

Universitat de Lleida

TREBALL FINAL DE GRAU



ESCOLA
POLITÈCNICA SUPERIOR
UNIVERSITAT DE LLEIDA
INSPIRING THE FUTURE

Estudiant: Pau Puente Mollfulleda

Titulació: Grau en Enginyeria Química

Títol de Treball Final de Grau: Extracció de cafeïna i àcid clorogènic del marro del cafè

Director/a: Dra. Rosa Cantero Gómez, Dra. Rita Puig Vidal

Presentació

Mes: Juny

Any: 2022

Resum

El cafè és un producte molt popular i important a escala mundial. Segons l'Organització Internacional del Cafè (ICO), s'estima que entre l'any 2019 i 2020 es van produir globalment 165 milions de sacs de 60 kg de cafè [1].

Com a conseqüència, aquesta indústria genera enormes quantitats de subproductes del cafè que suposen una pèrdua important de recursos. Per això, és crucial investigar mètodes de reciclatge i reutilització d'aquests residus.

El marro del cafè és el principal residu generat en la producció i consum de cafè. Per cada tona de cafè verd es generen aproximadament 650 kg de marro (al voltant de 2 kg de marro humit per cada kg de cafè soluble produït), el qual es descarrega normalment en el medi ambient [2].

Per a trobar una solució a aquesta qüestió, aquest treball pretén comparar diferents mètodes d'extracció emprant mescles de dissolvents etanol/aigua en distintes proporcions, per a extreure de manera òptima, del marro del cafè, dos components rellevants: l'àcid clorogènic i la cafeïna. Per a fer-ho, es realitzaran els següents mètodes d'extracció:

- a. Extracció amb vòrtex.
- b. Extracció amb ultrasons a temperatura ambient.
- c. Extracció amb ultrasons a 50 °C.

S'estudiaran com a dissolvent distintes mescles d'etanol/aigua amb els següents percentatges d'etanol: 0, 20, 40, 60, 80 i 96%.

Els resultats finals de l'estudi mostren que, per l'àcid clorogènic, l'extracció amb el mètode vòrtex i una mescla d'etanol/aigua 0% d'etanol com a dissolvent, és la que proporciona els millors resultats. En el cas de la cafeïna, la mescla d'etanol/aigua òptima és la del 60% d'etanol. S'obté d'aquesta manera 0,696 mg d'àcid clorogènic per cada gram del marro de cafè, i 1,065 mg de cafeïna per cada gram de marro de cafè.

Abstract

Coffee is a very popular and important product worldwide. According to the International Coffee Organization (ICO), an estimated 165 million bags of 60 kg of coffee were produced globally between 2019 and 2020 [1].

As a result, this industry generates huge amounts of coffee by-products, which are a great source of pollution and a threat to the environment. To avoid this, it is important to research recycling and reusing methods to avoid or greatly reduce this environmental problem.

Spent coffee grounds are the main waste generated in the production and consumption of coffee. Approximately 650 kg of them is generated for each tonne of green coffee (about 2 kg of wet spent coffee ground for every kg of instant coffee produced), which is normally discharged into the environment, being a major source of pollution [2].

To find a solution to this problem, the aim of this project is to compare different extraction methods and different solvent concentrations, in order to optimally extract two important components which are normally dumped: chlorogenic acid and caffeine. In order to do this, the following extraction methods will be performed:

- a. Vortex extraction.
- b. Ultrasound extraction at room temperature.
- c. Ultrasound extraction at 50 °C.

In addition, different ethanol/water mixtures with the following percentages of ethanol will be studied as a solvent: 0, 20, 40, 60, 80, and 96%.

The final results of the study show that, for chlorogenic acid, extraction with the vortex method and a mixture of ethanol/water 0% ethanol as solvent is the one that provides the best results. In the case of caffeine, the optimal ethanol/water mixture is 60% ethanol. In this way, 0.696 mg of chlorogenic acid is obtained for every gram of spent coffee ground, and 1.065 mg of caffeine for every gram of spent coffee ground.

Índex

Resum.....	1
Abstract	2
Antecedents.....	7
Objectius.....	9
1. Introducció.....	10
2. Marc teòric.....	11
2.1. Components químics	11
2.1.1. Hidrats de carboni	11
2.1.2. Lignina	12
2.1.3. Lípids	13
2.1.4. Proteïnes	13
2.1.5. Cafeïna	13
2.1.6. Àcid clorogènic	14
2.2. Mètodes d'extracció	15
2.2.1. Extracció sòlid-líquid amb vòrtex	15
2.2.2. Extracció sòlid-líquid per ultrasons	15
2.3. Cromatografia Líquida D'alta Resolució (HPLC)	17
3. Part experimental.....	19
3.1. Materials i mètodes	19
3.1.1. Mètodes d'extracció	19
3.1.1.1. Extracció vòrtex	19
3.1.1.2. Extracció per ultrasons	20
3.1.2. Mètode de quantificació per HPLC.....	20
3.2. Experiments inicials per a establir condicions	21
3.2.1. Condicions de la fase mòbil.....	21
3.2.1.1. 90:10 aigua:acetonitril	22
3.2.1.2. 92:8 aigua:acetonitril.....	23
3.2.1.3. 93:7 aigua:acetonitril.....	24
3.2.1.4. 93:7 aigua:acetonitril, amb gradient	26
3.2.1.5. Conclusió final fase mòbil	27
3.2.2. Conservació del marro de cafè i mètode d'assecatge.....	28

3.2.3.	Patró de cafeïna dissolt amb aigua o amb mescles d'etanol/aigua	29
3.2.4.	Dilució mostres extretes amb etanol superior a 60%	30
3.2.5.	Dopatge de les mostres amb clorogènic.....	33
3.2.6.	Conclusions dels experiments inicials.....	34
3.3.	Rectes de calibratge.....	36
3.3.1.	Recta calibratge de la cafeïna.....	36
3.3.2.	Recta de calibratge de l'àcid clorogènic	38
3.4.	Extraccions amb vòrtex	39
3.4.1.	Àcid clorogènic	39
3.4.2.	Cafeïna	40
3.5.	Extraccions amb ultrasons	42
3.5.1.	Àcid clorogènic	42
3.5.2.	Cafeïna	44
3.6.	Comparació dels diferents mètodes d'extracció.....	46
4.	Conclusions	47
5.	Bibliografia	49
ANNEX 1.	Comptabilització de pics de clorogènic.....	51

Índex imatges

Imatge 1: Parts del gra de cafè.	10
Imatge 2: Estructura química de la cel·lulosa.....	11
Imatge 3: Estructura química de l'arabinosa, galactosa i manosa (d'esquerra a dreta).12	
Imatge 4: Exemple d'un polímer de lignina.....	12
Imatge 5: Estructura química de la cafeïna.....	14
Imatge 6: Estructura química de l'àcid clorogènic.....	14
Imatge 7: Principi de l'extracció amb ultrasons.	15
Imatge 8: Diagrama dels components de l'HPLC [26].....	17
Imatge 9: Elements del cromatograma [26].	18
Imatge 10: Diagrama de la separació de les mostres en la columna [27].	18
Imatge 11: Tub d'assaig després de la centrifugació.	19
Imatge 12: HPLC patró cafeïna (300 ppm). Fase mòbil 92:8.	21
Imatge 13: HPLC patró àcid clorogènic (200 ppm). Fase mòbil 92:8.....	21
Imatge 14: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol. Fase mòbil 90:10.	22
Imatge 15: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 90:10.	22
Imatge 16: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol. Fase mòbil 90:10.	23
Imatge 17: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol. Fase mòbil 92:8.	23
Imatge 18: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 92:8.	24
Imatge 19: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol. Fase mòbil 92:8.	24
Imatge 20: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol. Fase mòbil 93:7.	25
Imatge 21: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 93:7.	25
Imatge 22: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol. Fase mòbil 93:7.	25
Imatge 23: Extracció amb aigua. Fase mòbil 93:7.	26
Imatge 24: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 93:7 (gradient).	26
Imatge 25: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol. Fase mòbil 93:7 (gradient).	27
Imatge 26: Superposició patrons cafeïna (300 ppm) 0% (vermell), 40% (blau) i 80% (negre) etanol	29
Imatge 27: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol, diluït 1:1. Fase mòbil 93:7.	30
Imatge 28: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol, diluït 1:1. Fase mòbil 93:7.....	30
Imatge 29: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol, diluït 1:2. Fase mòbil 93:7.....	31
Imatge 30: Extracció mescla etanol/aigua 80% etanol, diluït 1:2. Fase mòbil 93:7.....	31
Imatge 31: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol, diluït 1:2. Fase mòbil 93:7.....	31
Imatge 32: Comparació extracció mescla etanol/aigua 60% etanol 1:2 (negre) i sense diluir (blau).	32
Imatge 33: Comparació extracció mescla etanol/aigua 80% etanol 1:2 (blau) i sense diluir (negre).	32
Imatge 34: Comparació extracció mescla etanol/aigua 96% etanol 1:2 (blau) i sense diluir (negre).	32
Imatge 35: Àcid quínic (esquerra), àc. 3-O-cafeoilquínic (centre), àc. 3-O-feruloilquínic (dreta).....	33
Imatge 36: Comparativa dopatge amb patró (negre) i sense dopar (blau).	34

Imatge 37: Recta de calibratge cafeïna (96-600 ppm).....	36
Imatge 38: Recta de calibratge cafeïna (1,2-120 ppm).....	37
Imatge 39: Recta de calibratge àcid clorogènic.....	38

Índex taules

Taula 1: Composició química del marro del cafè [13].	11
Taula 2: Comparació concentracions del marro amb el pas del temps.....	28
Taula 3: Comparació de l'àrea entre assecat natural i amb estufa (0% etanol).	28
Taula 4: Comparació de l'àrea entre assecat natural i amb estufa (40% etanol).	29
Taula 5: Temps de retenció i àrea dels patrons.	29
Taula 6: Comparativa pics d'àcid clorogènic	34
Taula 7: Resultats de la recta de calibratge de la cafeïna (96-600 ppm).....	36
Taula 8: Resultats de la recta de calibratge de la cafeïna (1,2-120 ppm).....	37
Taula 9: Resultats de la recta de calibratge de l'àcid clorogènic.....	38
Taula 10: Resultats massa d'àcid clorogènic en vòrtex.	39
Taula 11: Resultats massa de cafeïna en vòrtex.....	40
Taula 12: Resultats d'àcid clorogènic en ultrasons, a T ambient.	42
Taula 13: Resultats d'àcid clorogènic en ultrasons, a 50 °C.	43
Taula 14: Resultats de cafeïna en ultrasons, a T ambient.....	44
Taula 15: Resultats de cafeïna en ultrasons, a 50 °C.	44
Taula 16: Comparació massa d'àcid clorogènic extreta segons mètode d'extracció.	46
Taula 17: Comparació massa de cafeïna extreta segons mètode d'extracció.	46
Taula 18: Comparació de concentració en les diferents comptabilitzacions de pics.....	51
Taula 19: Comparació de massa en les diferents comptabilitzacions de pics.	52

Índex gràfics

Gràfic 1: Massa d'àcid clorogènic en vòrtex.....	40
Gràfic 2: Massa de cafeïna en vòrtex.....	41
Gràfic 3: Massa d'àcid clorogènic en ultrasons.	43
Gràfic 4: Massa de cafeïna en ultrasons.	45
Gràfic 5: Comparació diferents mètodes d'extracció.	46

Antecedents

Aquest treball de fi de grau pretén complementar un estudi anterior també sobre l'extracció de l'àcid clorogènic i la cafeïna, de l'estudiant Leonardo Dos Santos Lopes. Aquest es va dur a terme mitjançant dos mètodes diferents:

- a. Amb el mètode vòrtex es van realitzar dues extraccions diferents, segons el dissolvent. La primera amb SUPRAS (dissolvents supramoleculars, concretament una mescla d'aigua, etanol i hexanol) i la segona amb aigua com a dissolvent.
- b. Amb el mètode d'ultrasons es van realitzar dues extraccions amb ultrasons utilitzant aigua com a dissolvent, una a 50 °C i l'altra a temperatura ambient.

Els resultats més bons es van donar amb el mètode d'ultrasons a temperatura ambient, utilitzant aigua com a dissolvent. Es van obtenir 1,154 mg d'àcid clorogènic per cada gram de marro de cafè i 0,972 mg de cafeïna per cada gram de marro [3].

A continuació es troben descrits els estudis més rellevants realitzats emprant diferents tècniques d'extracció i distints dissolvents, que apareixen recollits en la cerca bibliogràfica realitzada en el TFG d'en Leonardo.

Les dades reportades depenen de diversos factors, com els tipus de dissolvents, temperatures d'extracció, tipus de marro de cafè o diferents processos de preparació. Els resultats venen donats en equivalents d'àcid gàl·lic (EAG), una mesura que fa servir l'àcid gàl·lic com a patró per determinar el contingut de fenols totals.

L'estudi amb els millors resultats es va dur a terme utilitzant com a dissolvent una mescla d'etanol/aigua del 20% d'etanol, sota 40 segons de radiació de microones (80 W). Es van obtenir un total de 398,95 mg EAG/g. Aquest mètode va ser molt eficaç, a causa de la quantitat d'analits extrets i l'estalvi de temps i productes químics [4].

Cal destacar també un estudi on es van comparar dos mètodes diferents. El primer va consistir a desgreixar el marro mitjançant una extracció Soxhlet (durant 5 hores), utilitzant n-hexà com a dissolvent. L'altre va consistir en una extracció amb una mescla d'etanol/aigua del 50% d'etanol. Els resultats van ser 273,34 mg EAG/g en la mescla d'etanol/aigua i 255,61 mg EAG/g en el marro desgreixat amb el mètode de Soxhlet [5].

En un altre estudi es va utilitzar l'extracció d'aigua subcrítica (SWE), també anomenada extracció d'aigua calenta a pressió. Els avantatges de l'SWE inclouen la reducció del consum de dissolvents orgànics, un funcionament simplificat, i un sistema respectuós amb el medi ambient. Es va usar aigua com a dissolvent, durant 55 min, a 177 °C. Els resultats van ser de 86,23 mg EAG/g [6].

Finalment, remarcar l'estudi dut a terme utilitzant l'autohidròlisi, que és una tecnologia ecològica que utilitza només aigua com a dissolvent d'extracció. Les condicions òptimes van ser durant 50 min a 200 °C. Els resultats van ser de 40,36 mg EAG/g [7].

Per altra banda, cal destacar-ne els que fan referència als anàlisis estudiats en aquest treball individualment, tant de cafeïna com d'àcid clorogènic.

