

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA EN SOBRES DE CAFÉ
INSTANTÁNEO, QUE SE COMERCIALIZA EN LA “DESPENSA FAMILIAR”.

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

PRESENTADO POR

MIGUEL HAROLD ZAVALA SANDOVAL

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORAS

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

LICENCIADA PATRICIA DEL ROSARIO ESCOBAR DE MURCIA

TUTOR

LICENCIADO MARIO ANTONIO HERNÁNDEZ MELGAR

AGRADECIMIENTOS

En este momento tan significativo de mi vida, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por su apoyo incondicional, amor y sacrificio que han sido fundamentales en mi camino hacia la culminación de mi trabajo de grado. Desde el inicio de este viaje, ustedes han sido mi inspiración, brindándome aliento y orientación en cada paso del camino. Sus palabras de aliento, sus abrazos reconfortantes y su constante presencia han sido un faro de luz en los momentos de incertidumbre y desafíos.

A la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador,

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento por brindarme el entorno académico enriquecedor que ha sido el crisol de mi crecimiento y desarrollo como profesional en formación. Los recursos, las instalaciones y, sobre todo, el equipo de docentes comprometidos, han sido pilares fundamentales en mi aprendizaje y en la consecución de mi trabajo de grado. Su dedicación y pasión por la enseñanza han sido inspiradoras y han dejado una huella imborrable en mi formación.

A la Universidad de El Salvador,

Deseo extender mi gratitud hacia la institución que me ha brindado la oportunidad de perseguir mis sueños académicos y de investigación. Su visión de excelencia académica y compromiso con el desarrollo integral de los estudiantes han sido el motor que impulsó mi búsqueda de conocimiento y crecimiento personal. Gracias por proporcionarme un espacio donde pude explorar, aprender y crecer como persona y como profesional en formación.

A todos ustedes, mis queridos padres, hermano, abuelos, mi prometida, les debo mi más profundo agradecimiento. Sin su apoyo, orientación y recursos, este logro no habría sido posible. Me siento honrado y privilegiado de haber contado con su respaldo incondicional a lo largo de este emocionante viaje académico.

DEDICATORIA

Querida familia,

Hoy, al concluir un largo y desafiante capítulo en mi vida, no puedo evitar mirar atrás con un profundo sentimiento de gratitud. Este logro, culminar mis estudios en la carrera de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador, no habría sido posible sin el apoyo incondicional de todos ustedes.

A mi familia, les agradezco por estar siempre a mi lado, brindándome la fuerza y la motivación necesarias para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Desde pequeño, me enseñaron el valor del esfuerzo y la perseverancia. Gracias por inculcarme esos principios fundamentales que hoy me permiten alcanzar esta meta. Cada palabra de aliento, cada gesto de apoyo, y cada sacrificio que han hecho por mí, han sido la base de mi éxito.

Mamá y papá, su amor incondicional me ha dado la seguridad de que siempre tengo un refugio al cual regresar. Su ejemplo de dedicación y trabajo arduo ha sido una inspiración constante para mí. Gracias por creer en mis sueños, incluso cuando parecían lejanos. Cada uno de ustedes ha sido mi mayor motivación, y hoy, con orgullo, les dedico este logro.

A mis abuelos, gracias por ser mi equipo inquebrantable. Sus palabras de aliento y su compañía constante han sido mi motor en este camino. Su confianza en mí me ha impulsado a superar cada obstáculo y a dar lo mejor de mí en cada paso de esta carrera.

Finalmente, quiero dedicar este momento a todos los que creyeron en mí, incluso en los momentos en los que yo mismo flaqueaba. Cada uno de ustedes ha dejado una huella indeleble en mi corazón, y por eso, este logro no es solo mío, sino nuestro.

Con todo mi cariño y gratitud,

Harold Zavala

ÍNDICE GENERAL

Pág. N°

ABREVIATURAS

GLOSARIO

RESUMEN

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN 14

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS 16

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO 18

3.1 Composición 18

3.1.1 Tipos de café 19

3.1.2 Características del café 20

3.2 Absorción y metabolismo de cafeína en el cuerpo 21

Humano

3.2.1 Efectos beneficiosos en el rendimiento cognitivo y el 22

Dolor

3.2.2 Efectos sobre los síntomas de sueño, ansiedad y 22

Síndrome de abstinencia

3.3 HPLC (high-performance liquid chromatography) 23

3.4 Requerimientos generales y físicos químicos para café 26

Soluble según la norma NSO 67.31.03:04

CAPÍTULO IV

4.0 PRODUCTO FINAL 28

4.1 Introducción 29

4.2 Objetivos 30

4.3 tipo de método de análisis 30

4.4 Información general de la muestra 31

4.5 Reactivos 31

4.6 Materiales y equipos 31

| | |
|---|----|
| 4.6.1 Materiales | 31 |
| 4.6.2 Equipos | 32 |
| 4.7 Procedimiento de práctica de determinación. | 32 |
| 4.7.1 Preparación de las disoluciones patrón: | 32 |
| 4.7.2 Preparación del extracto de la muestra: | 32 |
| 4.8 Condiciones Cromatográficas | 33 |
| 4.9 Identificación de la Cafeína | 33 |
| 4.10 Cuantificación de la cafeína | 33 |
| 4.11 Cálculo de la concentración de cafeína en las muestras | 33 |
| 4.12 Resultados Finales | 34 |
| 4.13 Cálculos | 34 |
| 4.13.1 Cálculos para preparación del estándar | 34 |
| 4.13.2 Cálculo de la Concentración de Cafeína en las Muestras | 34 |
| 4.14 Referencia bibliográficas | 36 |
| CAPÍTULO V | |
| 5.0 CONCLUSIONES | 38 |
| CAPITULO VI | |
| 6.0 RECOMENDACIONES | 40 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | |
| ANEXOS | |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura N° | | Pág. N° |
|------------------|---|----------------|
| 1 | Características físicas de Coffea spp. | 18 |
| 2 | Granos de café verde. | 18 |
| 3 | Granos de café tostado. | 19 |
| 5 | Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento. | 24 |
| 6 | Esquema de un equipo HPLC y sus componentes. | 43 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla N° | | Pág. N° |
|-----------------|--|----------------|
| 1 | Requisitos fisicoquímicos para café soluble. Fuente: NSO 67.31.03:04. | 26 |
| 2 | Tiempo de retención y área de los picos de los cromatogramas de los patrones de cafeína. | 35 |
| 3 | Documentar áreas de las muestras de café. | 35 |

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- CYP450: Citocromo P-450.
- FID: Detector de Ionización de Llama.
- g: Gramos.
- HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- LOD: Límite de Detección.
- LOQ: Límite de Cuantificación.
- mg: Miligramos.
- ml: Mililitros.
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear.
- RT: Tiempo de Retención.
- UV: Ultravioleta.

