

Determination of caffeine in coffee by means Fourier transform infrared spectrometry

**Máximo Galignani*, Marifred Torres, Carlos Ayala
y María del Rosario Brunetto**

Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Unidad de Cromatografía & Espectroscopía Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (ULA). Apartado postal 440, Mérida 5101-A, Venezuela. Telf: 58-274-2401375. Fax: 58-274-2714223. maximo@ula.ve

Abstract

In this work a flow analysis-Fourier transform infrared spectrometric (FA-FTIR) method for the determination of caffeine in coffee was developed. The method involves the extraction, in batch, of caffeine from solid samples of roasted coffee with hot water (80°C), on-line retro-extraction of caffeine in chloroform and direct analysis of the organic phase by FTIR spectrometry. The measurement criterion selected for the quantification of caffeine was the absolute peak-valley value (1668-1649 cm^{-1}) of the first order derivate of the absorption spectrum, corresponding to the 1659 cm^{-1} band. The method provides a limit of detection (3σ) of 0.001% (w/v) caffeine, a relative standard deviation corresponding to the whole procedure, until the sample preparation, of 1.2% ([Caffeine] \approx 0.05% (w/v), $n = 5$) and a sample throughput (triplicate) of approximately 12 samples h^{-1} . The method was validated by means of standard addition, recovery and inter-day precision studies and by comparative analysis of real samples with the official chromatographic-spectrophotometric procedure. The method was applied to the analysis of commercial samples, obtaining a caffeine content ranging from 0.60 to 1.16% (w/w).

Key words: Caffeine, coffee, infrared, FTIR, flow analysis.

Determinación de cafeína en café mediante espectrometría infrarroja de transformada de Fourier

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un método para determinar cafeína en café, basado en un sistema de análisis en flujo con detección por espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (AF-IRTF). El método involucra la extracción de la cafeína, fuera de línea, a partir de la muestra de café sólido con agua a 80°C, la retro-extracción de la cafeína –en línea– en cloroformo y el análisis directo de la fase orgánica por IRTF. El criterio de medida seleccionado fue el valor absoluto de la medida pico-valle (1668-1649 cm^{-1}) de la derivada de primer orden del espectro de absorción en la banda de 1659 cm^{-1} . El límite de detección fue de 0,001% (p/v), la desviación estándar relativa del procedimiento completo, desde la preparación de la muestra, de 1,2% ([Cafeína] \approx 0,05% (p/v), $n = 5$) y la frecuencia de análisis real (triplicado), de aproximadamente 12 muestras h^{-1} . El método se validó mediante estudios de adición de estándar, recuperación y precisión entre días; así como por análisis comparativos con el método oficial para el análisis de cafeína en café. Se analizaron 20 muestras comerciales de café tostado, encontrando concentraciones de cafeína en el intervalo de 0,60 a 1,16% (p/p).

Palabras clave: Cafeína, café, infrarrojo, IRTF, análisis en flujo.

Introducción

En la actualidad, el café es uno de los productos alimenticios de mayor importancia a nivel mundial, siendo Venezuela un país productor, exportador; y con un marcado hábito de consumo [1, 2]. El café contiene diversos alcaloides entre los que destaca la cafeína (1,3,7-trimetilxantina), considerada una sustancia psicoactiva que estimula la transmisión de los impulsos entre las células nerviosas [3].

La determinación de cafeína ha adquirido mucha importancia, debido a su uso en la industria farmacéutica y en la industria de alimentos; ya sea como ingrediente en la elaboración de refrescos y bebidas energéticas, o por su presencia en productos como el té, el mate, el cacao y el café. En todos estos casos, el control de calidad del parámetro cafeína es necesario en los productos. Por esta razón, se han desarrollado nuevos métodos instrumentales para su determinación en diversas matrices, especialmente alimentos. Los más confiables y robustos se basan en el uso de técnicas instrumentales de separación (cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución y electroforesis capilar) acoplados con diversas técnicas de detección como la espectroscopia de absorción molecular Uv/Vis y la espectrometría de masas [4-9]. Sin embargo, muchos de ellos requieren instrumental y accesorios costosos, no siempre accesibles o disponibles a los laboratorios. En contraste, el método oficial para el análisis de cafeína en café [10] utiliza un sistema de cromatografía líquida de baja presión con detección espectrofotométrica a 276 nm, que es tedioso, ya que incluye varias etapas manuales, consume tiempo y grandes cantidades de solventes orgánicos. En este panorama, luce atractivo diseñar nuevos métodos espectroscópicos directos para realizar esta determinación, y en esa vía están trabajando muchos investigadores.

La espectrometría IRTF es una técnica analítica espectroscópica rápida y accesible, que proporciona abundante información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de las muestras; y en la última década ha demostrado ser una herramienta poderosa para abordar el análisis cuantitativo y directo de muestras reales complejas, sin la necesidad de etapas previas de

separación. Además, es un detector casi ideal para ser acoplado a sistemas de flujo [11, 12].