El primer d'aquests es va dur a terme mitjançant una extracció líquida pressuritzada. Es van comparar 10 grans de cafè diferents. Les condicions òptimes en les quals es va treballar van ser: una temperatura de 195 °C, una mescla d'extracció d'etanol/aigua 70% etanol, i 10 minuts de temps d'extracció. Els resultats més rellevants van ser de 9,67 mg de cafeïna per gram de marro, i 213,98 mg d'àcid clorogènic per gram de marro [8].

El següent estudi pretenia estudiar el contingut total de components fenòlics i d'àcid clorogènic. Es va fer mitjançant el mètode d'ultrasons, amb unes condicions òptimes de 50 °C, durant una hora i amb una mescla de dissolvent d'etanol/aigua del 60% d'etanol. Els resultats més rellevants van ser de 0,93 mg d'àcid clorogènic per gram de marro [9].

Finalment, l'últim estudi a destacar es centrava en la quantificació de compostos fenòlics, flavonoides i àcid clorogènic. Aquest també es va dur a terme mitjançant una extracció amb ultrasons, amb unes condicions òptimes de 34 minuts, a 40 °C, i 60% de metanol en una relació dissolvent/sòlid de 40 ml/g de marro de cafè. Els resultats finals van ser de 1,43 mg d'àcid clorogènic per gram de marro [10].

Com a conclusió d'aquest estudi bibliogràfic, es va veure que els resultats obtinguts per diferents autors no eren comparables, variaven molt en funció del tipus de marro utilitzat, tant pel que fa a la família de cafè (aràbica, robusta o mesclades) com al procés d'obtenció de la infusió (la tassa de cafè).

Objectius

És per això que l'objectiu principal d'aquest treball és comparar diferents dissolvents i mètodes d'extracció, utilitzant el mateix marro de cafè, per observar quin és el millor a l'hora d'extreure l'àcid clorogènic i la cafeïna.

S'han estudiat 3 mètodes d'extracció utilitzant diferents barreges d'etanol i aigua com a dissolvent. Els tres mètodes són: l'agitació mitjançant vòrtex i l'extracció amb ultrasons a temperatura ambient i a 50 °C.

Per a quantificar els resultats s'ha usat una cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), per la qual es va haver de trobar una fase mòbil adequada i temps de procediment que permetessin separar bé els pics i quantificar els anàlits.

1. Introducció

El cafè és una beguda estimulants obtinguda del seu fruit i de les llavors, que contenen cafeïna, de gust amargant i estimulants. El cafè és la segona mercaderia més comercialitzada al món després del petroli.

A partir del fruit del cafè, les llavors (o gra) són separades per produir el cafè verd sense torrar. A continuació es torra esdevenint cafè torrat, es mol a fines partícules que són usades tradicionalment amb aigua bullent, són filtrades, i finalment produeixen el cafè.

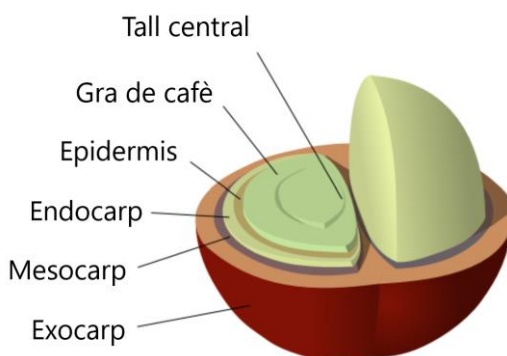
Els dos tipus de gra de cafè més cultivats són *Coffea arabica* i *Coffea robusta*, coneguts comunament com a aràbica i robusta, respectivament. Les plantes de cafè es conreen a més de 70 països, principalment a les regions equatorials d'Amèrica, el sud-est asiàtic, el subcontinent indi i a l'Àfrica. A partir del 2018, Brasil va ser el principal productor de grans de cafè, produint el 35% del total mundial.

Una de les diferències més significatives entre els cafès aràbica i robusta està en el contingut de cafeïna. Els cafès robusta contenen gairebé el doble de cafeïna que els aràbica, fet que provoca que el sabor del robusta sigui més amargant. Això comporta que els aràbica siguin els més estesos al mercat pel seu millor gust. No obstant, el cafè robusta és molt més resistent a les plagues i es pot cultivar en altituds molt més baixes. Això vol dir que el cafè robusta és molt més fàcil de cultivar i barat de produir.

Hi ha algunes altres diferències reconegudes fins ara: els robusta gairebé no contenen sacarosa, però sí proporcions més elevades de fenols i hidrats de carboni complexos (tan solubles com hidrolitzables), en comparació amb els aràbigues. Els grans de robusta també contenen aproximadament el doble de concentració d'àcid clorogènic, un important antioxidant polifenòlic [11].

El fruit del cafè està format per les següents parts (*Imatge 1*):

- Exocarp (polpa, closca): capa externa que protegeix i envolta el fruit.
- Mesocarp: Ric en sucres, format per més de 20 capes de cèl·lules cobrint el gra.
- Endocarp: Una de les dues capes que protegeix el gra, de consistència dura.
- Epidermis: Envolta la llavor o gra.
- Gra de cafè: Part que es comercialitza. N'hi ha dos per cada fruit de cafè.
- Tall central: localitzat a l'interior de la llavor.



Imatge 1: Parts del gra de cafè.

2. Marc teòric

En aquest apartat s'expliquen a nivell teòric els diferents components químics del marro del cafè, així com la seva composició. També els fonaments teòrics dels dos mètodes de separació que s'utilitzen en l'estudi (extracció sòlid-líquid per vòrtex i ultrasons), i finalment, en què consisteix la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

2.1. Components químics

El marro és el residu del cafè. Té una mida de partícula fina i una alta humitat (entre el 80 i 85%) quan es genera [12]. S'ha demostrat que, gràcies als seus components, té un gran poder antioxidant. Aquests varien segons el tipus de planta, les diferents ubicacions geogràfiques, edats, clima i condicions del sòl [2].

En la *Taula 1* es mostren els principals components químics del marro del cafè.

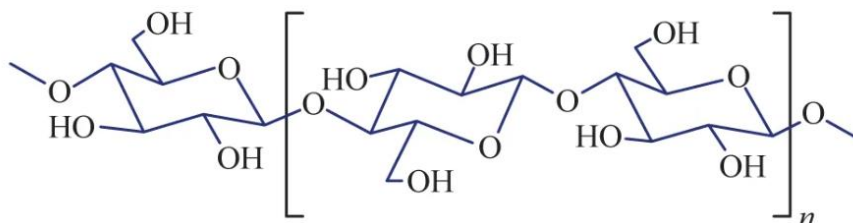
Component químic	Composició (% pes)
Cel·lulosa	32 – 42
Hemicel·lulosa	7 – 13
Lignina	0 – 26
Lípids	2 – 24
Proteïnes	10 – 18
Cafeïna	0 – 0,4
Àcid clorogènic	1 – 3
Fibres totals	21 – 59

Taula 1: Composició química del marro del cafè [13].

2.1.1. Hidrats de carboni

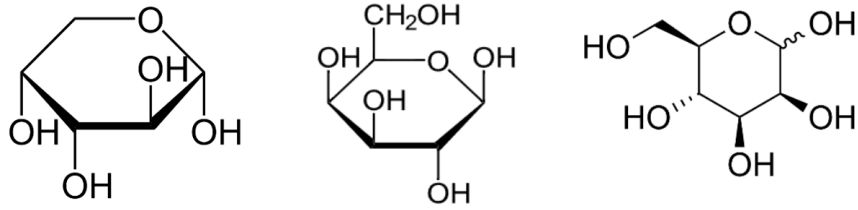
En el marro del cafè, els components químics més abundants són els hidrats de carboni (entre 39% i 55% en massa del total). Aquests es divideixen en cel·lulosa i hemicel·lulosa.

La cel·lulosa (*imatge 2*) és un hidrat de carboni complex o polisacàrid lineal, format per 3.000 o més unitats de glucosa. És el constituent estructural majoritari de les parets cel·lulars de les plantes, que proporciona força i rigidesa [14].



imatge 2: Estructura química de la cel·lulosa.

L'hemicel·lulosa (*imatge 3*), en canvi, és un polisacàrid heterogeni ramificat, format per diferents unitats de monosacàrids. En el cas del marro del cafè, conté arabinosa, manosa i galactosa.

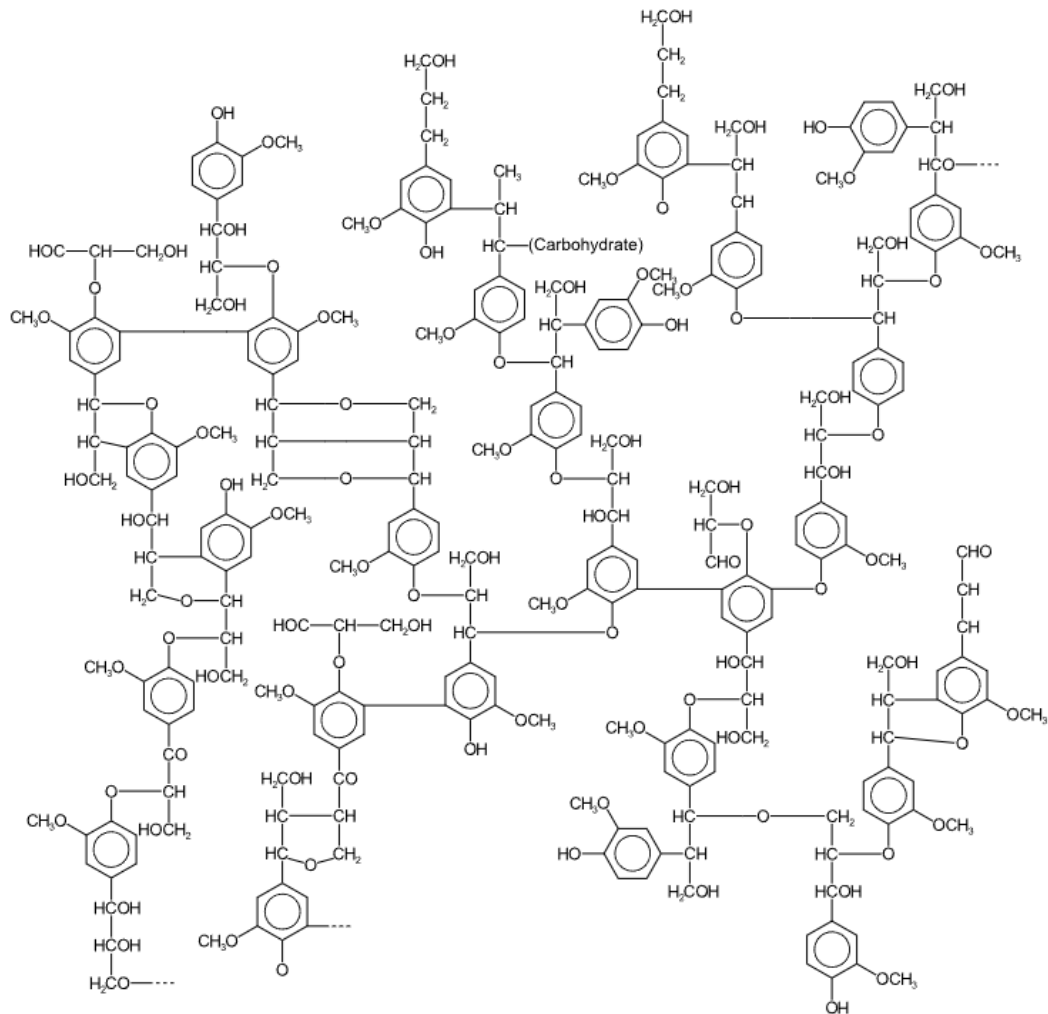


Imatge 3: Estructura química de l'arabinosa, galactosa i manosa (d'esquerra a dreta).

2.1.2. Lignina

La lignina (*Imatge 4*) és un tipus de polímer orgànic complex, o biopolímer, que conforma la paret cel·lular de les plantes (fusta i escorça) amb una disposició en forma de xarxa, aportant rigidesa.

Aquests polímers generen estructures amb un pes molecular d'entre 2.500 i 39.000 u, i es sintetitza a partir de l'extracció de l'aigua dels sucres (forma un complex aromàtic). Cal destacar que és l'única fibra existent que no és un polisacàrid [15]. Juntament amb la cel·lulosa i l'hemicel·lulosa és dels components majoritaris en el marro del cafè.



Imatge 4: Exemple d'un polímer de lignina.

2.1.3. Lípids

Els lípids constitueixen un grup químicament divers amb la característica comuna de la insolubilitat en l'aigua. Les seves funcions biològiques són tan diverses com la seva química. En molts organismes, les grasses i els olis són les formes principals d'emmagatzematge energètic, mentre que els fosfolípids i esterols constitueixen els principals elements estructurals de les membranes biològiques. Altres lípids, presents en quantitats més petites, tenen funcions vitals tals com cofactors enzimàtics, transportadors electrònics, pigments que absorbeixen la llum, hormones, etc. [14]

La fracció lipídica del cafè està composta principalment per triacilglicerols, esterols i tocoferols. Aquesta depèn en gran mesura del tipus de cafè (aràbica o robusta) i l'entorn del gra (tipus de torrat, temperatura i clima d'emmagatzematge, etc.).

El cafè conté entre un 7 i un 17% de lípids. La majoria d'aquests es troben en l'endosperma (interior del gra) [16].

2.1.4. Proteïnes

Una proteïna és una substància natural que consisteix en la unió d'aminoàcids mitjançant enllaços peptídics. Aquestes intervien en pràcticament tots els processos que tenen lloc en la cèl·lula i exerceixen una enorme diversitat de funcions. Són les macromolècules biològiques més abundants i estan presents en totes les cèl·lules i en totes les seves parts.

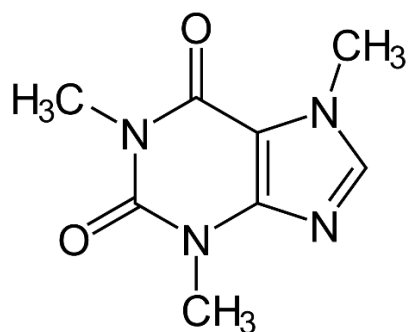
Segons la conformació dels aminoàcids, es poden crear productes com enzims, hormones, anticossos, fibres musculars, etc. També, són els instruments mitjançant els quals s'expressa la informació genètica [14].

En el marro del cafè s'hi troba una petita part de proteïnes (entre 10% i 18% de la massa total). En un estudi es van analitzar les dades sobre el contingut d'aminoàcids. Els principals eren l'àcid glutàmic, la treonina, l'àcid aspàrtic i la leucina. En un altre estudi, però, els aminoàcids predominants van ser la leucina, valina i isoleucina [17].

2.1.5. Cafeïna

La cafeïna (*imatge 5*) és un alcaloide vegetal, que es troba en nombroses espècies vegetals, on actua com un plaguicida natural que paralitza i mata certs insectes que s'alimenten d'ells. Les plantes que contenen cafeïna són el cafè, el te i el cacau.