GLOSARIO

1. Absorbancia UV: Medición de la cantidad de luz ultravioleta absorbida por una muestra en un espectrofotómetro.
2. Adenosina: Neurotransmisor en el cerebro que promueve el sueño. La cafeína bloquea los receptores de adenosina, lo que resulta en un efecto estimulante.
3. Antagonista de adenosina: Sustancia que bloquea los efectos de la adenosina, lo que provoca una estimulación del sistema nervioso central.
4. Cafeína: Alcaloide natural presente en los granos de café y otras plantas, que actúa como estimulante del sistema nervioso central.
5. Citocromo P-450 (CYP): Familia de enzimas que metabolizan diferentes sustancias en el hígado, incluyendo la cafeína.
6. Columna de HPLC: Tubo de acero inoxidable que contiene el material de la fase estacionaria y por el cual se hace pasar la fase móvil que lleva la muestra a analizar. La columna es el corazón del proceso de separación en HPLC.
7. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): Técnica analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar componentes en una mezcla.
8. Disolvente: Sustancia que disuelve un soluto, formando una solución. En HPLC, los disolventes se usan como fase móvil para llevar la muestra a través de la columna.
9. Fase Estacionaria: Componente de la HPLC que permanece fija dentro de la columna y con la que interaccionan los componentes de la muestra, causando su separación basada en la afinidad química.
10. Fase Móvil: Disolvente líquido que fluye a través de la fase estacionaria en HPLC, llevando consigo las moléculas de la muestra para su separación y posterior detección.
11. Inyector: Parte del sistema HPLC que introduce la muestra en la corriente de la fase móvil para que se transporte a través de la columna.
12. Metabolización de la Cafeína: Proceso mediante el cual el hígado descompone la cafeína en compuestos más simples que son excretados por el cuerpo.
13. Molécula de Cafeína: Estructura química 1,3,7-trimetilxantina, que es absorbida por el cuerpo después de su ingesta y metabolizada principalmente en el hígado.
14. Sistema Nervioso Central (SNC): Parte del sistema nervioso formada por el cerebro y la médula espinal. La cafeína actúa como estimulante del SNC, lo que puede llevar a una mayor alerta y vigilia.

15. Solución Estándar de Cafeína: Solución preparada con una concentración conocida de cafeína, utilizada como referencia en el análisis HPLC para cuantificar la cafeína en las muestras de café.
16. Solución estándar: Mezcla preparada con una concentración conocida de un compuesto, utilizada para calibrar equipos analíticos.
17. Teofilina y Teobromina: Metabolitos derivados de la cafeína que tienen efectos en el sistema cardiovascular y respiratorio.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue desarrollar una práctica de análisis con el fin de determinar la cantidad de cafeína en sobres de café instantáneo. La metodología consistió en la extracción de cafeína de las muestras de café, seguido de un análisis cuantitativo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Una problemática clave que se abordó es la variabilidad en el contenido de cafeína entre diferentes marcas y lotes de producción en venta ubicada en la “Despensa familiar” Centro de San Salvador, San Salvador, El Salvador. Esto puede generar incertidumbre entre los consumidores, ya sea por razones de salud y preferencias personales.

La metodología del análisis se centró en el uso del (HPLC), una técnica analítica fundamental en la cuantificación precisa de compuestos como la cafeína. Este proceso comienza con la preparación de la muestra, donde una cantidad específica de café instantáneo se pesa cuidadosamente y se disuelve en un solvente adecuado. Posteriormente, la muestra se agita para asegurar la completa disolución de la cafeína y se filtra para remover cualquier partícula sólida que pueda interferir en el análisis.

Este método es crucial debido a su alta sensibilidad y precisión en la determinación de concentraciones de cafeína. Su aplicación en este trabajo permite obtener resultados fiables y reproducibles, garantizando una cuantificación adecuada de la cafeína en productos alimenticios como el café instantáneo, lo cual es fundamental para controlar la calidad del producto y asegurar el cumplimiento de normativas alimentarias.

El uso del HPLC como método de análisis se consolidó como una herramienta para la cuantificación precisa de la cafeína, para aplicaciones en la industria alimentaria y en laboratorios de control de calidad.

Se recomienda implementar este método de manera rutinaria en los procesos de control de calidad de productos de café soluble, y considerar su adaptación para el análisis de otras matrices alimenticias que contengan cafeína, con el fin de garantizar la uniformidad y seguridad del producto final.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

Esta investigación surge de la necesidad de establecer un método de análisis eficiente para la determinación de cafeína en sobres de café instantáneo. El objetivo principal es desarrollar una práctica analítica para la determinación que permita cuantificar de manera precisa y confiable la cantidad de cafeína en estas muestras, lo que contribuirá a garantizar la calidad de los productos de café instantáneo en la “Despensa Familiar” ubicada en el centro de San Salvador, San Salvador, El Salvador.

Para lograr este objetivo, se planteó revisar la literatura científica existente sobre métodos analíticos para la determinación de cafeína en productos alimenticios y diseñar una práctica para la extracción y cuantificación de cafeína en sobres de café instantáneo a partir de la cual se desarrolló una práctica analítica para extraer y cuantificar la cafeína de sobres de café instantáneo, que luego podrá ser aplicada a una muestra representativa de productos comerciales disponibles en el mercado.

La metodología propuesta para la realización de este trabajo incluyó las siguientes etapas:

- Revisión bibliográfica: Se realizó una revisión exhaustiva de la literatura científica existente sobre métodos analíticos para la determinación de cafeína en productos alimenticios, con el fin de identificar los métodos más adecuados para la extracción y cuantificación de cafeína en sobres de café instantáneo.
- Diseño: Se diseñó una práctica de determinación que incluya los pasos necesarios para la extracción y cuantificación de cafeína en sobres de café instantáneo, así como los reactivos y equipos necesarios para llevar a cabo el análisis.