En el caso de la cafeína, la espectrometría IRTF ofrece una opción interesante, sensible y selectiva, debido a las bandas de absorción que presenta en el infrarrojo medio (IRM). Sobre esta base se han propuesto diversos métodos para su determinación en productos farmacéuticos, refrescos, té y café [12-20]; algunos de los cuales se han desarrollado utilizando sistemas de flujo [12, 13, 15, 19]. Estos métodos utilizan diversos procedimientos analíticos que incluyen: técnicas de extracción o lixiviado –manuales y fuera de línea– con disolventes orgánicos, extracción en fase sólida (*solid phase extraction, SPE*) en sistemas de flujo, sistemas varios de preconcentración, etc. Sin embargo, en todos ellos, la última etapa del procedimiento contempla el análisis directo de la solución orgánica por IRTF. La cuantificación se lleva a cabo en la banda de 1659 cm^{-1} , utilizando diversos criterios de corrección, o mediante análisis quimiométrico de la data espectral por PLS (*partial least squares*)- IRTF.

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar un nuevo método de análisis sencillo, directo, automático y accesible para evaluar el contenido de cafeína en café, basado en la espectrometría IRTF. El método fue aplicado al análisis de cafeína en muestras comerciales de café tostado.

Experimental

Equipos y montaje instrumental

La Figura 1A muestra el montaje utilizado, que se basa en el acoplamiento de un sistema de análisis en flujo que incorpora una celda de extracción líquido-líquido (CE), con un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (AF-IRTF). La celda (CE) es una unidad de tipo sándwich –de fabricación casera– que incorpora una membrana de PTFE para la separación de las fases (acuosa y orgánica); y representa una modificación del separador propuesto por Kubán [21] (Figura 1B).

Los espectros de absorción fueron adquiridos con un espectrómetro IRTF Perkin Elmer (PE), modelo Spectrum 2000 equipado con una fuente de radiación para el infrarrojo medio, un detector de Mercurio-Cadmio-Telurio (MCT), un

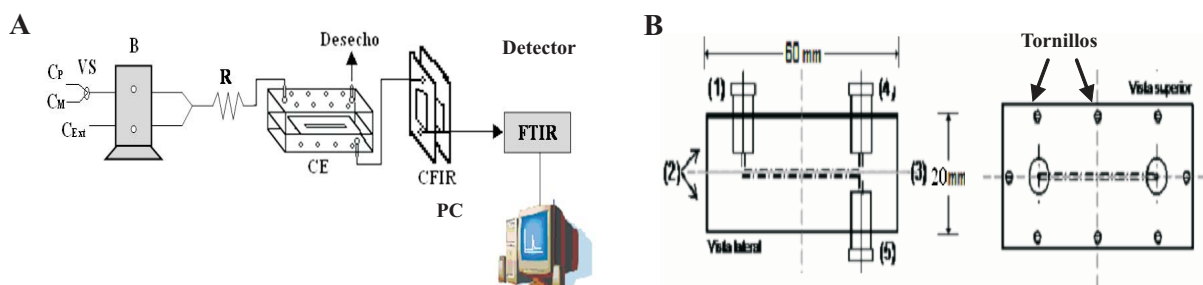


Figura 1. (A) Diagrama esquemático del sistema AF-IRTF propuesto. B: bomba peristáltica; C_M : canal de la muestra/estándar; C_{Ext} : canal del agente extractante (cloroformo); C_p : canal del portador (agua); R: serpentín de reacción; VS: válvula manual selectora de canales; CE: celda de extracción líquido-líquido; CFIR: celda (de transmisión) infrarroja; Detector: espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (IRTF). (B) Detalles de fabricación de la celda de extracción: (1) entrada del canal que transporta la mezcla hidro-alcohólica a la celda, con tornillo, (2) bloques de *nylon*, (3) membrana de *PTFE*, (4) canal para el transporte de la fase acuosa al drenaje, con tornillo y (5) canal para el transporte de la fase orgánica a la celda de medida, con tornillo.

divisor óptico intercambiable (*beamsplitter*) de KBr-Ge y una celda de transmisión convencional (CFIR) de geometría rectangular, que se utiliza como celda de flujo (Tabla 1). El instrumento, en su totalidad, se controla a través del software Spectrum 2000, de PE.

Reactivos y muestras

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y las soluciones fueron preparadas con agua de alta pureza de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ de resistividad, suministrada por un sistema Mili-Q-TOC de Milipore. Se prepararon patrones de cafeína (Merck) al 1% (p/v) disolviendo la cantidad adecuada en agua y cloroformo, respectivamente. Los estándares de trabajo se prepararon diariamente por dilución adecuada de la disolución patrón en agua. Se utilizó cloroformo grado HPLC (Mallinckrodt).

Las muestras de café tostado, molido y en grano, fueron adquiridas en expendios de alimentos de la ciudad de Mérida, República Bolivariana de Venezuela. Para la preparación de las muestras, se pesan 2,5 g de café a los que se adicionan 30 mL de agua caliente (80°C). La mezcla se calienta por 5 min y se filtra al vacío a través de un papel de filtro Whatman 54. Se adicionan 20 mL de agua destilada y se lleva a aforo (50 mL) con agua. Este procedimiento corresponde a un protocolo aceptado y validado por la AOAC [10].