La cafeïna és un estimulants del sistema nerviós central i metabòlic, i s'utilitza tant a nivell recreatiu com mèdic per reduir la fatiga física i restaurar l'alerta mental quan es produeix una debilitat o somnolència inusuals. També provoca un augment de l'alerta i la vigília, un flux de pensament més ràpid i més clar, un augment de l'enfocament i una millor coordinació corporal general [18].

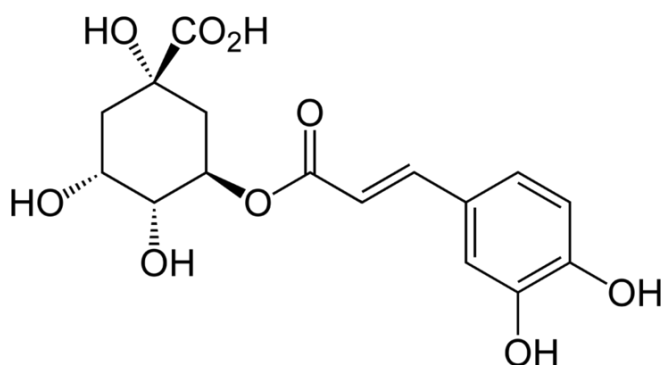


Imatge 5: Estructura química de la cafeïna.

2.1.6. Àcid clorogènic

L'àcid clorogènic (*Imatge 6*) és un èster de l'àcid cafeïc i l'àcid quínic. És un dels principals compostos fenòlics del cafè i la seva ingesta diària dels consumidors de cafè és de 0,5 a 1 g [19].

Té potencials activitats antioxidants i quimiopreventives. L'àcid clorogènic elimina els radicals lliures, fet que provoca una inhibició del dany de l'ADN i protegeix contra la inducció de la carcinogènesi. A més, aquest agent pot regular l'expressió dels gens implicats en l'activació del sistema immunitari i millorar l'activació i la proliferació de limfòcits T, macròfags i cèl·lules assassines naturals. També pot reduir els nivells de sucre en sang i potencialment exercir un efecte antidiabètic [20].



Imatge 6: Estructura química de l'àcid clorogènic.

2.2. Mètodes d'extracció

A continuació s'expliquen els fonaments teòrics dels mètodes de separació utilitzats.

2.2.1. Extracció sòlid-líquid amb vòrtex

L'operació d'extracció sòlid-líquid és una operació bàsica en l'enginyeria química i a escala industrial. Un exemple d'aquest tipus d'operació és l'extracció de sucre de les canyes utilitzant aigua com a dissolvent.

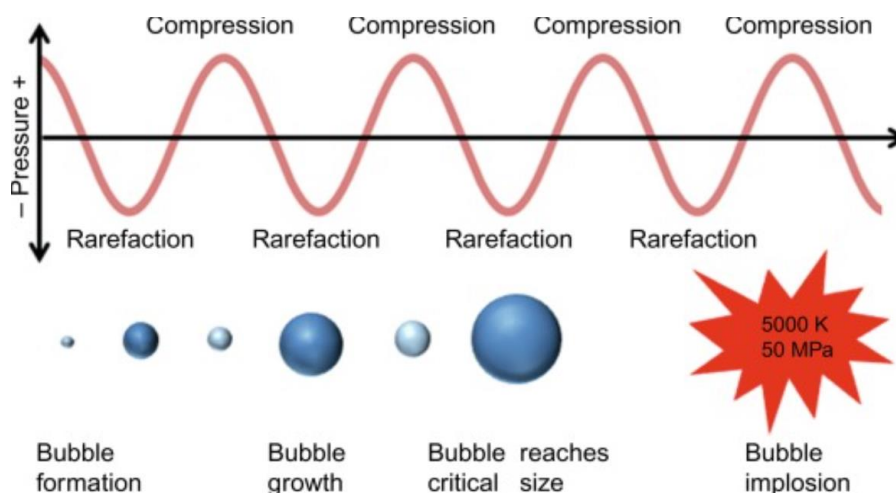
Consisteix en una transferència de massa, on es recupera o s'extreu un o més components (solut) d'una fase sòlida heterogènia, en una fase líquida (dissolvent). El sentit de la transferència és sempre des del sòlid cap al líquid. Un cop s'ha deixat el temps adequat, es separen les fases; la fase sòlida inerta o residu, i el dissolvent amb els soluts extrets (extracte) [21].

Per a facilitar aquesta transferència s'utilitza un aparell anomenat mesclador vòrtex. Aquest és un instrument de laboratori que combina de manera intel·ligent l'oscil·lació i el vòrtex. Es pot aplicar a una varietat d'operacions de mescla i agitació, fent que l'experiment sigui més còmode i ràpid.

Aquest aparell genera un vòrtex en l'interior del tub d'assaig, per aconseguir barrejar completament la solució. Així mateix, barreja completament les fases del tub d'assaig, incloses les petites restes que es puguin quedar en les parets del tub [22].

2.2.2. Extracció sòlid-líquid per ultrasons

El mètode d'ultrasons està basat en la propagació d'ones sonores mecàniques conformada per un conjunt de cicles, definits com la combinació d'altres i baixes pressions, anomenades compressions i rarefaccions, respectivament.



Imatge 7: Principi de l'extracció amb ultrasons.

Les compressions i rarefaccions generen un mecanisme de fragmentació, atribuït a les col·lisions entre les partícules i les ones ultrasòniques, causant la reducció en la mida de la partícula i facilitant la transferència de massa.

Un altre mecanisme és el d'erosió, que ajuda a millorar l'accessibilitat del dissolvent mitjançant la implosió de les bombolles en la mostra.

A l'espectre d'ones implicades en l'ultrasò se'ls anomena ones ultrasòniques, les freqüències de les quals es troben per sobre de l'interval audible (>20 kHz) i per sota de les freqüències de microones (fins a 10 MHz).

Les principals característiques de l'ona d'ultrasons són les següents:

- a. Longitud: distància entre dos punts de compressió o rarefacció.
- b. Amplitud: alçada màxima d'una ona.
- c. Freqüència (Hz): nombre de cicles per unitat de temps.
- d. Velocitat (m/s): producte de la freqüència per la longitud d'ona.
- e. Potència (W): quocient entre l'energia transportada i el temps considerat.
- f. Intensitat (W/cm^2): quocient d'una unitat de potència mitjançant una unitat d'àrea.

Els ultrasons es poden utilitzar com a eina per a l'extracció de diferents components. Un sistema habitual d'ultrasons consisteix en una sonda ultrasònica immersa directament a la cambra d'extracció. L'extracció per ultrasons té un ampli espectre d'utilitats, des de la indústria alimentària, la farmacèutica, d'anàlisi, etc. [23]

2.3. Cromatografia Líquida D'alta Resolució (HPLC)

La paraula cromatografia significa literalment “escriure en colors”, ja que quan es va desenvolupar, els components separats eren colorants. Es tracta d'una tècnica o mètode físic de separació de dos o més soluts presents en una mescla, basada en la velocitat de desplaçament d'aquests. En ella participen dues fases, una mòbil (líquida o gasosa) i una altra estacionària (sòlida o líquida) [24].

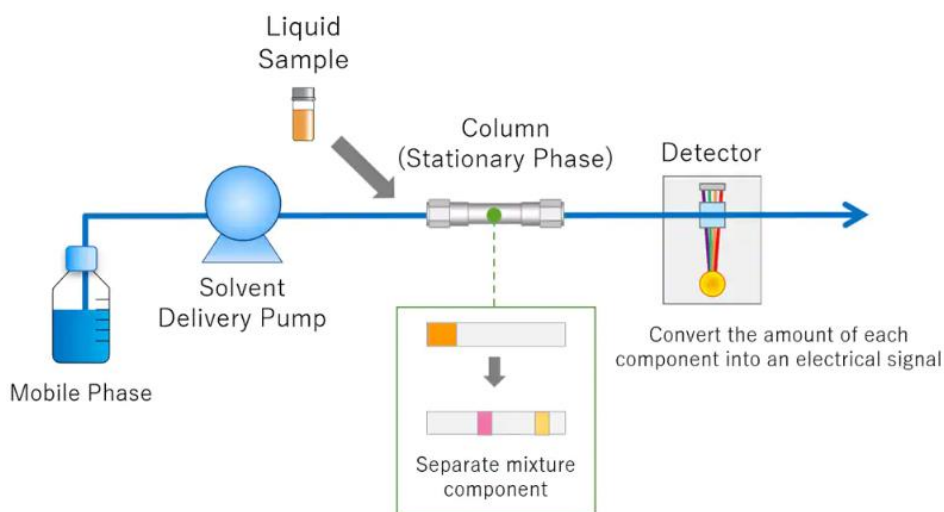
En aquest mètode, una bomba força un dissolvent a través d'una columna sota altes pressions de fins a 400 atmosferes. El material de la columna (fase adsorbent o estacionària) és normalment granular, fet de partícules sòlides com sílice o polímers.

La pressió fa que la tècnica sigui molt més ràpida en comparació amb el mètode antic de cromatografia en columna. Això permet utilitzar partícules molt més petites per al material de la columna. Les partícules més petites tenen una superfície molt més gran per a les interaccions entre la fase estacionària i les molècules que hi flueixen, fet que es tradueix en una molt millor separació dels components de la mescla.

El líquid introduït a pressió es coneix com a fase mòbil, i normalment és una barreja de dissolvents com aigua, acetonitril o metanol, entre d'altres. La bomba proporciona el cabal i la composició desitjats de la fase mòbil a través de la columna.

Els components d'una mescla es separen entre si a causa dels seus diferents graus d'interacció amb les partícules absorbents. Això provoca diferents velocitats d'elució per als diferents components i condueix a la separació dels components a mesura que surten de la columna [25].

Després que es produeixi la separació a la columna, els components de la mescla passen pel detector. Aquest genera un senyal elèctric proporcional a la quantitat de components de mostra i s'envia al microprocessador digital, que genera un cromatograma d'intensitat en funció del temps. Per a la correcta avaluació de resultats, l'ideal és obtenir pics gaussians els quals corresponen cada un a un component diferent de la mostra [24].

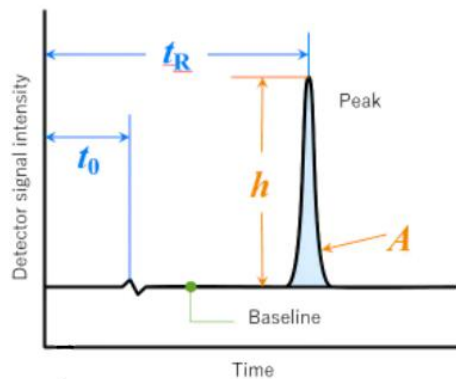


Imatge 8: Diagrama dels components de l'HPLC [26].

El cromatograma és una gràfica bidimensional on es mostra, en l'eix vertical la concentració en termes de la intensitat del senyal del detector, i en l'horitzontal el temps d'anàlisi. Quan no s'elueix cap compost de la columna, es dibuixa una línia paral·lela a l'eix horitzontal (línia de base). El resultat obtingut es mostra similar a la forma d'una campana, anomenat pic.

El temps de retenció (t_R) és l'interval de temps entre el punt d'injecció de la mostra i el punt màxim del pic. El temps necessari perquè els compostos no retinguts (sense interacció) passin de l'injector al detector s'anomena temps mort (t_0).

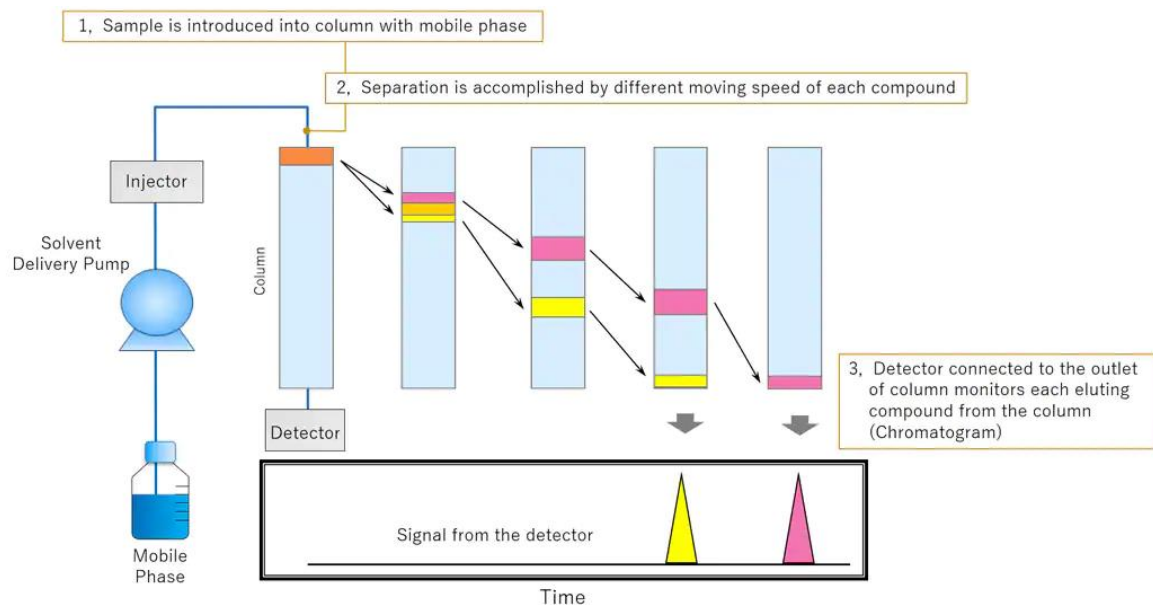
L'alçada del pic (h) és la distància vertical entre el punt màxim d'un pic i la línia de base, i l'àrea del pic (A) és l'àrea tancada pel pic i la línia de base [26].



Imatge 9: Elements del cromatograma [26].

L'HPLC pot separar i detectar cada compost per la diferència de la velocitat de cada un a través de la columna. A part de la fase mòbil, hi ha l'estacionària, que és la part de la columna que interacciona amb el compost.

A la columna, com més forta sigui l'afinitat entre el component i la fase mòbil, més ràpid es mou el component per la columna juntament amb la fase mòbil. D'altra banda, com més forta és l'afinitat amb la fase estacionària, més lent es mou per la columna.



Imatge 10: Diagrama de la separació de les mostres en la columna [27].

3. Part experimental

En aquest apartat s'expliquen els mètodes utilitzats per a extreure la cafeïna i l'àcid clorogènic, juntament amb els resultats obtinguts. Aquests han sigut extraccions amb vòrtex a temperatura ambient, i ultrasons a temperatura ambient i a 50 °C.