Por lo tanto, se propone una práctica de análisis para la determinación de cafeína en sobres de café instantáneo, elaborado por el investigador y llevado a cabo en la San salvador, San salvador, es un tema de investigación relevante y de gran importancia para la industria alimentaria y la salud pública, porque permitirá garantizar la calidad y seguridad de los productos de café instantáneo, así como proporcionar información precisa y confiable a los consumidores.

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Elaborar una práctica de determinación de cafeína en sobres de café instantáneo en equipo HPLC.

2.2 Objetivos Específicos:

- Aplicar teóricamente el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la cantidad de cafeína en sobres de café instantáneo.
- Identificar los factores que influyen en la concentración de cafeína en café instantáneo utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según estudios científicos.
- Definir una propuesta metodológica teórica para la determinación de cafeína en sobres de café instantáneo, tomando como base la revisión de metodologías existentes en la literatura.

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

El café es una bebida que se obtiene de las semillas tostadas de las plantas del café o cafetos (*Coffea spp*). Los cafetos son arbustos de hoja perenne de la familia de las Rubiáceas. ⁽¹⁾



Figura N° 1: Características físicas de *Coffea spp*.¹

Estos producen flores de color blanco que producen frutos de color rojizo. La parte interior del fruto contienen dos semillas o granos de café. Hay algunas especies de cafetos que solo producen una única semilla por fruto, se conocen como “café perlado”. Los granos de café o semillas son la parte del fruto que contiene más cafeína.

3.1. Composición

Los granos de café poseen más de 2.000 sustancias diferentes (cafeína, minerales, lípidos, trigonelinas, aminoácidos – proteínas, ácidos alifáticos, glicósidos y carbohidratos) de tal manera que el café no es «solo cafeína» (1, 3, 7-trimetilxantina), sin embargo, es el ingrediente farmacológicamente más activo. Las dimetilxantinas derivadas (teofilina y teobromina) también se encuentran en una variedad de especies de plantas.

El café tiene múltiples componentes. Los granos de café crudos tienen una composición diferente entre la variedad Arábica y la Robusta. ⁽¹⁾



Figura N° 2: Granos de café verde.

Fuente: Elaboración propia.

En la variedad Arábica, la cafeína comprende el 1,2% de la materia seca, 4,2% minerales, de los cuales 1,7% es potasio; 16% lípidos, 1,0% trigonelinas, 11,5% proteínas y aminoácidos, 1,4% ácidos alifáticos, 6,5% despidos (ácidos clorogénicos), 0,2% glucósidos y 58% carbohidratos. En la variedad Robusta, la cafeína comprende el 2,2% de la materia seca, 4,4% minerales, de los cuales 1,8% corresponden al potasio; 10% lípidos, 0,7% trigonelinas, 11,8% proteínas y aminoácidos, 1,4% ácidos alifáticos, 10% ácidos clorogénicos y 59,5% glucósidos trazas y carbohidratos. El contenido de agua de los granos de café crudo comercial varía entre 8% y 12%.

La composición de los granos de café se altera de forma dramática por el proceso de tostado, y pierde gran cantidad de agua (posee apenas 1% a 5%), proteínas, ácidos clorogénicos y carbohidratos. ⁽¹⁾



Figura N° 3: Granos de café tostado.

Fuente: Elaboración propia

3.1.1 Tipos de café

Existen aproximadamente 40 especies de cafetos, pero la bebida del café se obtiene fundamentalmente de tres plantas: El cafeto de Arabia, el cafeto robusta y el cafeto liberica.

- El cafeto liberica (*Coffea liberica*) Es un árbol que puede alcanzarlos 18 m de altura. Procede de Liberia, en el oeste de África, aunque se cultiva principalmente en Indonesia. Produce semillas más grandes que proporcionan poco sabor.
- El cafeto de arabia (*Coffea arabica*) Es un arbusto que crece unos 12 metros de altura en estado natural. Procede de las montañas de Etiopia. Constituye la especie más importante en la actualidad y la que produce un café de mayor calidad.

- El cafeto robusta (*Coffea canephora*) Es un árbol o arbusto de unos 10 metros de altura. Procede de África occidental, aunque se cultiva en muchas zonas tropicales. Es una especie más fácil de cultivar que la arábica ya que resiste mejor las enfermedades.

3.1.2 Características del café

En este apartado, se intenta describir cuales son las características del café y lo que se percibe con los sentidos. Los granos de café, según su procedencia, tienen generalmente características distintivas como:

- Sabor: los criterios sobre el sabor incluyen términos como cítrico o terroso, caramelizado, afrutado, acidez, amargor, sabor aterciopelado.
- Aroma: los criterios sobre los olores incluyen términos como suave, delicado, único, exclusivo, intenso.
- Intensidad: ligero, suave, medio, intenso, equilibrado.
- Cuerpo: Hace referencia al tacto en el paladar según sea su espesor, densidad, viscosidad o cremosidad.
- Persistencia: Hace referencia al tiempo que dura en el paladar y se detectan las notas de aroma.

Éstos dependen del ambiente local donde crecen las plantas de café, su método de proceso, y la subespecie genética o varietal. Así, los cafés presentan un gran abanico de sabores, y las variedades más valoradas que alcanzan precios muy elevados. ⁽¹⁾

3.2 Absorción y metabolismo de cafeína en el cuerpo humano.

La actividad de las enzimas metabolizadoras de la cafeína se hereda en parte. Por ejemplo, una variante del gen que codifica el CYP1A2 se asocia con un metabolismo más lento. Diversos fármacos (antibióticos de quinolona, medicamentos cardiovasculares, broncodilatadores y antidepresivos) retardan la eliminación de la cafeína y aumentan su vida media, generalmente porque son metabolizados por las mismas enzimas hepáticas. Análogamente, la cafeína puede afectar la acción de diversos medicamentos. ⁽²⁾

Estos metabolitos se convierten en ácido úrico y se excretan con la orina. La vida media de la cafeína en los adultos suele ser de 2,5 a 4,5 horas, pero está sujeta a variaciones interpersonales. Los recién nacidos tienen una capacidad limitada para metabolizarla. Después de 5 a 6 meses de edad, la capacidad de metabolismo de la cafeína por kg/peso no cambia mucho con la edad. Fumar acelera la metabolización de la cafeína, reduciendo la vida media hasta 50 %, mientras que los anticonceptivos orales duplican su vida media. El embarazo también reduce su metabolismo, especialmente en el tercer trimestre. ⁽²⁾

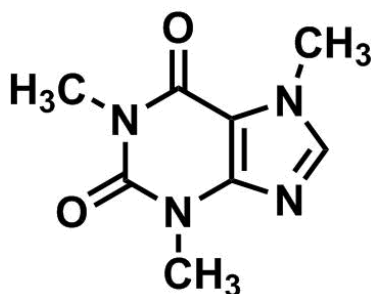


Figura N° 4: Molécula de cafeína.
Fuente: Elaboración propia.