Procedimiento general de trabajo

La propuesta metodológica de este trabajo implica: (i) preparación, fuera de línea, de la muestra en medio acuoso, (ii) introducción de la muestra al sistema, (iii) extracción –en línea– de la cafeína a la fase orgánica y separación de las fases orgánica y acuosa, (iv) adquisición del espectro IRTF y (v) análisis de los espectros. El punto (i) se refiere al pretratamiento de la muestra; las etapas (ii) a (iv) se desarrollan de forma automática en el montaje AF-IRTF, mientras que la etapa (v) se refiere al procesamiento de la data espectral.

Inicialmente se colocan todos los reactivos en sus respectivas líneas a temperatura ambiente (Figura 1). La bomba B permanece encendida durante todo el análisis para propulsar de forma continua al portador (C_p), o la muestra/estándar (C_M); y al agente extractante (C_{Ext}). La válvula selectora de canales (VS), que se conmuta de forma manual, permite introducir al sistema de forma selectiva al portador o a la muestra (estándar). Los estándares y muestras, en medio acuoso, y el cloroformo fueron transportados a través de tubería de *Tygon* y *Vitón^R*, respectivamente, ya que este último material es resistente a muchos solventes orgánicos.

La mezcla de la disolución acuosa (portador, muestra o estándar) con el cloroformo, así como la extracción de la cafeína desde la fase acuosa a la fase orgánica se realizan, en línea, en

Tabla 1
Condiciones experimentales de operación del sistema AF-IRTF propuesto

Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (IRTF)	
Parámetro	Valor o condición seleccionado
Intervalo espectral:	• 4500-600 cm^{-1} (1800-1500 cm^{-1})
Resolución:	• 4 cm^{-1}
Número de espectros acumulados:	• 5
Características de la celda	• Celda de transmisión rectangular (Wilmad) • Ventanas rectangulares (38 × 19 × 2) mm • ZnSe
Sistema de "Análisis en Flujo (AF)"	
Flujo de la solución portadora (C_P):	• 0,25 mL/min
Composición de la solución portadora (C_P):	• Agua destilada
Flujo del canal de la muestra o estándar (C_M):	• 0,25 mL/min
Composición de la muestra (C_M):	• 2,5g de café extraídos con 50 mL de agua
Composición de los estándares (C_M):	• Estándares acuosos de cafeína
Flujo del agente extractante (C_{Ext}):	• 0,32 mL/min
Composición del agente extractante (C_{Ext}):	• CHCl_3 puro (99,8%) y seco
Composición de la tubería (C_P , C_M , C_{Ext}):	• C_P y C_M : Tygon; C_{Ext} : Vitón ^R
Serpentín de reacción (R)	• PTFE (Teflón): 100 cm de longitud y 0,8 mm de diámetro interno

el serpentín de reacción R, mientras que la separación de las fases se lleva a cabo en la celda de extracción. La fase acuosa fluye directamente al drenaje, mientras la orgánica se dirige a la celda de medida, donde se adquiere el correspondiente espectro IRTF en una modalidad continua, acumulando cinco barridos (*scans*). Esta etapa se realiza de forma análoga, por triplicado, en los estándares y muestras. La señal analítica correspondiente a las muestras se interpola en la curva de calibrado obtenida a partir de estándares acuosos de cafeína. Mayores detalles del funcionamiento de este sistema, así como de la CE están disponibles en publicaciones y trabajos previos [22, 23].

Resultados y Discusión

Estudio de viabilidad de la propuesta metodológica

El método que se desarrolla en este trabajo, como se indicó con anterioridad, parte de la pre-

paración de estándares de cafeína y muestras de café en medio acuoso, la retro-extracción del analito en cloroformo y el análisis del extracto orgánico por IRTF. Por ello, la viabilidad de la propuesta depende del cabal cumplimiento de una serie de condiciones relacionadas a la solubilidad del analito, la transparencia del disolvente en el IR medio y el comportamiento espectral de la cafeína en ese medio.

El espectro IRTF de la cafeína sólida en pastillas de KBr, que se ilustra en la Figura 2A, muestra dos bandas relativamente intensas situadas en 1705 y 1659 cm^{-1} que tienen su origen en las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos [24] y otras dos, menos intensas, centradas en 1600 y 1550 cm^{-1} . Por otra parte, la cafeína tiene una solubilidad elevada en agua caliente (21,7g L^{-1}) y es muy soluble en cloroformo, un solvente orgánico con amplias ventanas de transparencia en el infrarrojo medio (Figura 2B y 2D). Las bandas de la cafeína están localizadas en una región espectral donde el agua presenta intensa absorción de radiación infrarroja (Figura 2C),