S'han fet servir com a dissolvents en l'extracció dels anàlits mescles d'etanol i aigua en diferent proporció. Les composicions de dissolvent estudiades són: 0, 20, 40, 60, 80 i 96% d'etanol.

3.1. Materials i mètodes

A continuació es descriuen els mètodes d'extracció emprats i la tècnica de quantificació utilitzada.

3.1.1. Mètodes d'extracció

En els següents subapartats es detalla el procediment dut a terme per a preparar les diferents extraccions, segons el mètode utilitzat: extracció vòrtex, o amb ultrasons.

3.1.1.1. *Extracció vòrtex*

El procediment utilitzat en aquesta extracció és el següent. En la balança analítica, es col·loca el tub d'assaig dins un vas de precipitats (per aguantar-lo), i es tara. A continuació s'hi afegeixen 0,7 g de la mostra del marro de cafè, amb una microespàtula.

Posteriorment, es prepara la mescla de dissolvent. Per exemple, per preparar una mescla d'etanol/aigua de 40% etanol, primer es tara un vas de precipitats, i s'hi afegeixen 4 g d'etanol pur. Es torna a tarar, i s'hi afegeixen 6 g d'aigua ultrapura. Es mescla per homogeneïtzar la barreja (mescla preparada en % en massa).

Amb l'ajuda d'una micropipeta prèviament calibrada, s'extrauen 4 mL de la mescla de dissolvents preparada i s'afegeixen en el tub d'assaig que conté el marro del cafè. Es tapa el tub d'assaig i es deixa durant un minut en l'agitador vòrtex a màxima potència.

Després es col·loca en la centrifugadora durant 30 minuts a 4200 rpm. Un cop acabada la centrifugació, es treu el tub d'assaig de l'aparell i es mesura l'alçada màxima i mínima de la fase superior, com s'observa en la *Imatge 11*, amb l'ajut d'un peu de rei digital.



Imatge 11: Tub d'assaig després de la centrifugació.

A continuació, es prepara el filtratge de la fase superior. Primer, es col·loca una xeringa en el suport, i es fa un rentat amb una petita part de la mostra líquida, amb una pipeta Pasteur. S'afegeix un filtre a la punta de la xeringa (amb unes pinces per evitar contaminació). Mitjançant la mateixa pipeta Pasteur, es transfereix la resta de fase superior a l'interior de la xeringa.

Amb unes pinces, es col·loca el vial d'injecció a la part inferior, i es pressiona amb cura per extreure la mostra filtrada. Un cop omplert, també amb les pinces, s'agafa el tap i es tapa el vial.

Finalment, es col·loca dins l'HPLC i ja està llest per analitzar.

3.1.1.2. Extracció per ultrasons

Aquest mètode s'ha dut a terme tant a temperatura ambient, com a 50 °C.

El mètode d'extracció per ultrasons segueix el mateix procediment que el de vòrtex, fins després de l'addició dels 4 mL de la mescla de dissolvents preparada, i posar el tap al tub d'assaig. A partir d'aquest punt, es submergeixen els tubs d'assaig en l'aparell d'ultrasons (a temperatura ambient, o prèviament escalfada a 50 °C), durant un minut.

Posteriorment, es duen a terme els mateixos procediments de centrifugació i filtració en els vials d'injecció, i es col·loquen dins l'HPLC.

3.1.2. Mètode de quantificació per HPLC

Per tal de determinar la quantitat de cafeïna i àcid clorogènic presents en els vials d'injecció obtinguts en l'extracció del residu del cafè, s'utilitza un HPLC amb una columna C8 KromaPhase (Scharlab) de mida de partícula 5 µm, mida de porus de 100 Å, longitud de 150 mm i diàmetre interior de 4,6 mm.

La fase mòbil està preparada amb acetonitril i aigua ultrapura, ambdós amb un 0,1% d'àcid acètic per a HPLC. Les condicions són 93:7 (aigua:acetonitril) en mode isocràtic, durant 30 minuts. El volum d'injecció és de 20 µL i la longitud d'ona del detector de 278 nm.

3.2. Experiments inicials per a establir condicions

En aquest apartat s'expliquen experiments inicials duts a terme per a establir les condicions a partir de les quals es basaran els estudis posteriors.

3.2.1. Condicions de la fase mòbil

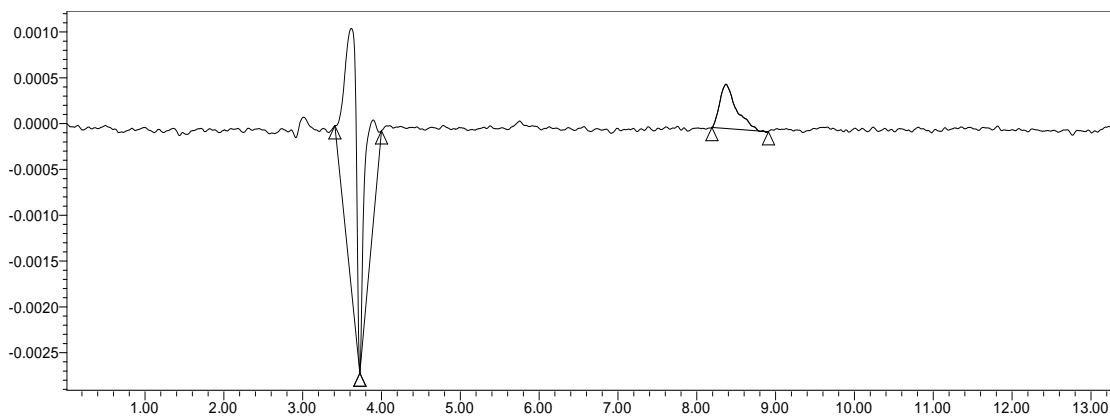
Per tal que la cromatografia sigui correcta, inicialment s'ha d'ajustar la fase mòbil, amb la finalitat d'obtenir les condicions òptimes pel que fa a la separació i quantificació dels diferents pics d'àcid clorogènic i cafeïna.

Per aquest motiu, s'han provat les següents condicions de fase mòbil:

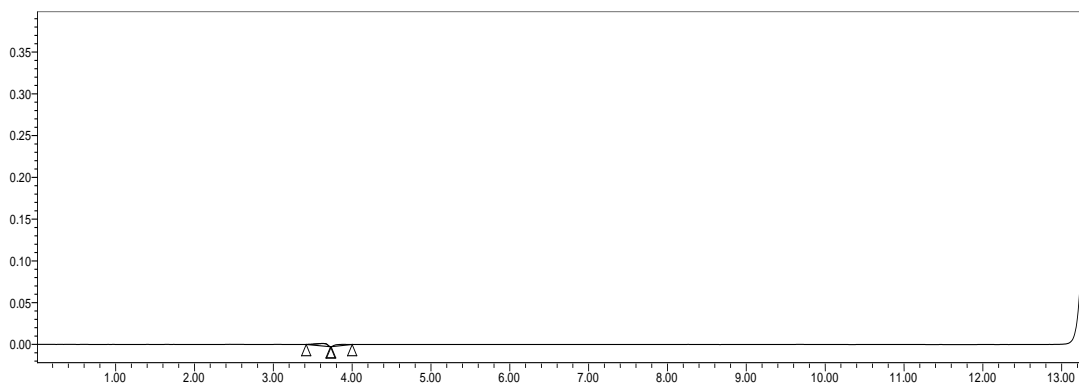
- 90:10 aigua:acetonitril
- 92:8 aigua:acetonitril
- 93:7 aigua:acetonitril
- 93:7 aigua:acetonitril (amb gradient)

A part de la fase mòbil, s'han provat diferents temps d'elució.

Inicialment, s'injecten els patrons de cafeïna (300 ppm) i d'àcid clorogènic (200 ppm), amb una fase mòbil de 92:8 durant 15 min. S'observa que la cafeïna no es detecta (*Imatge 12*), i que el pic d'àcid clorogènic comença a sortir al minut 13 (*Imatge 13*).



Imatge 12: HPLC patró cafeïna (300 ppm). Fase mòbil 92:8.



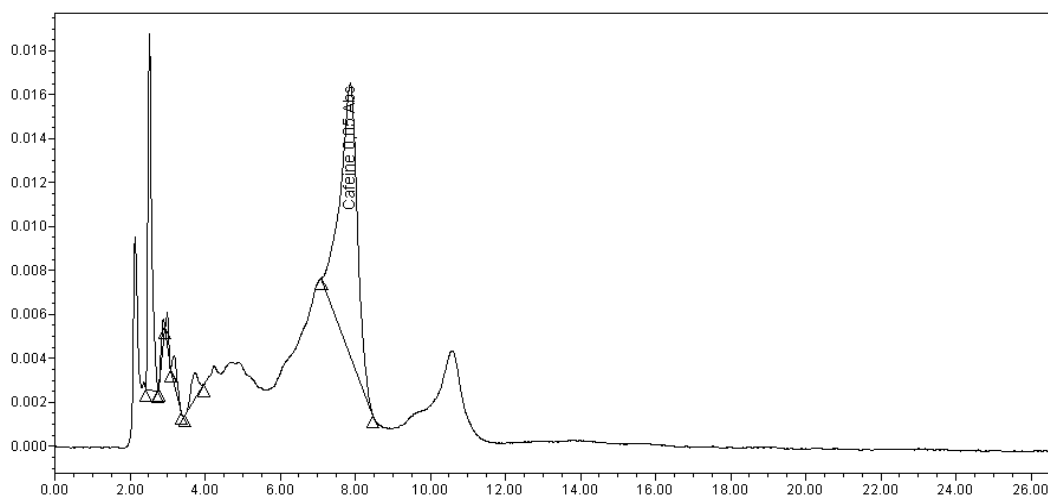
Imatge 13: HPLC patró àcid clorogènic (200 ppm). Fase mòbil 92:8.

A partir d'aquí es decideix allargar tots els temps de procés a 30 min.

A continuació es detallen els resultats obtinguts per a algunes mostres en les diferents condicions de fase mòbil.

3.2.1.1. 90:10 aigua:acetonitril

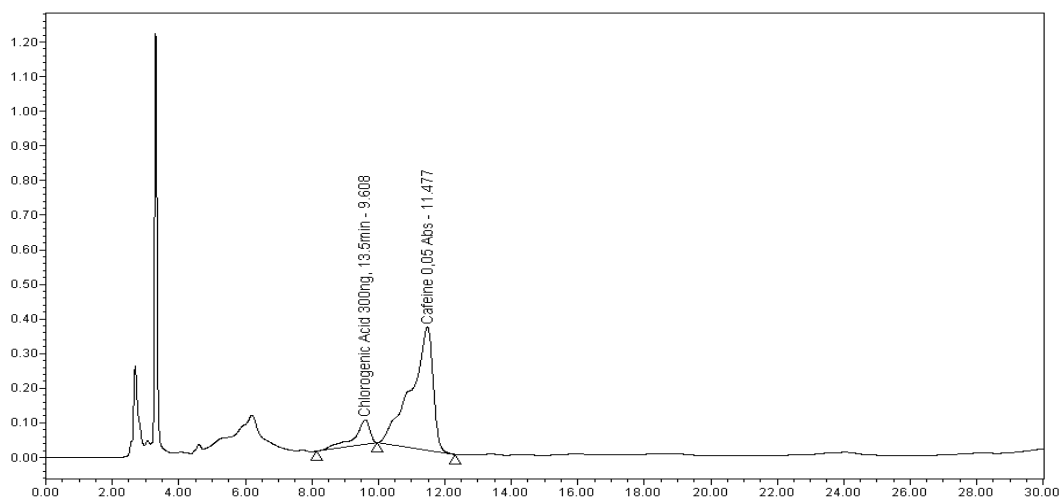
En el primer cas que es presenta, l'extracció es realitza amb una mescla etanol/aigua del 96% d'etanol i vòrtex, i s'injecta amb una relació de fase mòbil 90:10 (aigua:acetonitril) durant 30 min (*Imatge 14*). L'àcid clorogènic no es detecta, i el pic de la cafeïna surt deformat.



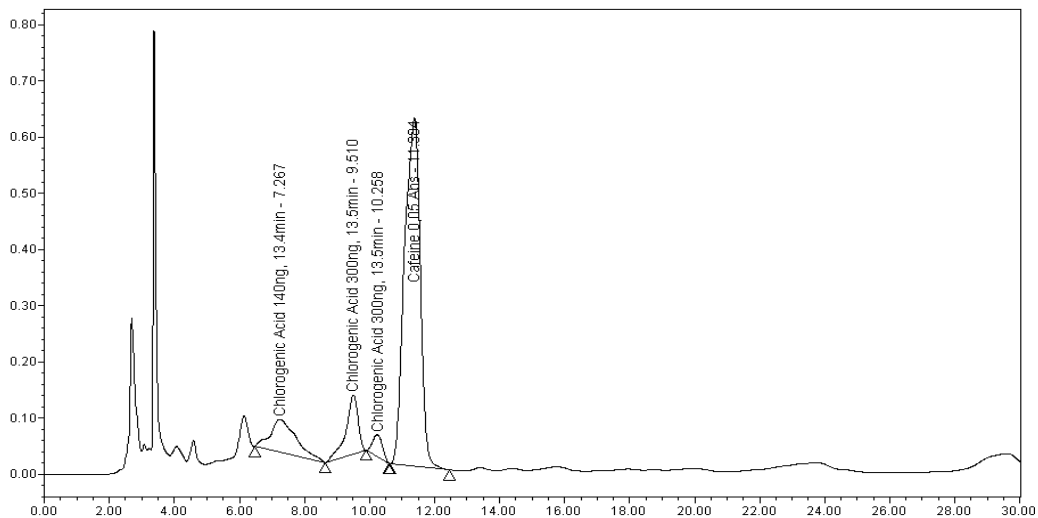
Imatge 14: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol. Fase mòbil 90:10.

Posteriorment, s'injecta, en les mateixes condicions, una extracció amb la mescla de dissolvents etanol/aigua amb un 60% d'etanol (*Imatge 16*), i una altra amb el 40% d'etanol (*Imatge 15*).

S'observa que en l'extracció amb la mescla 60% d'etanol, el pic de la cafeïna queda deformat. En l'extracció amb menys etanol s'obté un cromatograma amb els pics més separats i nets. Cal afegir que en ambdues concentracions es detecta l'àcid clorogènic, però en menor mesura en la de 60%. També s'afirma que amb aquesta fase mòbil continuen apareixent anàlits en torn el minut 28, per tant, es decideix provar amb una fase mòbil amb més concentració d'acetonitril.



Imatge 15: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 90:10.