La cafeína es 1,3,7-trimetilxantina con estructura similar a la adenosina que se absorbe casi completamente a los 45 minutos de ingerida, y alcanza picos en sangre después de 15 minutos - 2 horas. ⁽³⁾

En el hígado, la cafeína es metabolizada por el citocromo P-450 (CYP), en particular el CYP1A2, en tres metabolitos: paraxantina (84 %), teobromina (12 %) y teofilina (4 %). ⁽⁴⁾

La dieta también puede afectar al metabolismo de la cafeína. El consumo de zanahorias, apio y perejil su metabolismo, en contraste con verduras como brócoli, coliflor, rábano y coles. ⁽⁵⁾

La cafeína es un antagonista de fosfodiesterasa y de los receptores de adenosina A1, A2A y A2B, lo cual estimula el sistema nervioso central al incrementar la liberación de neurotransmisores como dopamina, noradrenalina y glutamato. ⁽⁵⁾ Una vez filtrada, el 98 % de la cafeína sufre reabsorción tubular; el resto se excreta sin cambios por la orina. ⁽⁶⁾

3.2.1 Efectos beneficiosos en el rendimiento cognitivo y el dolor

La estructura de la cafeína, similar a la de la adenosina, permite que se una a los receptores de adenosina y bloquee sus efectos. ⁽⁷⁾ La acumulación de adenosina en el cerebro inhibe la excitación y aumenta la somnolencia. En dosis moderadas (40 a 300 mg), la cafeína antagoniza los efectos de la adenosina, reduce la fatiga y aumenta el estado de alerta.

El consumo de cafeína también puede mejorar la vigilancia durante tareas de larga duración, como trabajar en una cadena de montaje, conducir a larga distancia y pilotar aviones. Estos efectos de la cafeína también se observan en personas que no la consumen habitualmente, y después de breves períodos de abstinencia en consumidores habituales.

Los beneficios del consumo de café para la esfera cognitiva se atribuyen a la cafeína. En apoyo de ello, la cafeína mejora las medidas de atención y aumenta las calificaciones de alerta. ⁽⁷⁾ Sin embargo, el café contiene más de 1 000 compuestos diferentes con potencial de afectar el comportamiento. La cafeína puede contribuir al alivio del dolor cuando se añade a los agentes analgésicos de uso común. Concretamente, un examen de 19 estudios demostró que 100 a 130 mg de cafeína añadidos a un analgésico aumentaban modestamente la proporción de pacientes que lograban aliviar el dolor.

3.2.2 Efectos sobre los síntomas de sueño, ansiedad y síndrome de abstinencia

Por sus efectos en la fatiga, el consumo nocturno de cafeína puede aumentar la latencia del sueño y reducir su calidad. ⁽¹⁾ Además, la cafeína puede inducir ansiedad, particularmente en dosis altas (>200 mg por ocasión o >400 mg por día), y en personas sensibles, incluidas las que padecen ansiedad o trastornos bipolares. Estas diferencias reflejan variaciones en el metabolismo del alcaloide, además de variantes en el gen de los receptores de adenosina. Dejar de consumir cafeína

después de un consumo habitual puede provocar síntomas de abstinencia: dolores de cabeza, fatiga, disminución del estado de alerta y depresión, y síntomas gripales en algunos casos. ⁽¹⁾ Estos suelen alcanzar su punto máximo dos días después de dejar de tomar cafeína, con una duración de dos a nueve días, y pueden reducirse disminuyendo gradualmente la dosis de cafeína.

3.3 HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

La cromatografía líquida HPLC, es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase móvil actúa como portador de la muestra, esta es inyectada en la columna, los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra, (ver anexo 1).

En la HPLC, un disolvente líquido que contiene la mezcla de las moléculas a identificar se hace pasar a través de una columna densamente empaquetada con pequeñas esferas de resina insoluble. Es necesario emplear bombas de alta presión de precisión, ya que la resina esta densamente empaquetada que el líquido debe ser bombeado a través de la columna a elevada presión.

Físicamente, una columna de HPLC es un tubo de acero inoxidable con un diámetro interno uniforme y dentro del cual se encuentra la fase estacionaria.

La HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan las fases móviles y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas

son: Las fuerzas de dispersión de London

Las interacciones dipolo

Las interacciones por puente de hidrógeno

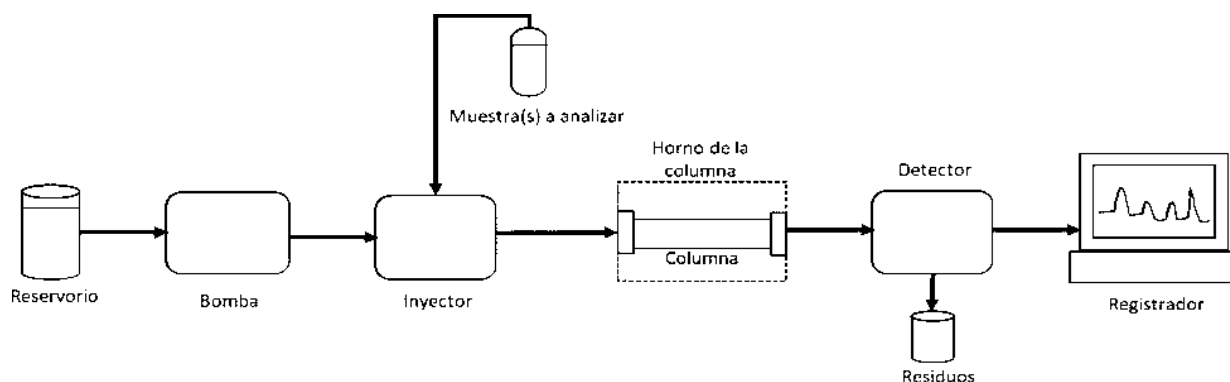


Figura N° 5: Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento.⁸

En el reservorio se encuentra la fase móvil. Esta fase consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración. La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5 μL y 5 mL.

El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados. El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de esta. Por otro lado, la columna está fabricada generalmente en acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria; además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10 μm .

Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna. El detector, ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla (solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados) y universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil). Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación.