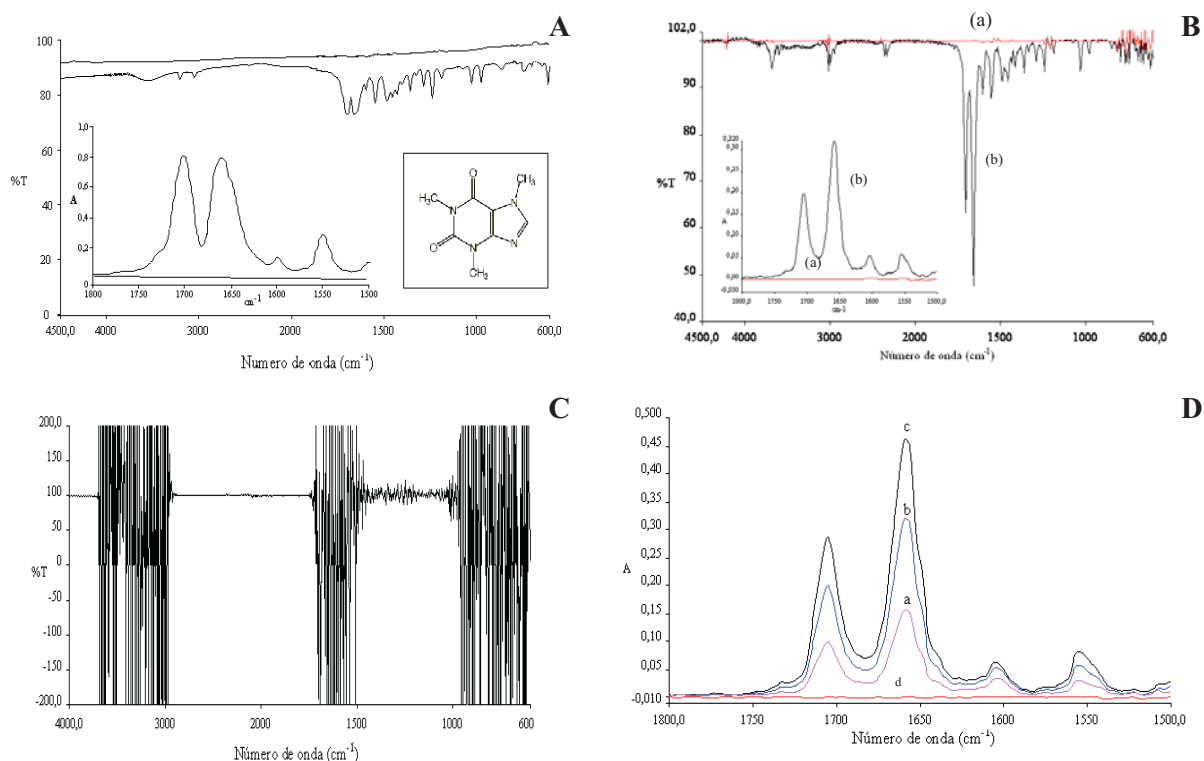


Figura 2. Espectro FTIR de la cafeína, agua y cloroformo. (A) Espectro –en transmitancia– de la cafeína sólida en pastilla de KBr. El inserto muestra una ampliación –en absorbancia– de la región entre 1300 y 1800 cm^{-1} , así como una representación de la estructura del analito. (B) Espectros FTIR de: (a) blanco (CHCl_3 puro) y (b) estándar de cafeína (0,050% p/v) en cloroformo. El inserto presenta una ampliación –en absorbancia– de la región espectral de 1500-1800 cm^{-1} . (*Background*: cloroformo, $n = 5$, paso óptico = 0,5 mm). (C) Ventanas de transparencia del agua en el infrarrojo medio. Espectro del agua pura obtenido mediante la acumulación de 25 barridos (*Background*: agua, paso óptico de 0,050 mm). (D) Espectros obtenidos en el sistema propuesto a partir de: (a) estándar acuoso de cafeína ([Cafeína] = 0,020 % p/v), (b) muestra acuosa de café (M1, [Cafeína]_{M1} = 0,05% p/v), (c) la misma muestra fortalecida con una concentración de cafeína 0,020% p/v) y (d) blanco. (Las condiciones experimentales se indican en la Tabla 1)

mientras el cloroformo muestra transparencia. Esto se aprecia en la Figura 2B, que presenta el espectro correspondiente a un estándar de cafeína en cloroformo, así como del blanco del disolvente, donde se observan con claridad las cuatro bandas del analito descritas con anterioridad.

En relación con la matriz de interés, café, la Figura 2D presenta, de forma comparativa, los espectros obtenidos en el sistema propuesto correspondientes a: (a) una solución acuosa de cafeína, (b) una muestra de café (M1) en medio acuoso y (c) la misma muestra enriquecida con el analito.

Se observa un crecimiento importante y centrado de las bandas de la cafeína, sin ningún tipo de deformación, lo que demuestra la viabili-

dad del sistema propuesto para el análisis de cafeína en café por espectrometría IRTF, utilizando estándares y muestras acuosas.

Selección de las condiciones de trabajo

Parámetros espectroscópicos-instrumentales

El intervalo espectral de trabajo se fijó entre 4500 y 600 cm^{-1} ; aunque la data espectral que se estudia se restringe a la región comprendida entre 1800 y 1500 cm^{-1} . Se evaluó el efecto de algunos parámetros instrumentales-espectroscópicos como: acumulación de barridos y resolución, sobre la señal de un estándar acuoso de cafeína

0,05% (p/v). Los resultados obtenidos son consistentes con los obtenidos en investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio; y se resumen en la Tabla 1.