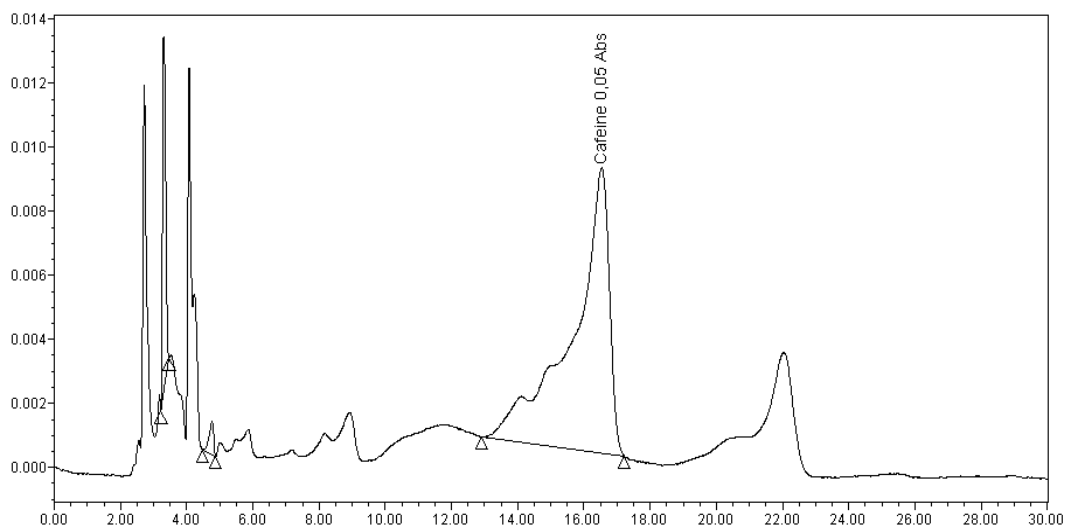


Imatge 16: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol. Fase mòbil 90:10.

3.2.1.2. 92:8 aigua:acetonitril

Posteriorment, es prova la fase mòbil de 92:8 aigua:acetonitril. S'injecten extraccions de diferents concentracions d'etanol, per observar l'eficàcia de cada una.

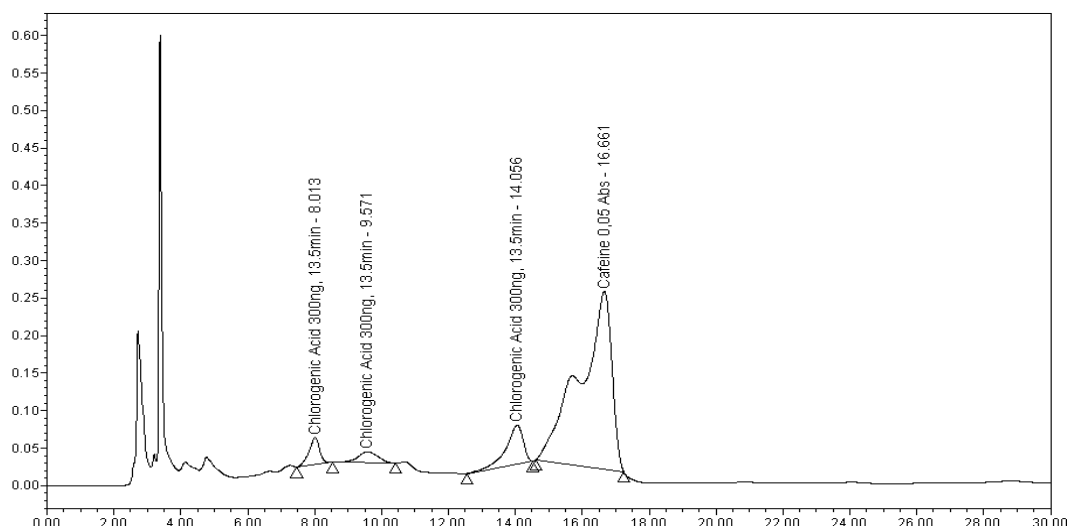
Injectant l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 96% d'etanol (*Imatge 17*), s'extreu cafeïna, però el pic no té una silueta uniforme, i sembla que es solapi amb un altre pic o que es deformi per l'esquerra. Es pot observar com el clorogènic perd afinitat amb una concentració tan elevada d'etanol, i de la mateixa manera que en la fase mòbil anterior, no es detecta.



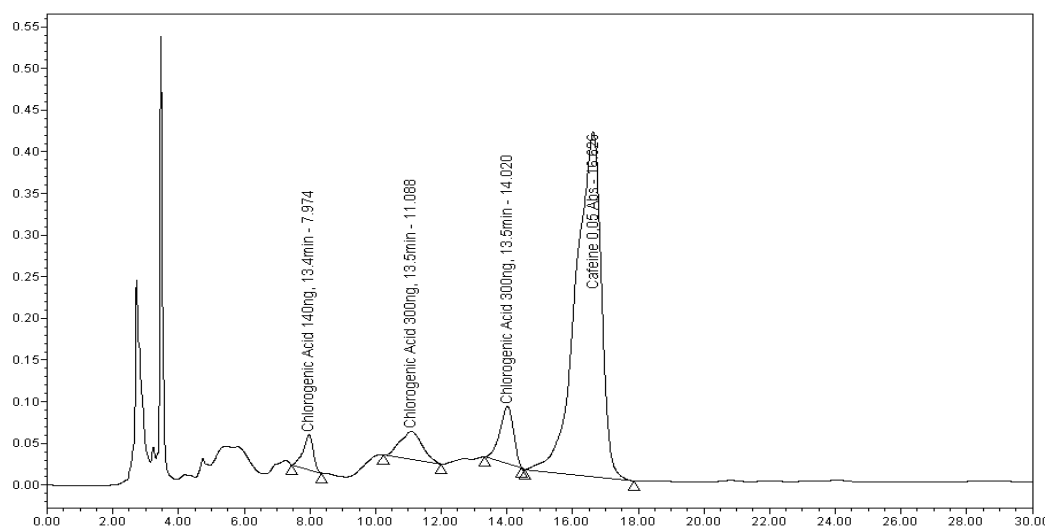
Imatge 17: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol. Fase mòbil 92:8.

Injectant l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 60% d'etanol (*Imatge 18*), apareix l'àcid clorogènic en més quantitat. El pic de la cafeïna surt deformat.

Amb l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 40% d'etanol (*Imatge 19*), l'àrea de la cafeïna augmenta juntament amb la del clorogènic, però el cromatograma no acaba de ser del tot net, ja que els pics no són uniformes ni simètrics.



Imatge 18: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 92:8.



Imatge 19: Extracció mescla etanol/aigua 40% etanol. Fase mòbil 92:8.

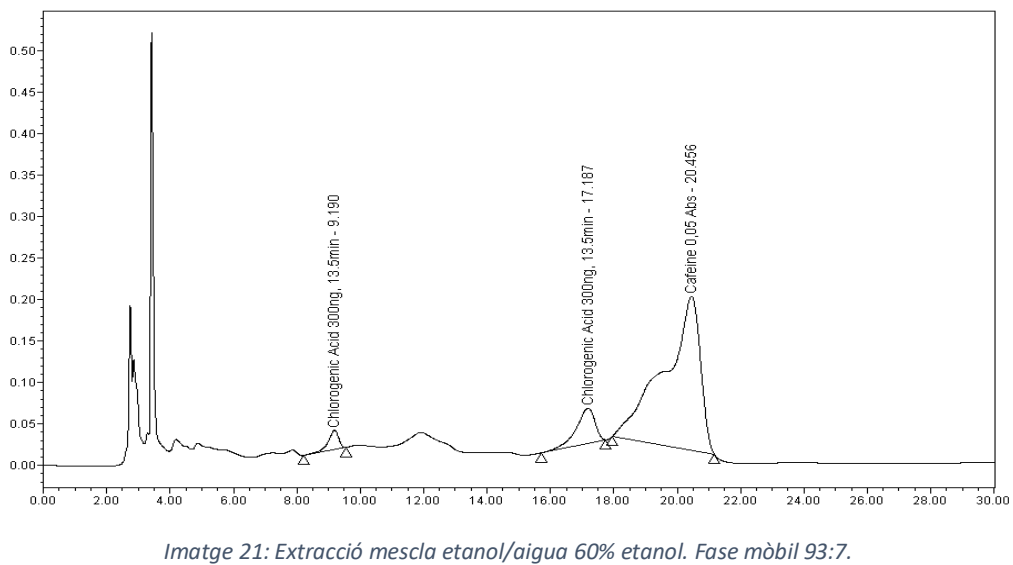
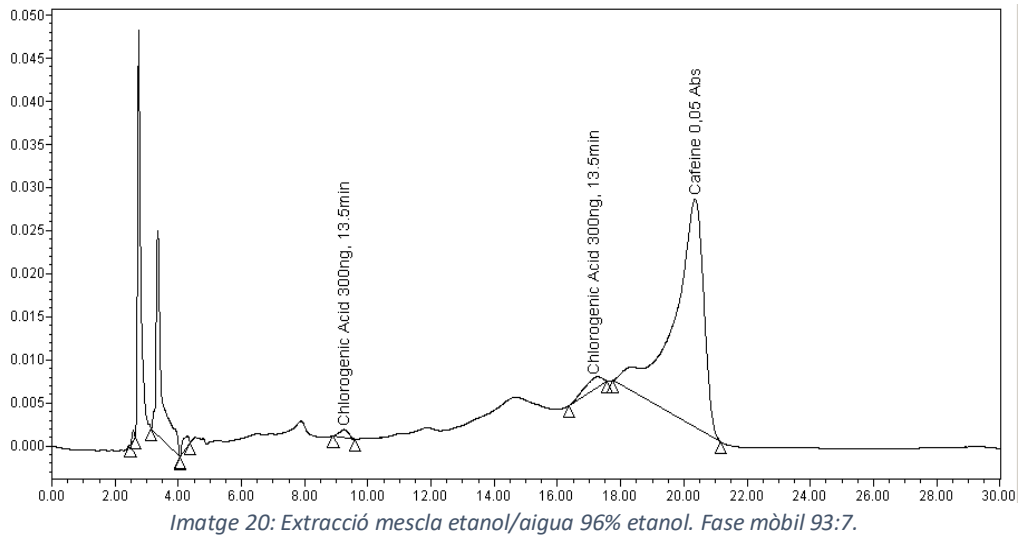
Finalment, es decideix provar una fase mòbil amb més concentració d'acetonitril, pel fet que ni els pics acaben de sortir del tot separats, ni surten uniformes i simètrics.

3.2.1.3. 93:7 aigua:acetonitril

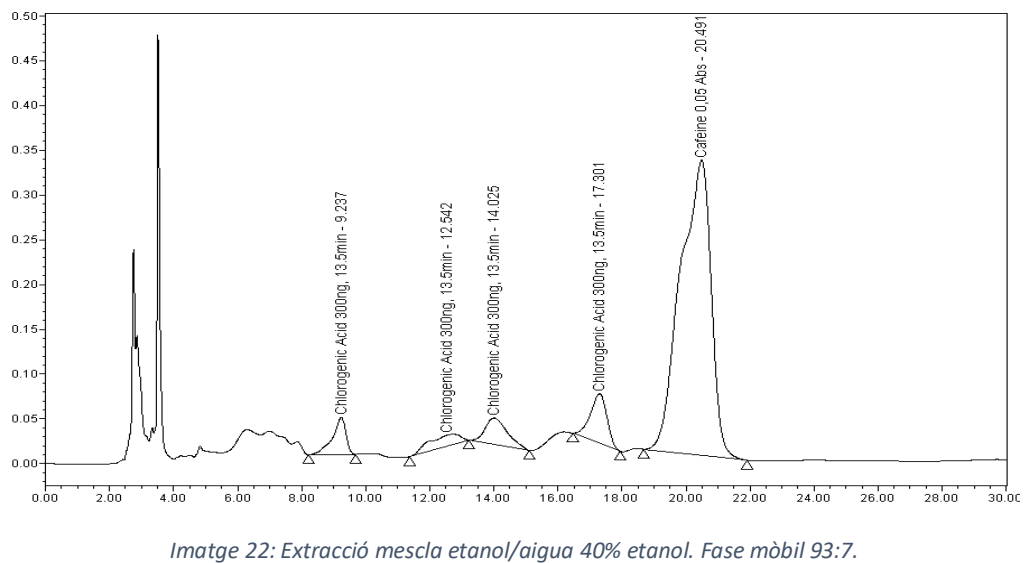
La següent fase mòbil en provar és 93:7 aigua:acetonitril. S'injecten extraccions amb mescles d'etanol/aigua amb un 96, 60, 40 i 0% d'etanol.

Amb l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 96% d'etanol (*Imatge 20*) l'àrea de la cafeïna augmenta, però no es forma un cromatograma net, ja que el pic de la cafeïna també queda deformat. L'àcid clorogènic apareix en quantitats molt baixes.

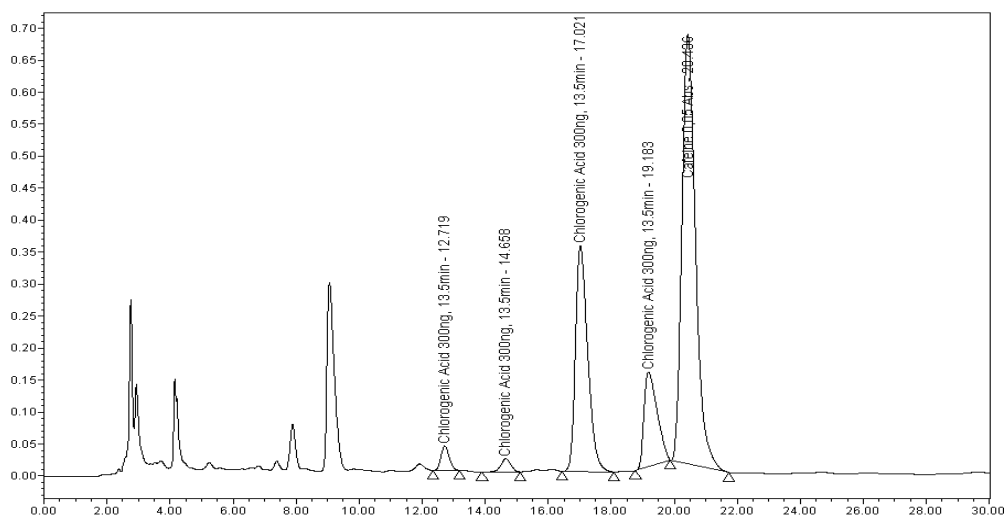
Amb l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 60% d'etanol (*Imatge 21*), l'àrea de la cafeïna continua deformat, tot i que té una forma més regular. El clorogènic encara apareix en quantitats baixes.



Amb l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 40% d'etanol (*Imatge 22*), es comença a veure un millor cromatograma. El pic de cafeïna és més uniforme, i els pics de clorogènic surten més separats que en l'anterior fase mòbil.