Pretratamiento de la muestra teniendo claras las respuestas anteriores, se valora la posibilidad de que la muestra a analizar necesite un pretratamiento, las razones más usuales por las que la muestra requiere el pretratamiento son:

- Necesita dilución, neutralización o cualquier otro tipo de manipulación volumétrica.
- Es sólida y necesita ser disuelta o extraída.
- Contiene sólidos suspendidos o cualquier otra interferencia o sustancia tóxica que pueda dañar el equipo, por lo que necesitan ser removidos.
- Requiere una separación parcial, ya sea para concentrar los analitos en la muestra o eliminar contaminantes.

3.4 Requerimientos generales y físicos químicos para café soluble según la norma NSO 67.31.03:04

La Norma Técnica Salvadoreña NSO 67.31.03:04 se refiere a la "Determinación de cafeína en bebidas". Su propósito principal es establecer los métodos y procedimientos para medir la cantidad de cafeína en diferentes tipos de bebidas, garantizando la precisión y consistencia en los resultados. Esto es importante para asegurar que las bebidas cumplan con las especificaciones y regulaciones establecidas, además de proporcionar información precisa para los consumidores y fabricantes

- La materia prima para la elaboración del café soluble instantáneo debe cumplir con lo establecido en la NSO 67.31.01:02, ESTANDARES DE CALIDAD DEL CAFÉ ORO PARA LA COMERCIALIZACION NACIONAL E INTERNACIONAL.
- El café soluble instantáneo se puede aromatizar con aromas naturales de café recuperados en el mismo proceso.
- El café soluble instantáneo debe estar libre de partículas objetables o sustancias extrañas a éste, ya sean de origen vegetal, animal o mineral.
- El café soluble instantáneo se debe fabricar teniendo en cuenta las BUENAS PRACTICAS DEMANUFACTURA (BPM)

| Requisitos | En polvo | | Aglomerado (granulado) | | Liofilizado | |
|--|----------|--------|------------------------|--------|-------------|--------|
| | Mínimo | Máximo | Mínimo | Máximo | Mínimo | Máximo |
| Humedad. % (m/m) | - | 4 | - | 5,0 | - | 3,5 |
| Cafeína. % (base seca) | 2,3 | | 2,3 | | 2,3 | |
| Café soluble descafeinado % cafeína residual | - | 0,3 | - | 0,3 | - | 0,3 |
| pH de una solución al 1.5% masa/ volumen de la muestra | 4,9 | 5,3 | 4,9 | 5,3 | 4,9 | 5,3 |
| Solubilidad en minutos | | 3,0 | | 3,0 | | 3,0 |

Tabla N° 1: Requisitos fisicoquímicos para café soluble. ⁽¹⁰⁾

CAPÍTULO IV

4.0 PRODUCTO FINAL

El proyecto se centra en el planteamiento de una práctica de determinación para la cuantificación de cafeína en muestras de café soluble, utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como la técnica principal. Este método ha sido seleccionado debido a su viabilidad, precisión y facilidad de implementación en la determinación de compuestos específicos como la cafeína en matrices complejas.

El producto final está estructurado en varias secciones clave:

- Título de la práctica
- Introducción: Establece el contexto, la relevancia y los objetivos del estudio.
- Objetivos: Define los objetivos generales y específicos, enfocados a la aplicación del método HPLC para la determinación precisa de cafeína.
- Tipo de método de análisis y fundamento del Análisis: Describe los principios teóricos y técnicos subyacentes a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), justificando su elección para este tipo de análisis.
- Información sobre la muestra: describe información primordial de las muestras seleccionadas para el análisis como lote, fecha de vencimiento, fecha de fabricación, marca.
- Reactivos, Materiales y Equipos: Detalla los reactivos químicos, materiales de laboratorio y equipos utilizados, incluyendo las especificaciones técnicas del equipo HPLC.
- Procedimiento del Análisis: Expone el protocolo paso a paso seguido para la preparación de muestras, la calibración del equipo, y la ejecución del análisis, asegurando la reproducibilidad y precisión de los resultados.
- Cálculos: Explica los cálculos a efectuar para la cuantificación de la cafeína, basados en los datos cromatográficos y factores de calibración.
- Normativas Nacionales
- Referencias bibliográficas.

4.1 Introducción

La determinación de cafeína en sobres de café instantáneo es una práctica fundamental en el ámbito de la química analítica. La cafeína, un alcaloide presente en diversas plantas como el café y el té, es ampliamente consumida por sus efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central.

En este contexto, es de gran interés cuantificar la cantidad de cafeína presente en productos comerciales, como el café instantáneo, debido a su relevancia tanto en el campo de la salud como en la industria alimentaria. En términos teóricos, la cuantificación de la cafeína se basa en técnicas analíticas como la extracción y la espectrofotometría, que permiten aislar y medir la cantidad exacta de este compuesto.

Estos métodos están fundamentados en principios como la solubilidad, la interacción entre la cafeína y disolventes específicos, y la capacidad de detectar y medir su concentración a través de técnicas ópticas o cromatográficas.

En un contexto más amplio, estos análisis son esenciales para garantizar el control de calidad, asegurar la uniformidad en los productos y cumplir con las normativas sanitarias que regulan los niveles de cafeína en alimentos y bebidas.

El objetivo de la práctica es determinar de manera precisa y reproducible la cantidad de cafeína en muestras comerciales de café instantáneo, utilizando metodologías que simulan procedimientos estándar en laboratorios de control de calidad industrial.

4.2 Objetivos

- Cuantificar la cafeína en muestras comerciales de café instantáneo mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo las condiciones óptimas de separación y detección.
- Desarrollar habilidades prácticas en el manejo y operación del equipo HPLC, incluyendo la preparación de estándares, la inyección de muestras, la interpretación de cromatogramas y la comparación con estándares de referencia de cafeína.
- Comparar la variación de cafeína entre dos muestras de café de diferente marca y comparar con la normativa nacional.

4.3 Tipo de método de análisis.

Método de Análisis: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El método para la determinación de cafeína en sobres de café instantáneo es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Este es un método de separación y análisis cuantitativo de compuestos químicos que se caracteriza por su alta precisión, exactitud y sensibilidad, especialmente adecuado para la determinación de analitos como la cafeína en muestras complejas.