El criterio de medida seleccionado fue el valor absoluto de la medida pico-valle (1668-1649 cm^{-1}) de la derivada de primer orden (D^1 , ventana de 25 puntos) del espectro de absorción (banda de 1659 cm^{-1}). Esta selección proporciona una solución sencilla y directa al problema asociado con la definición de la línea de base necesaria para la corrección de la absorbancia en el máximo de la representación D^0 , en un sistema espectral en el cual las bandas (1659 y 1704 cm^{-1}) no se encuentra totalmente resueltas, como se observa en la Figura 3 [25].

Características analíticas del sistema FA-FTIR

Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas (Tabla 1), la señal analítica mostró linealidad con la concentración, hasta un valor de 0,175% (p/v). La Tabla 2 resume las características de la curva de calibrado, así como los límites de detección y cuantificación encontrados, definidos como la concentración de analito cuya señal corresponde a 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco (3σ y 10σ), respectivamente. Por último, la frecuencia de análisis del método es del orden de 12 muestras h^{-1} .

La precisión del método se evaluó a través de la desviación estándar relativa (DER). Inicialmente se midieron cinco réplicas de una solución estándar (0,075% p/v) y de la muestra M1 ([Ca-

feína] $_{M1} \approx 0,05\%$ p/v). Los resultados obtenidos fueron 0,11% y 0,15%, respectivamente. Esta es una medida directa de la repetibilidad inherente al sistema AF-IRTF. En segunda instancia, se evaluó la precisión del procedimiento completo de análisis (incluyendo la preparación de las muestras), analizando 5 soluciones de la muestra M1 preparadas en forma independiente, encontrando un valor de 1.2%. Por último, se estimó la precisión entre-días del método repitiendo la experiencia anterior en tres sesiones de trabajo sucesivas e independientes. Los resultados obtenidos (DER = 1.7%; Sesión-1: [Cafeína] $_{M1} = 0,0502 \pm 0,0009\%$ (p/v), $n = 3$ ($1,00 \pm 0,02\%$ p/p); Sesión-2: [Cafeína] $_{M1} = 0,0510 \pm 0,0008\%$ (p/v), $n = 3$ ($1,02 \pm 0,02\%$ p/p) y Sesión-3: [Cafeína] $_{M1} = 0,0493 \pm 0,0005\%$ p/v ($0,99 \pm 0,01\%$ (p/p), $n = 3$) muestran una excelente reproducibilidad, que es indicativa de la robustez del sistema de análisis.

Estudios de interferencia y recuperación

Para verificar la ausencia de efectos de matriz, se realizaron estudios de adición de estándar (CAE) en la modalidad clásica (volumen de muestra constante, volumen de estándar variable y volumen final constante). Se diseñaron dos experiencias (curvas CAE-I y CAE-II) fijando el volumen de muestra en 4 mL y 8 mL, respectivamente, a partir de una muestra preparada con 5g de café (M1) extraídos con 100 mL de agua. En ambas curvas se adicionaron cantidades variables y conocidas de cafeína en el rango de 0 a 0,125% (p/v), diluyendo en todos los casos a un volumen

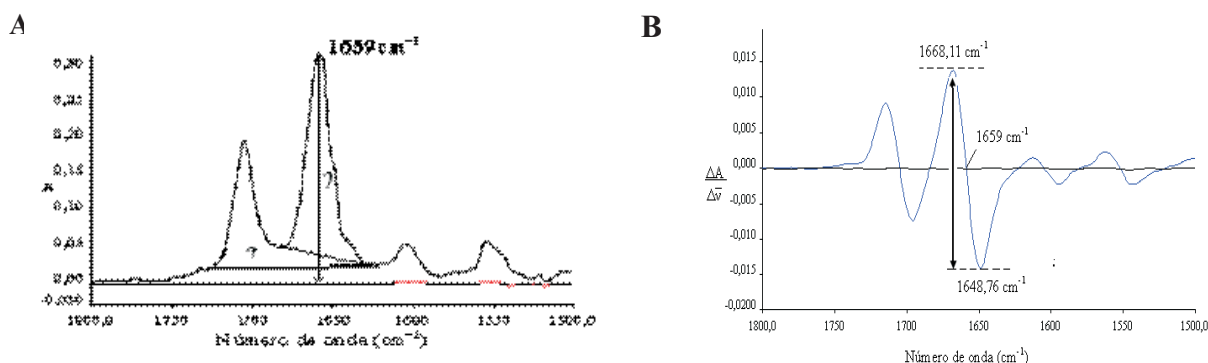


Figura 3. Selección del criterio de medida. (A) Espectro de absorción-Criterio de medida: Absorbancia a 1659 cm^{-1} con corrección por distintas líneas de base. (B) Derivada de primer orden (D^1) del espectro-Criterio de medida: Valor absoluto de la medida pico-valle (1669-1649 cm^{-1}) de la D^1 en a la banda de 1659 cm^{-1} .