Amb l'extracció amb la mescla d'etanol/aigua 0% d'etanol (*Imatge 23*), s'obtenen els millors resultats. Tant l'àrea de la cafeïna com la de l'àcid clorogènic són les més grans i uniformes de les extraccions estudiades amb aquesta fase mòbil.

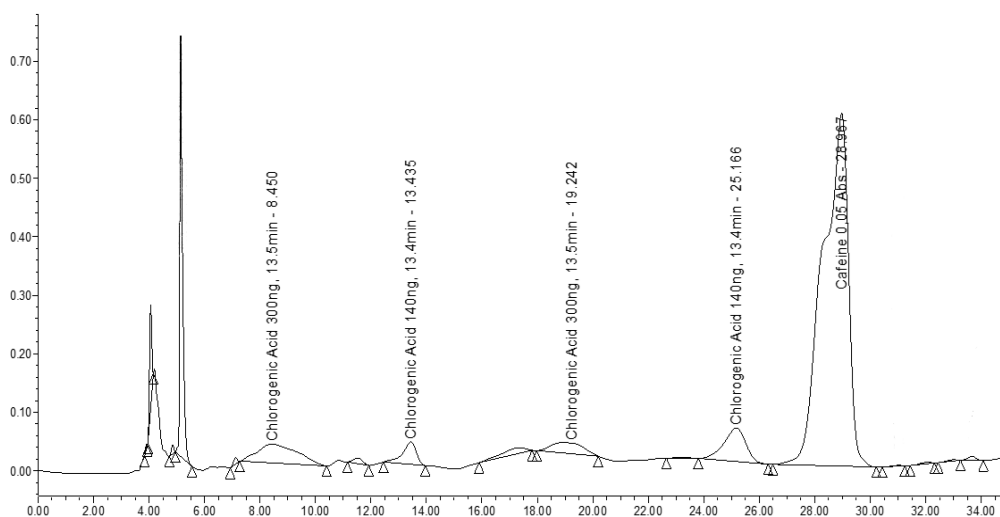


Imatge 23: Extracció amb aigua. Fase mòbil 93:7.

3.2.1.4. 93:7 aigua:acetonitril, amb gradient

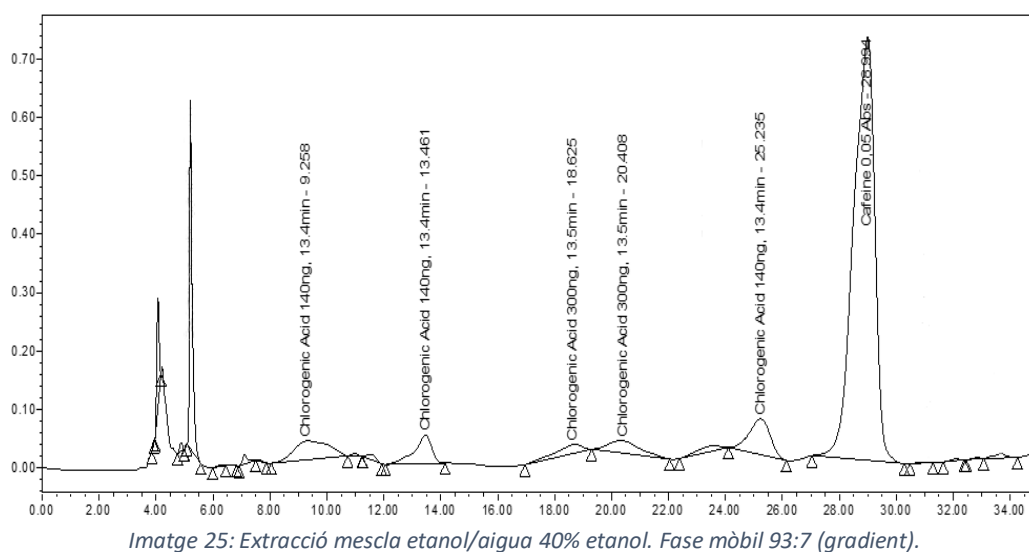
Finalment, es prova una fase mòbil de 93:7, amb gradient durant 35 minuts. La programació d'aquest és de 93:7 durant els primers 18 minuts, seguit d'un canvi progressiu cap a 83:17 durant els següents 12 minuts. Finalment seguirà un mode isocràtic amb 83:17 durant els últims 5 minuts. S'injecten mostres extretes amb mescles d'etanol/aigua amb el 60 i el 40% d'etanol.

Amb l'extracció amb mescla d'etanol/aigua 60% d'etanol (*Imatge 24*), també es separen bé els pics. El de cafeïna, mostra la mateixa deformació que ja s'ha comentat en casos anteriors, com en la fase de 93:7 sense gradient.



Imatge 24: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol. Fase mòbil 93:7 (gradient).

Amb l'extracció amb mescla d'etanol/aigua 40% d'etanol (*Imatge 25*), es separen bé els pics. El de cafeïna és uniforme i surt lleugerament deformat. Tot i això, els pics de l'àcid clorogènic no queden uniformes.



Aquesta fase mòbil es descarta ja que no milloren els resultats, i requereix més temps d'anàlisi per tal de que apareguin tots els anàlits.

3.2.1.5. Conclusió final fase mòbil

Inicialment, es decideix el temps d'anàlisi. Es fan dos cromatogrames de patrons de cafeïna i d'àcid clorogènic durant 15 min, amb unes condicions de fase mòbil de 92:8. S'observa que la cafeïna no apareix, i que el pic del clorogènic apareix incomplet per falta de temps. Per tant, es decideix allargar el temps a 30 minuts.

Posteriorment, es proven diferents concentracions de fase mòbil (90:10, 92:8, 93:7, i 93:7 amb gradient). Utilitzant la fase mòbil de 90:10, els pics queden solapats, ja que surten en menys de 12 minuts.

Es prova de reduir la concentració d'acetonitril, amb 92:8, fet que provoca que els pics tardin més a sortir i que no es quedin tan solapats. Els resultats milloren, però els pics no estan ben definits i alguns surten deformats.

Amb la concentració de 93:7 s'obtenen els millors resultats (pics molt ben definits i separats, amb un temps de retenció correcte).

Finalment, es prova la concentració 93:7 amb gradient (93:7 durant 18 min, seguit d'un canvi progressiu cap a 83:7 durant els següents 12 minuts, i isocràtic amb 83:7 els últims 5 min). Aquesta es descarta, ja que el cromatograma surt pitjor que en mode isocràtic (sense gradient), i es necessita més de 30 min perquè surtin tots els anàlits.

3.2.2. Conservació del marro de cafè i mètode d'assecatge

A causa de les baixes concentracions obtingudes inicialment pels anàlisis estudiats, es comprova que no s'hagi degradat el marro utilitzat, comparant els resultats obtinguts amb les extraccions anteriors (*Taula 2*).

Vuit mesos després de la realització del primer estudi amb aquest marro de cafè, es realitza una extracció amb una fase mòbil de 92:8, durant 30 minuts. S'ha aplicat el mateix mètode d'extracció tant en els estudis previs com els actuals, que ha estat el vòrtex, utilitzant aigua com a dissolvent. Els resultats que s'observen a la *Taula 2*, són fruit de la mitjana aritmètica entre els valors dels duplicats realitzats amb vòrtex i utilitzant aigua com a dissolvent.

Component	Concentració anterior (ppm)	Concentració actual (ppm)
Clorogènic	223,00	70,47
Cafeïna	207,000	40,434

Taula 2: Comparació concentracions del marro amb el pas del temps.

Es demostra que el pas del temps sí afecta els resultats en ambdós anàlisis del marro utilitzat fins al moment. Com es pot observar en la *Taula 2*, es passa d'una concentració de 233 ppm a 70,47 ppm de clorogènic, i de 207 ppm a 40,434 ppm de cafeïna. Per tant, en 8 mesos les concentracions de cafeïna i de clorogènic en l'extracte s'han reduït en un 80,5% i 68% respectivament.

Per a realitzar els càlculs dels anàlisis sobre la concentració actual, s'han emprat les rectes de calibratge que apareixen en l'apartat "3.3. Rectes de calibratge".

A causa d'aquest deteriorament de la qualitat del marro, es decideix recollir-ne de nou, ja que es considera que s'han degradat els components a estudiar i que cal tenir-ne un de més recent.

Posteriorment, es du a terme una comparació entre els mètodes d'assecatge del marro utilitzat, amb l'objectiu de comprovar si varia el contingut dels anàlisis. S'utilitza una fase mòbil de 93:7, durant 30 minuts. Es compara una mostra de cada marro extreta amb vòrtex amb mesclures de dissolvents d'etanol/aigua de 0 i 40% d'etanol.

En el cas de les extraccions amb la mescla d'etanol/aigua 0% d'etanol (*Taula 3*), els resultats són molt similars en ambdós anàlisis. La diferència més gran s'observa en el pic de la cafeïna. Pel que fa a la concentració, el mètode d'assecatge no suposa una diferència notable.

Anàlit	Àrea		Concentració (ppm)	
	Assecat natural	Assecat estufa	Assecat natural	Assecat estufa
Cafeïna	20.268.144,60	17.699.625,36	234,99	203,99
Clorogènic	4.713.933,59	4.892.182,35	103,37	107,28
	9.095.443,28	8.889.591,70	199,43	194,92
	4.159.374,52	3.287.275,70	91,21	72,09

Taula 3: Comparació de l'àrea entre assecat natural i amb estufa (0% etanol).

En el cas de les extraccions amb mescla d'etanol/aigua 40% d'etanol (*Taula 4*), els resultats són molt similars en ambdós anàlisis. Analitzant la concentració, la diferència més gran també es dona en el pic de la cafeïna. En el cas del clorogènic són pràcticament iguals.

Anàlit	Àrea		Concentració (ppm)	
	Assecat natural	Assecat estufa	Assecat natural	Assecat estufa
Cafeïna	25.679.812,33	26.806.625,66	300,29	313,89
Clorogènic	1.690.240,43	1.741.685,24	37,08	38,21
	761.139,26	698.561,98	16,71	15,34
	4.333.555,87	4.268.854,99	95,03	93,61

Taula 4: Comparació de l'àrea entre assecat natural i amb estufa (40% etanol).

Es decideix continuar utilitzant el marro d'assecatge amb estufa, ja que els resultats són pràcticament els mateixos en ambdues extraccions, i no hi ha una diferència significant com per a tornar a repetir tots els experiments amb el marro assecat natural.

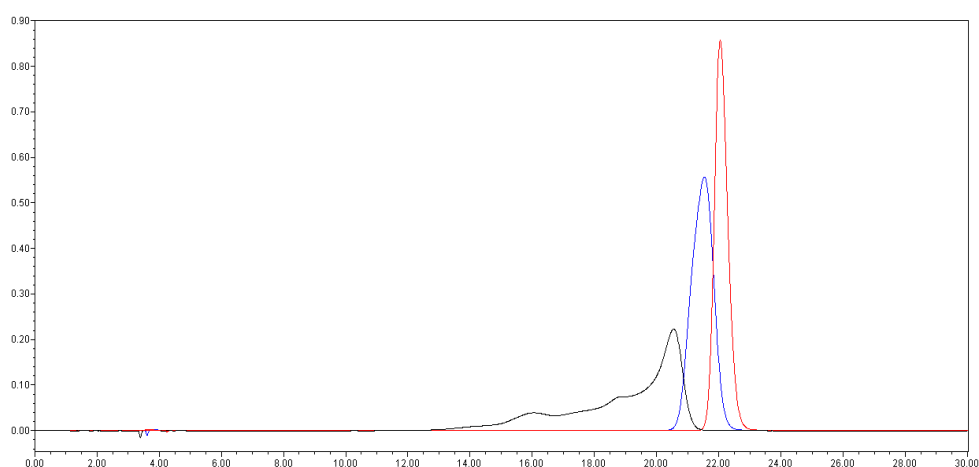
3.2.3. Patró de cafeïna dissolt amb aigua o amb mescles d'etanol/aigua

Per a observar la interacció de l'etanol amb la cafeïna, es decideix preparar tres patrons de 300 ppm de cafeïna dissolts amb mescles etanol/aigua amb un percentatge d'etanol del 0%, 40% i 80%, i injectar-los a l'HPLC en una fase mòbil de 93:7 aigua:acetonitril, durant 30 min.

En la *Taula 5* es mostren els resultats de temps de retenció i àrea de cadascun dels patrons de cafeïna dissolts en els diferents percentatges d'etanol.

Concentració d'etanol	Temps de retenció (min)	Àrea
0%	22,05	26.281.708,37
40%	21,54	28.241.119,03
80%	15,94	795.621,90
	20,55	10.044.106,53

Taula 5: Temps de retenció i àrea dels patrons.



Imatge 26: Superposició patrons cafeïna (300 ppm) 0% (vermell), 40% (blau) i 80% (negre) etanol.

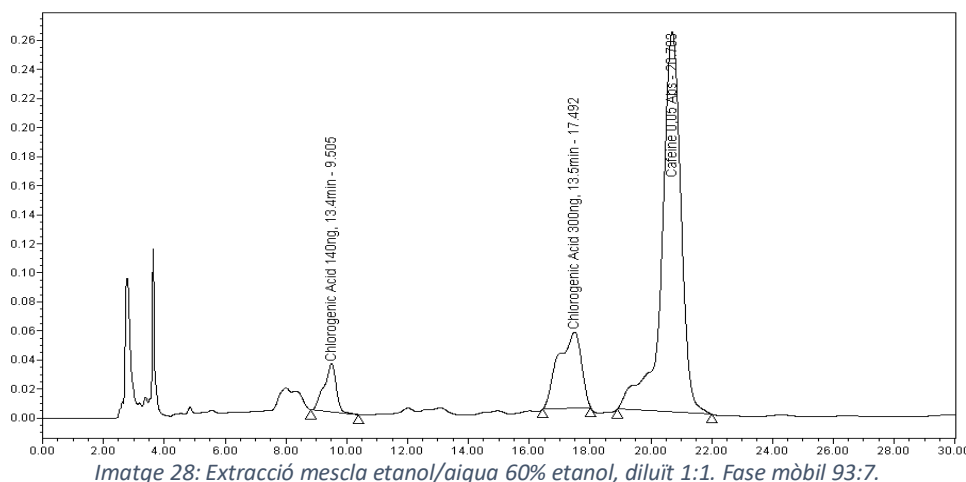
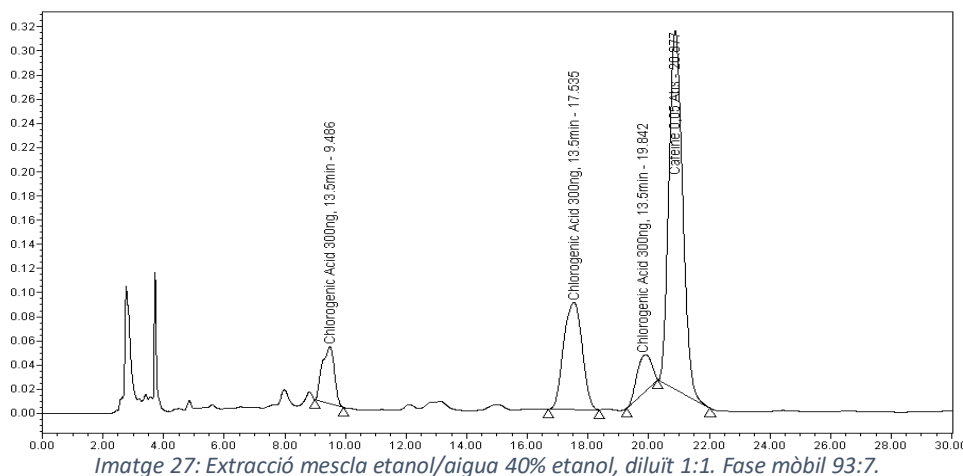
Com es pot observar en el cromatograma (*Imatge 26*), en el moment d'afegir etanol al patró, es comença a deformar lleugerament el pic (dissolució de 40% d'etanol), fins al punt que acaben apareixent dos pics deformats en el patró dissolt en major concentració d'etanol. Aquest fet demostra la influència de l'etanol en la forma dels pics en el cromatograma, en les extraccions amb concentracions elevades d'aquest dissolvent.