Fundamento del Método:

El HPLC se basa en la separación de los componentes de una mezcla a través de su interacción diferencial con una fase estacionaria y una fase móvil. En este proceso, la muestra de café instantáneo, previamente preparada, es inyectada en el sistema cromatográfico, donde pasa a través de una columna rellena con una fase estacionaria. La fase móvil, que suele ser una mezcla de solventes, es bombeada a alta presión a través de la columna, arrastrando los compuestos de la muestra.

4.4 Información general de la muestra

Tomar muestras de diferentes marcas de café soluble y anotar los datos siguientes:

- Marca Comercial:
- Lote:
- Fecha de Producción:
- Fecha de Expiración:
- Contenido de Cafeína Declarado por cada 2 g de café instantáneo
- Peso del Sobre:
- Ingredientes:

Condiciones de Almacenamiento:

- Temperatura de Almacenamiento:
- Humedad Relativa:

Envase:

Lugar de Almacenamiento:

- Propósito del Almacenamiento:

El almacenamiento adecuado garantiza la estabilidad de la muestra para su posterior análisis en el laboratorio, evitando la pérdida de compuestos volátiles y minimizando cualquier posible degradación de la cafeína que podría influir en los resultados obtenidos mediante el método HPLC.

4.5 Reactivos.

- Cafeína pura: para la preparación de las disoluciones patrón (1000 mg/L).
- Agua bidestilada: utilizada en la preparación de disoluciones y extracción de la cafeína.
- Óxido de magnesio (MgO): reactivo empleado en la extracción de cafeína de las muestras.
- Metanol: fase móvil utilizada en el HPLC.

4.6 Materiales y equipos.

4.6.1 Materiales

- Matraz Erlenmeyer: para la mezcla y calentamiento de las muestras.
- Filtros de celulosa regenerada (0.45 μm): para filtrar los extractos de cafeína.

- Pipetas volumétricas: para medir volúmenes precisos en la preparación de las disoluciones patrón.
- Centrífuga: utilizada para separar los sólidos después de la extracción.

4.6.2 Equipos

- HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución): equipo principal para el análisis y cuantificación de la cafeína.
- Columna C18 (1540 x 46 mm, 5 μ m): columna utilizada en el HPLC para la separación de la cafeína.
- Detector UV-Vis: para la detección de cafeína a 273 nm.
- Baño de agua: para calentar las muestras a 90°C durante el proceso de extracción.

4.7 Procedimiento de práctica de determinación.

Procedimiento Paso a Paso para el Análisis Fisicoquímico de Cafeína en Sobres de Café Instantáneo por HPLC

4.7.1 Preparación de las disoluciones patrón:

- Preparar una disolución madre de cafeína de 1000 mg/L.
- A partir de la disolución madre, preparar disoluciones patrón de 2, 10, 50, 100 y 250 ppm.
- Usar la fórmula de dilución $C_1V_1=C_2V_2$ para calcular los volúmenes necesarios. Ejemplo: Para obtener una disolución de 250 ppm, medir 25 mL de la solución madre y diluir con agua destilada hasta completar 100 mL.

4.7.2 Preparación del extracto de la muestra:

- Pesar 0.5 g de la muestra de café instantáneo.
- Colocar la muestra en un matraz Erlenmeyer.
- Añadir 0.5 g de óxido de magnesio (MgO) y 20 mL de agua bidestilada.
- Calentar la mezcla en un baño de agua a 90°C durante 20 minutos con agitación suave.

- Centrifugar la muestra y filtrar utilizando un filtro de celulosa regenerada de 0.45 μ m.

4.8 Condiciones Cromatográficas:

- Columna: C18 (1540 x 46 mm, 5 μ m).
- Detector: UV-Vis 273 nm.
- Fase Móvil A: Metanol.
- Fase Móvil B: Agua.
- Modo de Elución: Isocrático, con 25% de metanol.

4.9 Identificación de la Cafeína:

- Inyectar las disoluciones patrón en el HPLC.
- Identificar la cafeína en las muestras comparando el tiempo de retención (tR) de los patrones con los cromatogramas de las muestras.
- El tiempo de retención para la cafeína debe ser aproximadamente 2.20 minutos.

4.10 Cuantificación de la cafeína:

- Calcular las áreas de los picos correspondientes a la cafeína en las disoluciones patrón.
- Graficar las áreas frente a las concentraciones de las disoluciones patrón para obtener la recta de calibrado.
- Inyectar los extractos de las muestras en el HPLC bajo las mismas condiciones cromatográficas que los patrones.
- Calcular la concentración de cafeína en los extractos utilizando la ecuación de la recta de calibrado.

4.11 Cálculo de la concentración de cafeína en las muestras:

- Obtener el área del pico de la cafeína en las muestras y utilizar la ecuación de la recta de calibrado para calcular la concentración de cafeína en el extracto.
- Considerar la dilución aplicada y el protocolo de preparación para calcular la cantidad de cafeína en miligramos por gramo de café.

- Calcular la cantidad de cafeína por unidad de café instantáneo (2 g).

4.12 Resultados Finales:

- Determinar la cantidad de cafeína en las muestras de café analizadas.
- Comparar las concentraciones con la normativa NSO 67.31.03:04
- Recomendar replicar el análisis para obtener resultados más precisos.

4.13 Cálculos.

4.13.1 Cálculos para preparación del estándar:

Partimos de una disolución de cafeína 1000 mg cafeína/L, a partir de la cual preparamos una serie de disoluciones patrón que serán empleadas para la elaboración de la recta de calibrado. Las disoluciones de cafeína obtenidas a partir de esta disolución madre son 2, 10, 50, 100 y 250 ppm de cafeína.

Para eso se utilizará la fórmula: $C_1V_1=C_2V_2$

Por ejemplo, se calcula para la concentración de 250ppm.

Datos: $C_1=1000$ ppm, $C_2=250$ ppm $V_2=100$ mL

Cálculo:

$$1000\text{ppm} \times V_1 = 250\text{ppm} \times 100\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{250\text{mL} \times 100\text{ppm}}{1000\text{ppm}} = 25\text{mL}$$

-Mide 25 mL de la solución madre de 1000 ppm.

- Diluye con agua destilada hasta completar 100 mL.

Y así sucesivamente con las demás concentraciones de 2, 10, 50,100 ppm.

4.13.2 Cálculo de la Concentración de Cafeína en las Muestras:

Identificar el pico de cafeína en las muestras comparando el tiempo de retención (tR) con el de las disoluciones patrón. En el documento, el tiempo de retención es de aproximadamente 2.20 minutos.