Tabla 2
Características de la curva de calibrado simple y ecuaciones de las curvas de adición de estándar

Forma de calibración		Ecuación de la recta ^(b) $R_N = a + b.[\text{Cafeína}]$	$[\text{Cafeína}]_{M1}$ ^(c) % (p/p)
Curva de calibración simple	CCS	<ul style="list-style-type: none"> $dA/d\nu _{1668-1649 \text{ cm}^{-1}} = 0,00013 + 0,5109 [\text{Cafeína}]$ r (Coeficiente de correlación) = 0,9996 Blanco y 8 estándares: 0 – 0,175% (p/v) Intervalo dinámico (ID): 0,003 – 0,175% (p/v) Límite de detección (LD, 3σ) = 0,001% (p/v) Límite de cuantificación (LC, 10σ) = 0,003% (p/v) 	1,00 ± 0,02
Adición de estándar	CAE-I ^(a)	$ dA/d\nu _{1668-1649 \text{ cm}^{-1}} = 0,01020 + 0,5150 [\text{Cafeína}]$	0,99 ± 0,03
Adición de estándar	CAE-II ^(a)	$ dA/d\nu _{1668-1649 \text{ cm}^{-1}} = 0,02050 + 0,5025 [\text{Cafeína}]$	1,02 ± 0,03
Adición de estándar	CAE-III ^(a)	$ dA/d\nu _{1668-1649 \text{ cm}^{-1}} = 0,02516 + 0,5043 [\text{Cafeína}]$	1,00 ± 0,02

^(a) La preparación de las soluciones utilizadas en las tres experiencias de adición de estándar se describe en detalle en el texto. ^(b) $|dA/d\nu|_{1668-1649 \text{ cm}^{-1}}$ es el valor absoluto de la medida pico-valle (1668-1649 cm^{-1}) de la representación D^1 (25 puntos) del espectro de absorción correspondiente a la banda analítica de 1659 cm^{-1} ; [Cafeína] representa la concentración de cafeína expresada en% (p/v). ^(c) Concentración de cafeína obtenida a través de las distintas formas de calibración.

final de 10 mL. Se realizó una experiencia adicional (III), añadiendo cafeína sólida directamente al café molido en cantidades exactamente establecidas para proporcionar a las soluciones de trabajo una concentración final de cafeína adicional equivalente al de las series anteriores. Los resultados de estas experiencias se resumen en la Tabla 2. La comparación de las pendientes de estas curvas, basado en la prueba de *Fisher* y el estadístico *t de student* [26], indicó –con una certeza del 95%– que las pendientes de las curvas CAE no muestran diferencias significativas con relación a la curva de calibrado simple (CCS). Este comportamiento permite concluir que no existen interferencias físicas ni químicas por parte de la matriz en el análisis.

Para evaluar la exactitud del método, en una primera fase, se realizaron estudios de recuperación, utilizando para este fin la serie de muestras enriquecidas preparadas para las curvas CAE. Los resultados obtenidos en todos los casos (Se-

rie I: 97,73-102,0%, Serie II: 94,76-99,65% y Serie III: 93,40-101,8%) indican una recuperación cuantitativa. A continuación, se compararon los resultados obtenidos para la concentración de cafeína de la muestra de café M1(s), a partir de la CCS y las tres curvas CAE (Tabla 2). El análisis estadístico de estos resultados nuevamente evidencia que no existen diferencias significativas entre ellos, ratificando la exactitud del método, la correcta aplicación del mismo y la ausencia de errores sistemáticos a lo largo de todo el procedimiento desarrollado. La equivalencia estadística entre las pendientes de las curvas CCS y CAE, así como entre la concentración de cafeína obtenida por ambas formas de calibración, avala el uso de la CCS a partir de estándares acuosos de cafeína para realizar el análisis.

Análisis de muestras reales

Se analizaron 20 muestras de café tostado de doce marcas diferentes que se comercializan

en el país, 16 de ellas en presentación de café molido y 4 en granos. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El contenido de cafeína en las muestras M1-M4 se evaluó, en paralelo, a través del método oficial [10]. Las dos poblaciones de resultados muestran una buena coincidencia, lo cual ratifica la exactitud del método propuesto.

Evaluación Crítica de la Propuesta

En este trabajo se desarrolló un nuevo método para la determinación de cafeína en café, basado en un sistema AF que incorpora a la espectrometría IRTF como técnica de detección. El sistema utilizado fue ensamblado a partir de equipos y accesorios comerciales accesibles y disponibles en el mercado.

El método propuesto reduce drásticamente el tiempo de análisis, el consumo de disolvente y la manipulación de la muestra. El gasto de cloroformo es inferior a 20 mL por hora, y puede ser reciclado por destilación [12,13]. Los estudios realizados denotan marcadores analíticos de calidad

objetivos en cuanto a sensibilidad, precisión, exactitud y robustez; que compiten de forma abierta, y en muchos casos favorable, con los correspondientes a otros métodos descritos en la literatura. En relación a la sensibilidad analítica y el límite de detección, están en el mismo orden de magnitud que los métodos que utilizan espectrometría IRTF. Sin embargo, las mayores ventajas que propone se relacionan a la frecuencia de análisis, que es favorable frente a estos métodos [18-20] y a cualquier sistema cromatográfico; y a la selectividad que viene potenciada por el doble sistema de extracción utilizado y por el uso de la espectroscopia derivativa.