Anteriorment, es pensava que un pic d'àcid clorogènic es solapava amb el de cafeïna, però aquesta prova descarta aquesta teoria. A més, tot i que l'addició d'etanol en el patró impliqui uns temps de retenció menors, no es milloren els resultats finals, ja que els pics dels patrons on no intervé l'etanol no es deformen.

Per tant, es pot concloure que a mesura que s'incrementa la proporció d'etanol en la mescla de dissolvents, aquest interactua amb la molècula de cafeïna i la resolució del cromatograma empitjora, dificultant la quantificació de la cafeïna.

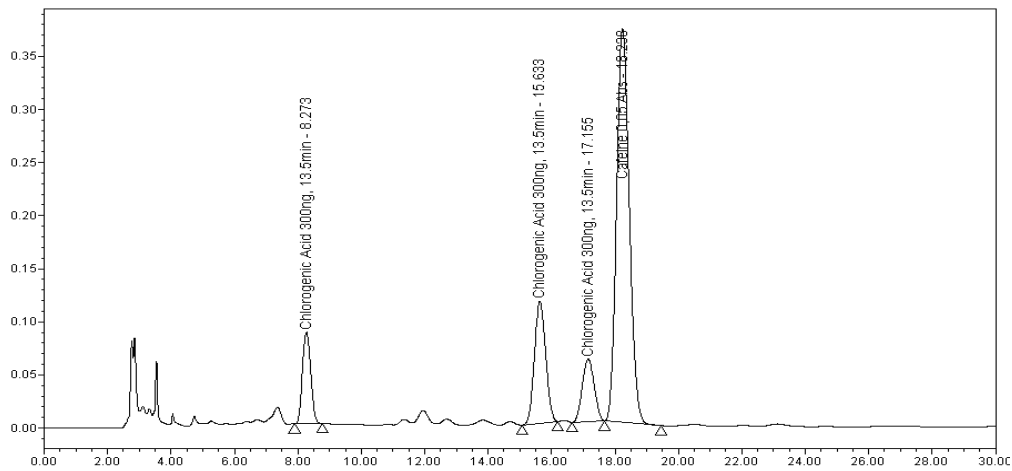
3.2.4. Dilució mostres extretes amb etanol superior a 60%

Degut a la interacció de l'etanol amb la cafeïna, es decideix diluir amb aigua dues mostres extretes amb mescla etanol/aigua amb un 40 i un 60% d'etanol, amb unes condicions de fase mòbil de 93:7, durant 30 min. La dilució es fa en una relació 1:1, directament al vial d'injecció per veure si millora la lectura de l'HPLC.

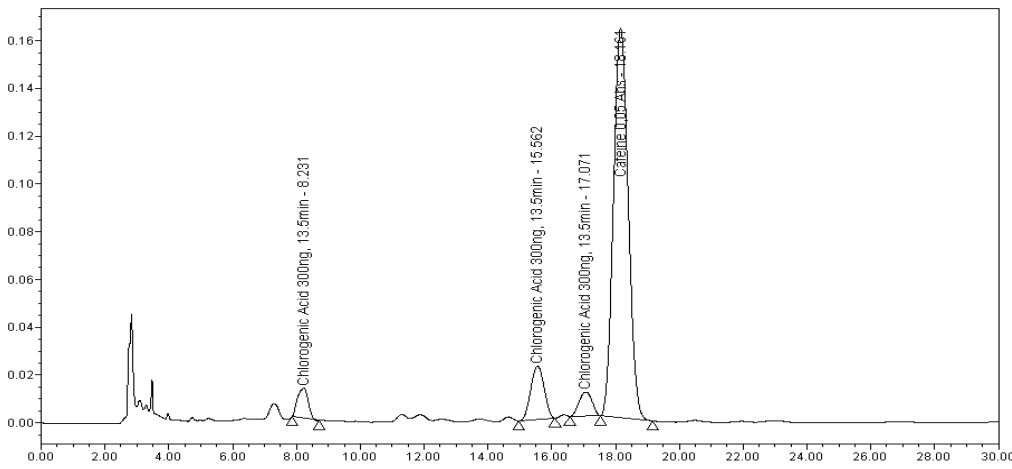


Tal com es pot observar en les imatges anteriors (*imatges 27 i 28*), els resultats comencen a millorar. Amb la dilució, els cromatogrames surten més nets, els pics es separen millor, i les concentracions són iguals o superiors a les mostres sense diluir.

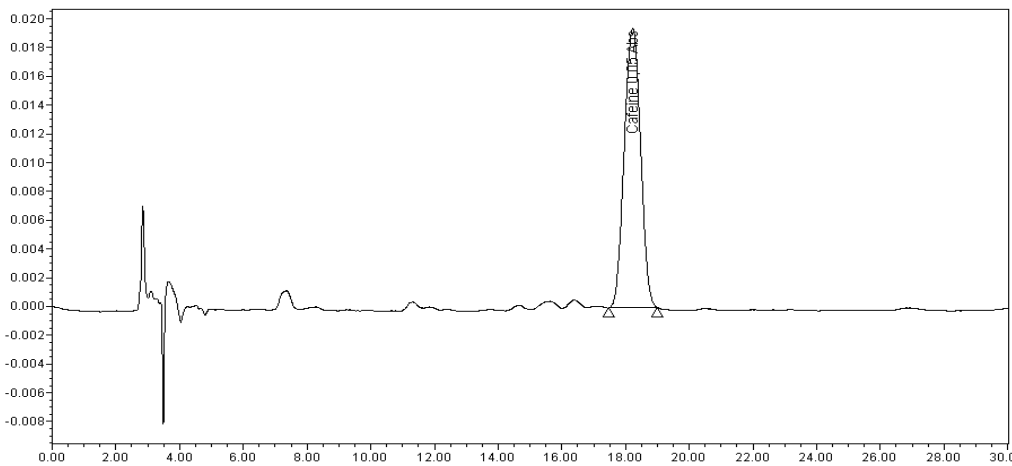
Després de veure aquests resultats, es decideix diluir-les més, amb una relació d'1:2. En primer lloc, es preparen mostres extretes amb mescla d'etanol/aigua de 60, 80 i 96% d'etanol, amb unes condicions de fase mòbil de 93:7, durant 30 min. La dilució es fa en una relació 1:2, directament al vial d'injecció.



Imatge 29: Extracció mescla etanol/aigua 60% etanol, diluït 1:2. Fase mòbil 93:7.

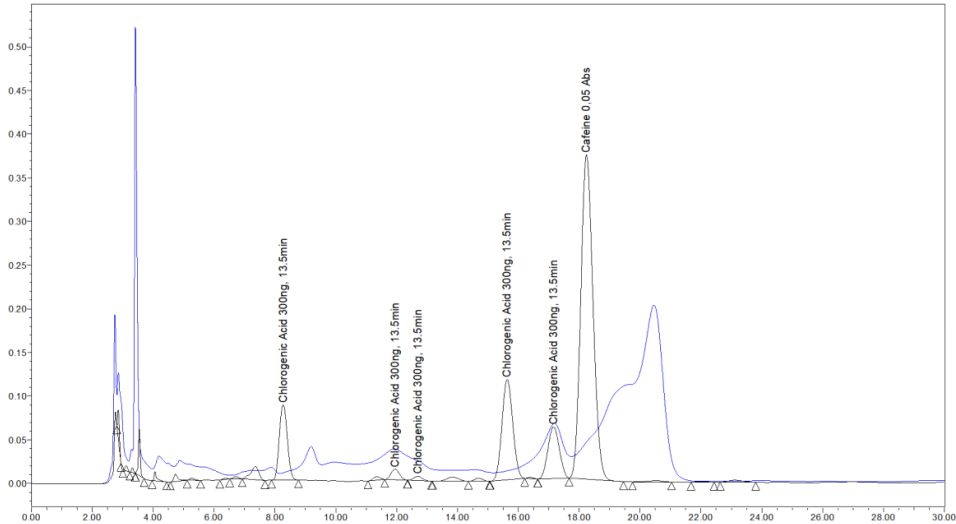


Imatge 30: Extracció mescla etanol/aigua 80% etanol, diluït 1:2. Fase mòbil 93:7.

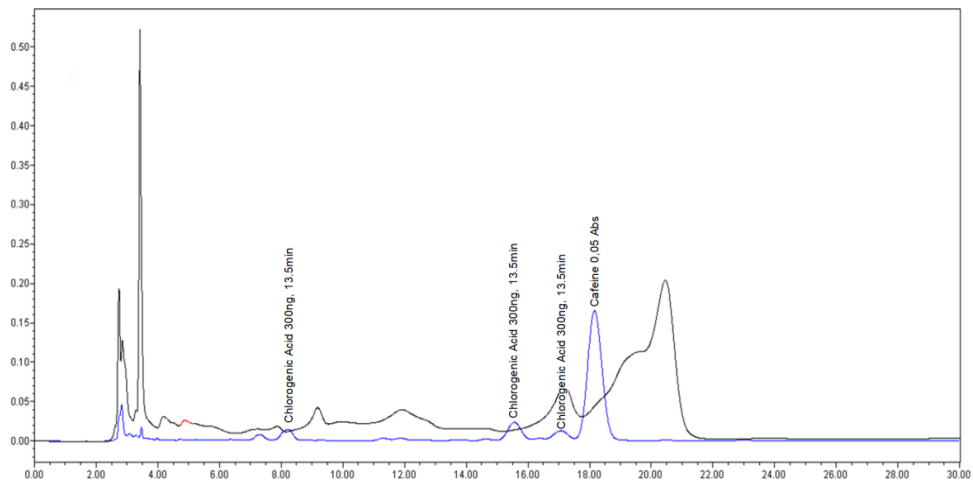


Imatge 31: Extracció mescla etanol/aigua 96% etanol, diluït 1:2. Fase mòbil 93:7.

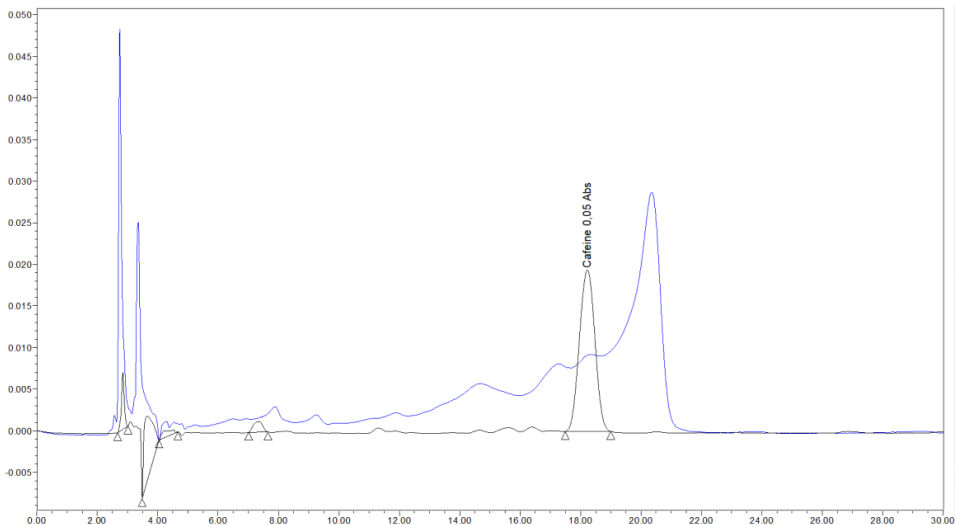
En les imatges anteriors (*Imatges 29, 30 i 31*), es pot veure com encara millora més el cromatograma, separant tots els pics sense excepció. Per contra, en l'extracció amb major concentració d'etanol, la de 96%, no es detecta l'àcid clorogènic. A continuació es mostra una comparativa entre les diferents extraccions diluïdes i sense diluir.



Imatge 32: Comparació extracció mescla etanol/aigua 60% etanol 1:2 (negre) i sense diluir (blau).



Imatge 33: Comparació extracció mescla etanol/aigua 80% etanol 1:2 (blau) i sense diluir (negre).



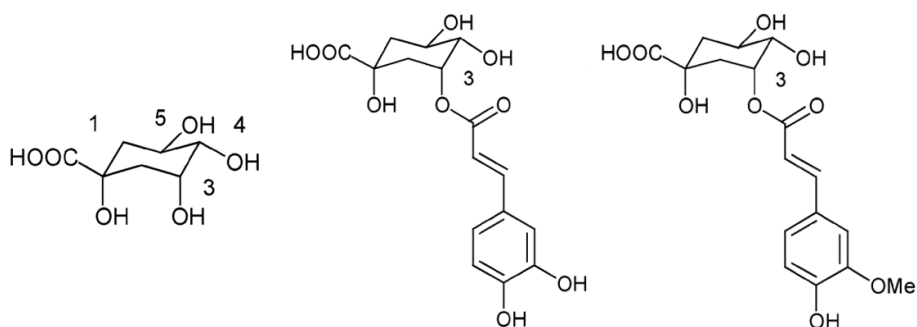
Imatge 34: Comparació extracció mescla etanol/aigua 96% etanol 1:2 (blau) i sense diluir (negre).

Després de veure les imatges anteriors (*imatges 32, 33 i 34*), es pot concloure que s'obté una millora general dels resultats. Per aquest motiu, es decideix començar a treballar des d'aquest punt diluint 1:2 amb aigua les mostres extretes, en les extraccions realitzades amb una mescla d'etanol/aigua superiors al 60% d'etanol, abans d'injectar-les al cromatògraf. Per tant, les anàlisis es realitzen amb les mostres diluïdes però els resultats finals ja estan recalculats.