- Obtener el área del pico correspondiente a la cafeína en los cromatogramas de las muestras.
- Utilizar la ecuación de la recta de calibrado obtenida en el paso 1 (Área = pendiente × Concentración + intercepto) para calcular la concentración de cafeína en las muestras.

| Patrón (ppm) | tR | Area |
|--------------|----|------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 10 | | |
| 25 | | |
| 50 | | |
| 100 | | |

Tabla N° 2: Tiempo de retención y área de los picos de los cromatogramas de los patrones de cafeína.

Fuente: Elaboración propia

- Realizar la gráfica de recta de calibrado obtenida con los datos de la tabla 2 para obtener la ecuación:

$$Y = m(x) + b$$

Donde el área es Y, y Concentración es “x”

| Muestras (ppm) | tR | Area |
|----------------|----|------|
| MX1 | | |
| MX2 | | |

Tabla N° 3: Documentar áreas de las muestras de café.

Fuente: Elaboración propia.

En base a las áreas obtenidas se sustituyen los valores de “y” (área) en la ecuación para encontrar la concentración de cafeína.

$$X = (y-b) / x$$

Ajuste de la Concentración Basado en el Volumen y Peso de la Muestra:

- Multiplicar la concentración obtenida por el volumen de disolución y ajustar por el peso de la muestra para obtener la cantidad de cafeína por gramo de café.
- Se tiene una concentración de (x mg/L) en el extracto, y se utilizó 0.5 g de muestra de café con un volumen de 20 mL, la concentración final de cafeína en mg por gramo de café es:

$$X = \left(\frac{\frac{\text{mg de cafeína}}{\text{L}} \times 0.020\text{L}}{0.5\text{g}} \right) \times \frac{1\text{mL}}{0.1\text{mL}} = \frac{\text{mg de cafeína}}{\text{g de café}}$$

Cálculo Final de la Cantidad de Cafeína por Unidad de Café:

Si cada sobre de café instantáneo contiene 2 g de café, la cantidad de cafeína por unidad de café se calcula multiplicando la concentración por gramo obtenida por la cantidad de café en el sobre:

$$\text{Cantidad de cafeína} = \frac{X}{\text{g de café}} \times 2\text{g} = \text{mg de café} \times \text{sobre de café instantáneo}$$

En base a la Norma Oficial Salvadoreña NSO 67.31.03:04 sobre café soluble instantáneo, el valor de contenido de cafeína mínimo es siguientes:

Cantidad mínima de cafeína (base seca): 2.3%, para una porción de 2g de café soluble, equivale a una cantidad mínima de cafeína de 46mg.

4.14 Referencia bibliográficas

- Carlin A, Dean B, Wong D, Cooney MJ. Determination of caffeine content in coffee using HPLC: Validation and interlaboratory comparison. *J Food Compos* . 2020;87:103389. doi: 10.1016/j.jfca.2020.103389.
- de Andrade SF, de Carvalho LM, Gomes CL, Lima LS, dos Santos AF, Siqueira EP. Determination of caffeine in coffee by high-performance liquid chromatography (HPLC) and UV detection. *Food Chem*. 2018; 239:701-706. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.154.
- Khoshnoud MJ, Abbaspour N, Moosavi SM. Caffeine determination in different brands of coffee and energy drinks using high-performance liquid chromatography. *J Chromatography Sci*. 2019;57(1):31-37. doi:10.1093/chromsci/bmy091.
- Campanella L, Bonanni A, Tomassetti M. Determination of caffeine content in coffee using high-performance liquid chromatography and spectrophotometry: A comparative study. *Anal Chim Acta*. 2017; 965:77-83. doi: 10.1016/j.aca.2017.03.031

CAPÍTULO V

5.0 CONCLUSIONES

1. Con base en la investigación realizada sobre la cantidad de cafeína reportada en estudios previos de las marcas de café más vendidas en El Salvador como “Consejo Salvadoreño del Café”, se concluye que los datos obtenidos de la literatura científica permiten establecer un rango promedio de contenido de cafeína en los productos disponibles en el mercado. Estos resultados proporcionan una base sólida para futuras investigaciones, así como para posibles regulaciones que aseguren la calidad y seguridad del consumo de café en el país:

Café arábica: entre 1.2% y 1.5% de cafeína

Café robusta: entre 2.2% y 2.7% de cafeína

En cuanto a café instantáneo, los sobres podrían tener entre 40 mg y 90 mg de cafeína por cada 100ml de café preparado, dependiendo de la marca y el método de extracción.

2. Algunos de los factores identificados pueden influir en la concentración de cafeína en el café instantáneo, a través del uso del HPLC y en bibliografía consultada como “Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales por Eva María Carral Universidad Politécnica de Catalunya (UPC)”; revela que variables como el tipo de especie de café, el proceso de tostado y los métodos de extracción pueden variar los niveles de cafeína en las muestras de café.
3. Se estableció un procedimiento por medio de revisión exhaustiva de bibliografía para la determinación de cafeína en sobres de café instantáneo; como “Determinación de cafeína en café mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por Ana López, Eva García y cristina fuentes; departamento de tecnología de alimentos; universidad politécnica de Valencia” y, así mismo, basado en la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