En relación a la robustez, entendida como la consistencia que presenta la respuesta analítica a pequeños cambios en variables experimentales inherentes al método, es evidente que los parámetros críticos se relacionan con el caudal de los diversos canales: portador (CC_p), muestra o estándar (CC_M) y cloroformo (CC_{Ext}), ya que de ellos depende la reproducibilidad y eficiencia del proceso de extracción en línea. Por ello, es necesario mantener un control estricto y rutinario del

Tabla 3
Análisis de muestras reales

Muestra* (Presentación)	[Cafeína] % (p/p) ^(d)	Muestra* (Presentación)	[Cafeína] % (p/p) ^(d)
M1 ^(a)	1,000 ± 0,005	M11 ^(a)	1,03 ± 0,02
M2 ^(a)	1,005 ± 0,007	M12-1 ^(b)	1,02 ± 0,01
M3 ^(a)	1,00 ± 0,01	M12-2 ^(b)	1,06 ± 0,01
M4 ^(a)	1,03 ± 0,02	M12-3 ^(b)	1,07 ± 0,02
M5 ^(a)	1,00 ± 0,02	M12-4 ^(b)	1,03 ± 0,01
M6 ^(a)	0,800 ± 0,008	M12-5 ^(b)	1,07 ± 0,01
M7 ^(a)	0,94 ± 0,01	M6-(g) ^(c)	1,16 ± 0,02
M8 ^(a)	0,940 ± 0,006	M7-(g) ^(c)	1,05 ± 0,01
M9 ^(a)	0,600 ± 0,008	M13-(g) ^(c)	1,07 ± 0,02
M10 ^(a)	0,620 ± 0,007	M14-(g) ^(c)	1,10 ± 0,02
M1 ^(e)	1,02 ± 0,03	M3 ^(e)	1,02 ± 0,04
M2 ^(e)	0,99 ± 0,04	M4 ^(e)	1,00 ± 0,04

Muestra* : Marca y presentación comercial del café. El subíndice i (1-14) corresponde al código de la marca del café. ^(a)Café molido tostado. ^(b)Corresponde a 5 muestras distintas de la misma marca (lotes distintos). Mi-(g). ^(c)Café en grano tostado. ^(d)[Cafeína] obtenida por el método propuesto (Media aritmética ± desviación estándar de 3 medidas independientes). ^(e)[Cafeína] obtenida por el método oficial [10] (Media aritmética ± desviación estándar de tres medidas independientes).

estado de las tuberías de Tygon y Viton^R. Por otra parte, se evaluó el tiempo de vida de la membrana de PTFE, haciendo sucesivas medidas de un *pool* de la muestra M1. Tras 170 inyecciones, no se observó variación estadísticamente significativa en la señal analítica. Sin embargo, se estableció como parte del protocolo de trabajo, cambiar la membrana tras 150 inyecciones.

En referencia a las muestras estudiadas, la concentración de cafeína que se encontró en las doce marcas de café tostado (molido) fue de 0,6-1,07% (p/p), mientras que en las 4 muestras de café en grano el contenido osciló entre 1,05 y 1,16% (p/p). Estos valores son inferiores a los encontrados en otros trabajos, que reportan concentraciones cercanas al 2% (p/p) [18-20, 27]. Sin embargo, el producto que se comercializa en el país resulta de la mezcla de diversos granos; y los resultados son consistentes con el hecho de que en Venezuela se cultiva de forma mayoritaria la variedad "arábica", cuyo contenido de cafeína oscila entre 0,7 y 1,3% (p/p). En otros países se cultiva, o se utiliza, en mayor proporción la variedad "robusta", que se considera de menor calidad, pero presenta un contenido más elevado de cafeína (2-4,5% p/p) [27]. Se analizaron 5 muestras distintas de una misma marca (Muestra M12); y los resultados obtenidos ($1,050 \pm 0,022\%$ (p/p); DER = 2,2%) son un claro indicio de homogeneidad en el producto comercializado. Con relación al café en grano, la población estudiada fue muy pequeña como para inferir conclusiones sólidas. Tan solo destaca la muestra M6, cuyo contenido de cafeína en los granos ($1,16 \pm 0,02\%$ p/p) difiere considerablemente del obtenido en la muestra que se empaqueta y comercializa como café molido ($0,800 \pm 0,008\%$ p/p).

En Venezuela, la presentación comercial del producto proporciona poca información acerca del origen y composición del mismo. La etiqueta solo especifica "café 100% puro". Esta política comercial contrasta con la de otros países, en los cuales se suministra información al consumidor acerca de la concentración de cafeína y la composición de origen del café.

Por todo lo expuesto, esta propuesta representa una nueva alternativa: atractiva, interesante y válida para la determinación de cafeína en café, que puede ser usada de forma rutinaria para el control de calidad en las industrias del ramo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT-ULA) y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el soporte financiero brindado a través de diversos proyectos (FONACIT, Proyecto No. G-20000040-6) y programas de apoyo al investigador.

