFE. (11 de 7 de 2008). CIENCIA TECNOLOGIA E INNOVACION. Recuperado el 3 de 9 de 2011, de Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafe: <http://www.cenicafe.org/>.
- [7] Cortez, R. D. (13 de 4 de 2007). Cromatografía. Recuperado el 12 de 04 de 2012, de High Performance Liquid Chromatography: [http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Qu es](http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Qu_es).
- [8] Elaboracion del cafe. (14 de 07 de 2010). www.google.com.co. Recuperado el 26 de 12 de 2011, de imagenes elaboracion del cafe: <https://www.google.com.co/search?q=elabor>.
- [9] Fundación Wikimedia, Inc. (09 de 5 de 2010). Fundación Wikimedia, Inc. Recuperado el 9 de 12 de 2011, de Licencia Creative Commons Atribución Compartir Igual 3.0: <http://es.wikipedia.org>.
- [10] Fundación Wikimedia, Inc.,. (3 de 8 de 2011). La química de la cafeína. Recuperado el 29 de 06 de 2012, de Wikimedia Commons: <http://es.wikipedia.org/wiki/Cafe%C3%ADna>.
- [11] Koffie.com.mx. (20 de enero de Derechos reservados 2010 ©). Artículos científicos. Recuperado el 15 de noviembre de 2011, de Webmaster Central Media: <http://www.koffie.com.mx/>.
- [12] PROEXPORT COLOMBIA, PROMOCIÓN DE TURISMO, INVERSIÓN Y EXPORTACIONES. (7 de 10 de © 2009 por Proexport Colombi). Variedades de café de Colombia. Recuperado el 20 de 1 de 2012, de Sitio validado con los estándares del Consorcio W3C: www.proexport.com.co.
- [13] www.CaféCiencia.org. (22 de 2 de 2012). Composición del Café. Recuperado el 15 de 4 de 2012, de Soluciones de Internet y Mercadeo Ltda: <http://www.cafeyciencia.org/index.php>