CAPÍTULO VI

6.0 RECOMENDACIONES

1. A los organismos normativos: Establecer un marco regulatorio que exija a los fabricantes de café instantáneo declarar de forma precisa y estandarizada la cantidad de cafeína presente en cada sobre o envase, con énfasis en una correcta dosificación para prevenir riesgos a la salud pública.
2. A los fabricantes de café instantáneo: Implementar controles de calidad más rigurosos en el proceso de producción, asegurando la consistencia en el contenido de cafeína entre diferentes lotes y marcas para reducir la variabilidad y proteger al consumidor de una ingesta excesiva o insuficiente.
3. A los laboratorios de análisis: Desarrollar metodologías analíticas robustas y reproducibles, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para cuantificar de manera exacta la cafeína en productos de café instantáneo y validar estos resultados de forma periódica.
4. A las autoridades de salud pública: Realizar campañas de concienciación sobre los efectos del consumo excesivo de cafeína, especialmente dirigidas a grupos vulnerables como embarazadas, personas con condiciones médicas preexistentes y consumidores habituales de café, promoviendo la lectura de las etiquetas y el consumo responsable.
5. A los organismos de certificación: Crear un sello de calidad o certificación para los productos de café instantáneo que cumplan con normativas claras sobre el contenido de cafeína y etiquetado adecuado, brindando a los consumidores confianza en la transparencia y seguridad del producto.
6. A las instituciones educativas: Fomentar la investigación en el área de alimentos y bebidas, específicamente en la determinación de sustancias bioactivas como la cafeína, contribuyendo al desarrollo de nuevas técnicas analíticas y regulaciones que mejoren la calidad y seguridad de los productos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aznar SC. Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales. Departamento de Química Industrial :Universitat Politècnica de Catalunya (UPC); 2011.
2. Van Dam RM, Hu FB, Willett WC. Coffee, Caffeine, and Health. *N Engl J Med*. 2020.
3. Moschino L, Zivanovic S, Hartley C, Trevisanuto D, Baraldi E, Roehr CC. Caffeine in preterm infants: where are we in 2020. *ERJ Open Res* 2020.
4. Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. Caffeine: An Overview of Its Beneficial Effects in Experimental Models and Clinical Trials of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020.
5. Bułdak RJ, Hejmo T, Osowski M, Bułdak L, Kukla M, Polaniak R, et al. The Impact of Coffee and Its Selected Bioactive Compounds on the Development and Progression of Colorectal Cancer In Vivo and In Vitro. *Molecules*. 2018.
6. Cui WQ, Wang ST, Pan D, Chang B, Sang LX. Caffeine and its main targets of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2020.
7. Mesa NY, Medrano J, Martínez ML, Grave de Peralta M, Cabrera Y. Efecto anticariogénico del café. *CCM [revista en Internet]*. 2017.
8. Haskell CF, Jackson PA, Forster JS, Dodd FL, Bowerbank SL, Kennedy DO. The Acute Effects of Caffeinated Black Coffee on Cognition and Mood in Healthy Young and Older Adults. *Nutrients*. 2018.
9. Daniela Suárez Ospina YMH. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Fundación Universidad de América; 2018
10. NSO. ESTANDARES DE CALIDAD. CAFÉ SOLUBLE INSTANTANEO. Colonia Médica, Avenida Dr. Emilio Alvarez, y Pasaje Dr. Guillermo Rodríguez Pacas # 51, San Salvador, El Salvador, Centro América.: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT;

ANEXOS

ANEXO N°1

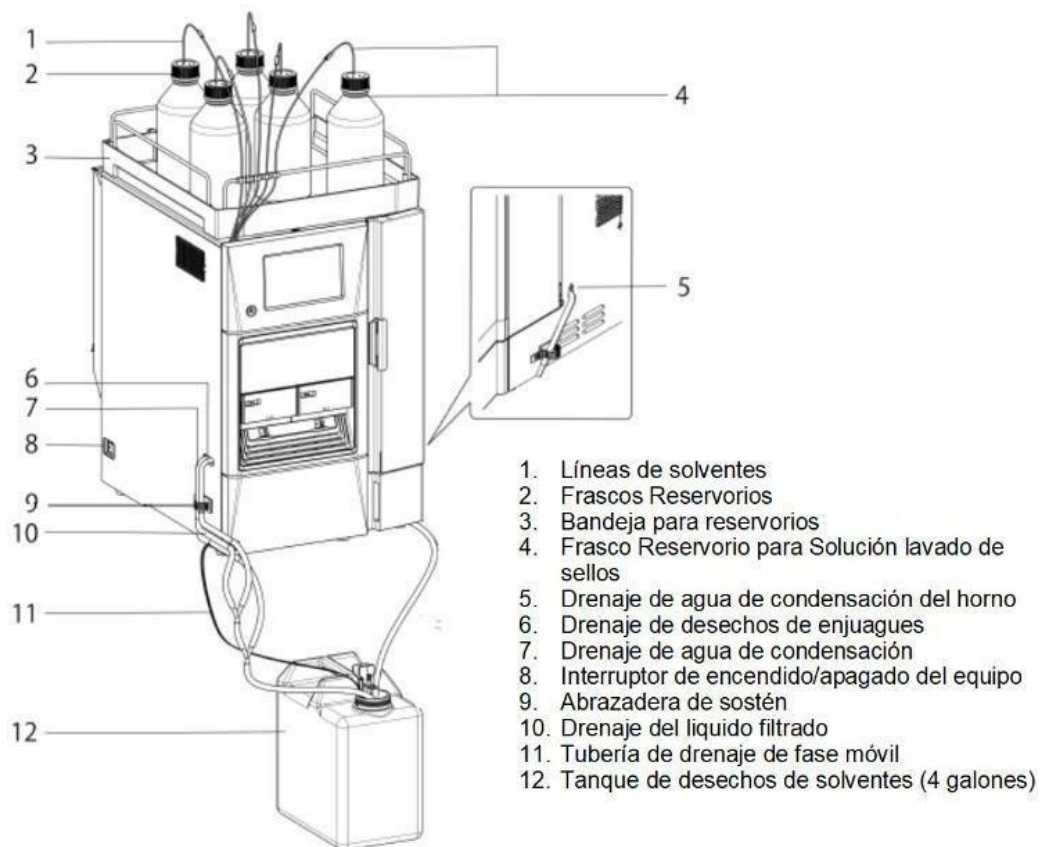
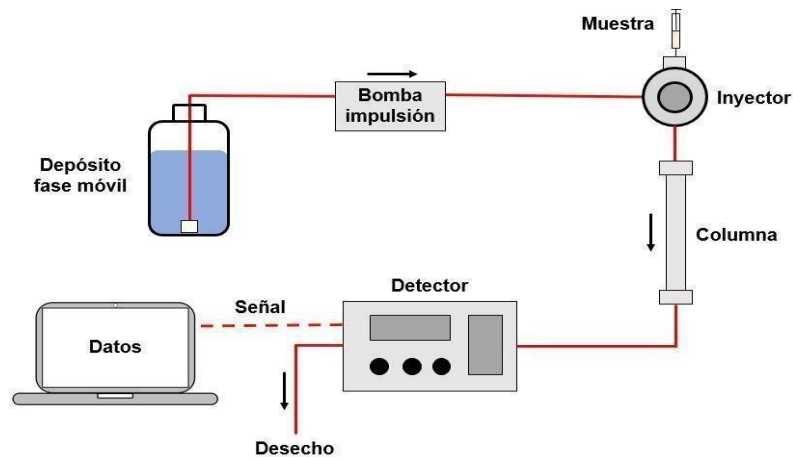


Figura N° 6: Esquema de un equipo HPLC y sus componentes.