Referencias Bibliográficas

1. Jaramillo J.: "El Café en Venezuela". Ediciones de la Biblioteca UCV; Caracas, Venezuela, 1996.
2. Ascanio C.: "Biología del Café". Editorial Litopar, C.A., Caracas, Venezuela, 1994.
3. Kihlman B. A., "Caffeine and Chromosomes". Elsevier Scientific Publishing Company, New York, USA, 1977.
4. Bicchi C., Binello A., Legovich M., Pellegrino G., Vanni A.: "Characterization of roasted coffee by S-HSGC and HPLC-UV and principal component analysis". *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 41 (1993) 2324-2328.
5. Casal S., Oliveira M., Ferreira M.: "HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee". *Food Chem.*, Vol. 68 (2000) 481-485.
6. Horie H., Nesumi A., Ujihara T., Kohata K.: "Rapid determination of caffeine in tea leaves". *J. Chromatogr. A.* Vol. 942 (2002) 271-273.
7. Yang M., Orton M., Pawliszyn J.: "Quantitative determination of caffeine in beverages using a combined SPME-GC/MS method". *J. Chem. Educ.*, Vol. 74 (1997) 1130-1132.
8. Conte E., Barry E., Rubinstein H.: "Determination of caffeine in beverages by capillary zone electrophoresis". *J. Chem. Educ.*, Vol. 73, No. 12 (1996) 1169-1170.
9. Zhao Y., Lunte C.: "Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. B.* Vol. 688 (1997) 265-274.
10. Helrich K.: (Ed.), "Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical

- Chemists". 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1990.
11. Schindler R., Lendl B.: "FTIR spectroscopy as detection principle in aqueous flow analysis". *Anal. Commun.*, Vol. 36, 123-126, (1999) 123-126.
 12. Galignani M., Brunetto M.R.: "Infrared detection in flow analysis. Developments and trends (review)". *Talanta*, Vol. 64 (2004) 1127-1146.
 13. Bouhsain Z., Garrigues S., de la Guardia M.: "Clean method for the simultaneous determination of propyphenazone and caffeine in pharmaceuticals by flow injection Fourier transform infrared spectrometry". *Analyst*, Vol. 122 (1997) 441-445.
 14. Paradkar M., Irudayaraj J.: "Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy", *Food Chem.*, Vol. 78 (2002) 261-266.
 15. Daghbouche Y., Garrigues S., Vidal M., de la Guardia M.: "Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in soft drinks". *Anal. Chem.*, Vol. 69 (1997) 1086-1091.
 16. Ohnsmann J., Quintás G., Garrigues S., de la Guardia M.: "Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 374 (2002) 561-565.
 17. Najafi N., Hamid A., Afshin R.: "Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression". *Microchem. J.*, Vol. 75 (2003) 151-158.
 18. Garrigues J., Garrigues S., de la Guardia M., Bouhsain Z.: "Fourier transform infrared determination of caffeine in roasted coffee samples". *J. Anal. Chem.*, Vol. 366 (2000) 319-322.
 19. Bouhsain Z., Garrigues J., Garrigues S., de la Guardia M.: "Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee". *Vib. Spectrosc.*, Vol. 21 (1999) 143-150.
 20. Downey G., Briandet R., Wilson R., Kemsley E.: "Near and mid-infrared spectroscopies in food authentication: coffee varietal identification". *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 45 (1997) 4357-4361.
 21. Kubáň V.: "Liquid-Liquid Extraction Flow Injection Analysis". *C. R. Anal. Chem.*, Vol. 22, No. 6 (1991) 477-557.
 22. Galignani M., Ayala C., Brunetto M.R., Burguera J., Burguera M.: "A simple strategy for determining ethanol in all type of alcoholic beverages based on its on-line liquid-liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR". *Talanta*, Vol. 58, No. 2 (2005) 470-479.
 23. Galignani M., Ayala C., Rodríguez J., Brunetto M.R., Villareal A.M., Fernandez C., Forgiarini A., Salager J.L. "Flow analysis-FTIR spectrometric determination of caffeine in dermocosmetic creams with on-line extraction of caffeine with chloroform". XIII International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA-2005). Las Vegas, USA (2005) Book of Abstracts: pp. 69.
 24. Ferraro J. R., Basile J. L.: "Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Application to Chemical Systems". Academic Press, New York, 1978.
 25. Sánchez Rojas F., Bosh Ojeda C., Cano Pavón J.M.: "Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical application". *Talanta*, Vol. 35 (1988) 753-761.
 26. Miller J.C., Miller J.N.. "Statistic for Analytical Chemistry". Wiley, New York, 1984.
 27. Marifred D. Torres Márquez. "Diseño y desarrollo de un método de análisis para la determinación de cafeína en muestras comerciales de café, basado en el acoplamiento de un sistema de análisis en flujo con la espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (AF-IRTF)". Trabajo Especial de Grado, (Licenciatura de Química, Tutor: Máximo Galignani). Universidad de los Andes (ULA), Mérida, Venezuela (2006).

Recibido el 03 de Julio de 2007

En forma revisada el 29 de Marzo de 2008