3.2.5. Dopatge de les mostres amb clorogènic

A causa de la isomeria que presenta la molècula d'àcid clorogènic, en el cromatograma de les mostres apareixen diversos pics que es corresponen amb aquest anàlit.

Generalment, l'àcid clorogènic engloba una família d'èsters formada per l'àcid quínic i altres àcids transcinàmics, dels quals els més comuns són el cafeic, p-cumàric i ferúlic. Els àcids clorogènics es troben àmpliament distribuïts a les plantes, especialment en el gra de cafè, que conté almenys 18 àcids clorogènics. Aquests es subdivideixen en cinc classes: tres àcids cafeoilquínics, tres àcids p-cumaroilquínics, tres àcids feruloilquínics, tres àcids dicafeoilquínics i sis àcids cafeoil-feruloilquínics. En la *imatge 35* es poden observar uns exemples d'aquests compostos [28].



imatge 35: Àcid quínic (esquerra), àc. 3-O-cafeoilquínic (centre), àc. 3-O-feruloilquínic (dreta).

Per aquest motiu, s'estudia quin d'aquests és el que es correspon amb el del patró utilitzat en la quantificació del clorogènic. Aquest és l'àcid 5-Clorogènic, més concretament, àcid 5-Cafeoilquínic.

Per a determinar aquest pic (corresponent a l'isòmer 5-Clorogènic, utilitzat com a patró en la recta de calibratge), es fan una sèrie de dopatges amb patró a diferents extraccions. Aquest mètode permet determinar quin pic correspon al patró, que serà el que n'augmenti l'àrea en el cromatograma.

Es realitza un dopatge consistent en substituir els 4 mL d'aigua en el procés d'extracció per 4 mL del patró de 100 ppm d'àcid clorogènic. Es comparen els resultats amb l'extracció de 0% d'etanol (ja que en el dopatge no intervé l'etanol) amb el mètode de vòrtex, mètode utilitzat també per l'extracció de les mostres amb dopatge.

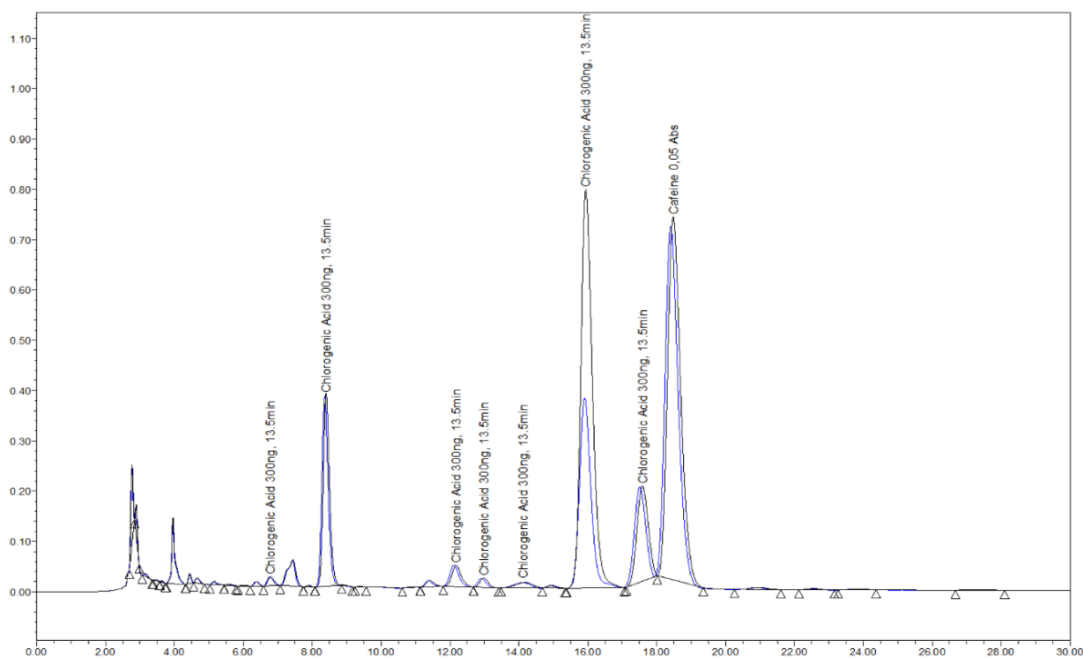
Núm. pic	Àrea	
	Sense dopatge	Amb dopatge
1	221.385,06	228.679,65
2	4.772.306,48	4.865.000,82
3	777.695,18	797.425,21
4	298.568,65	307.378,49
5	361.719,10	349.303,26
6	8.732.220,36	18.353.263,92
7	4.263.478,26	4.315.341,99
Cafeïna	18.642.416,86	19.159.327,27

Taula 6: Comparativa pics d'àcid clorogènic

Com s'observa en la taula anterior (Taula 6), el pic més accentuat és el número 6. Augmenta 10 milions d'unitats en el cas del dopatge amb patró, aproximadament.

També hi ha un lleuger increment en la resta de pics, però no és degut al dopatge, ja que també augmenta l'àrea de la cafeïna i només es dopa amb àcid clorogènic.

En la Imatge 36, es pot veure la comparació dels cromatogrames dels quals s'ha parlat anteriorment. Cal destacar la diferència en el pic marcat (pic núm. 6 de la Taula 6), que mostra una gran diferència d'àrees degut a l'efecte del dopatge.



Imatge 36: Comparativa dopatge amb patró (negre) i sense dopar (blau).

3.2.6. Conclusions dels experiments inicials

Després d'escollir la fase mòbil i començar amb les extraccions, s'observa que el marro del cafè es deteriora després de vuit mesos de conservació sec i a temperatura ambient. Comparant els resultats obtinguts amb els de vuit mesos abans, es veu una disminució del 70% en la concentració i massa de l'àcid clorogènic, i del 80% en la concentració i massa de la cafeïna. Es decideix recollir nou marro per treballar en les mateixes condicions que els experiments realitzats vuit mesos enrere.

Posteriorment, es comparen els mètodes d'assecatge del marro (assecatge natural i amb estufa), per a comprovar si varia el contingut dels anàlits. Es compara una mostra de cada marro extreta amb vòrtex amb una mescla de dissolvents d'etanol/aigua de 0 i 40% d'etanol. S'observa que els resultats quasi no varien. Finalment, es decideix continuar utilitzant el marro d'assecatge amb estufa, ja que no hi ha una diferència significant com per a tornar a repetir tots els experiments amb el marro assecat de manera natural.

A part, es comprova la diferència en la injecció de patrons de cafeïna utilitzant com a dissolvent aigua o una mescla d'etanol/aigua, per analitzar en quin cas s'assolirien millors resultats. Aquest estudi es du a terme per a observar si l'addició d'etanol provoca canvis en el pic de la cafeïna. S'observa que els pics dels patrons preparats amb la mescla d'etanol/aigua surten lleugerament deformats. Apareixen dos pics deformats i amb menys concentració que en els patrons de cafeïna sense etanol. Aquest fet permet entendre que en els cromatogrames amb concentracions elevades d'etanol, la cafeïna no té un pic de clorogènic solapat, sinó que el pic queda deformat per la interacció amb l'etanol. Es comprova que perjudica els resultats i es decideix no fer els patrons amb una mescla d'etanol/aigua.

A partir dels resultats esmentats anteriorment en els patrons de cafeïna, es veu que en les mostres extretes amb la mescla d'etanol/aigua superiors al 60%, els pics de la cafeïna queden deformats. S'observa que l'etanol també interactua amb les molècules d'àcid clorogènic, i els resultats empitjoren. Es decideix diluir les mostres extretes amb la mescla d'etanol/aigua superiors al 60%, amb l'objectiu d'aconseguir una bona separació i forma dels pics en el moment de quantificar amb l'HPLC.

Primer es prova una dilució 1:1 (extracte:aigua), però els resultats no milloren. A continuació, es prova una dilució 1:2, i es veu una millora en els resultats, per tant, es decideix que les extraccions extretes amb la mescla d'etanol/aigua superiors al 60% es diluiran abans d'injectar a l'HPLC.

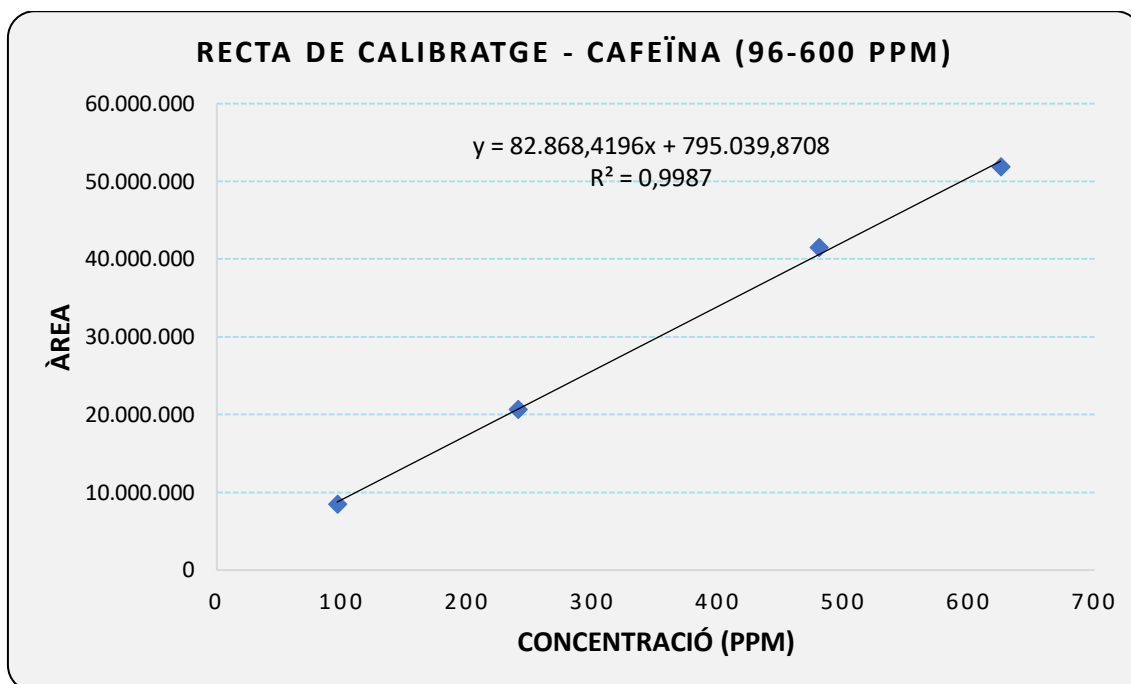
Finalment, es realitza un dopatge amb patró de clorogènic, ja que a causa de la seva isomeria, en el cromatograma es mostren diversos pics. S'extreu el marro amb 4 mL de patró de 100 ppm d'àcid clorogènic. Seguidament, s'injecten les mostres i es comparen amb una extracció amb 0% etanol, treballant en les mateixes condicions cromatogràfiques. S'observa que només augmenta un pic, de manera considerable. Aquest és el que es correspon amb el patró utilitzat en la recta de calibratge, concretament amb l'isòmer àcid 5-Cafeoiliquínic.

3.3. Rectes de calibratge

A continuació es mostren les rectes de calibratge elaborades tan per la cafeïna com per l'àcid clorogènic.

3.3.1. Recta calibratge de la cafeïna

Per tal d'obtenir la recta de calibratge de la cafeïna, es preparen patrons de 96, 240, 480 i 600 ppm en aigua. En la *imatge 37* i la *Taula 7*, es mostren els resultats obtinguts per a la recta de calibratge de la cafeïna.



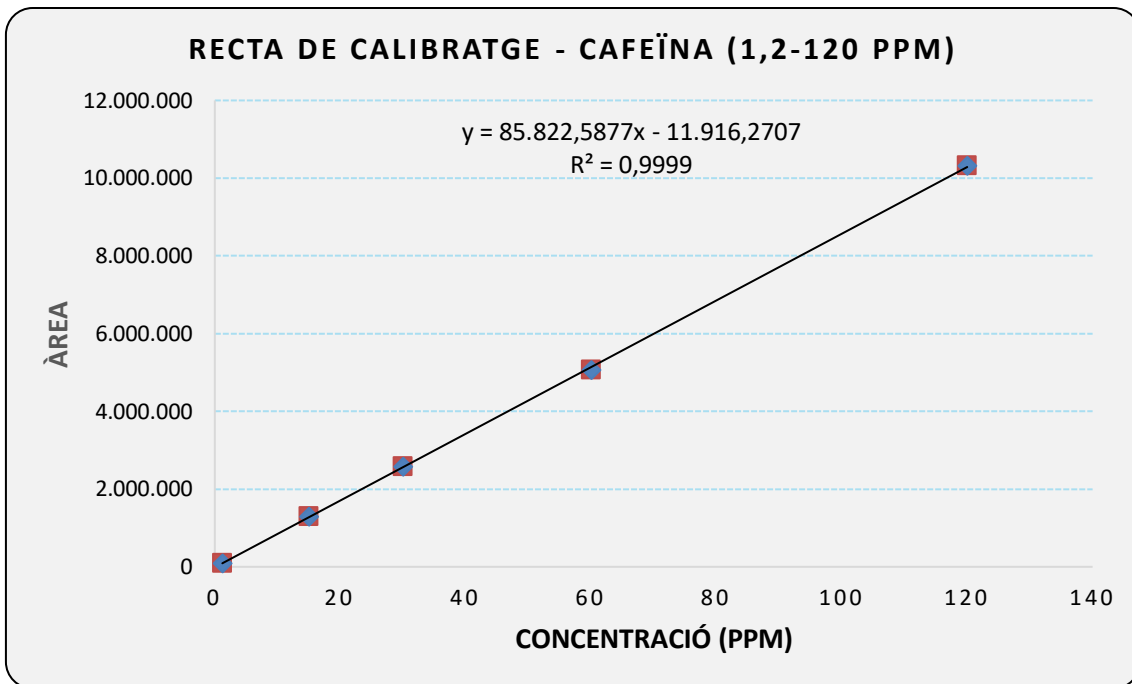
Imatge 37: Recta de calibratge cafeïna (96-600 ppm).

Patró cafeïna	Concentració (ppm)	Àrea
PC 96	96	8.464.928,51
PC 240	240	20.717.116,25
PC 480	480	41.524.028,17
PC 600	625	51.887.479,22

Taula 7: Resultats de la recta de calibratge de la cafeïna (96-600 ppm).

El coeficient (R^2) és superior a 0,995, per tant, la regressió es considera acceptable.

Posteriorment, s'observa que apareixen concentracions inferiors a 96 ppm. Per a assolir els resultats correctes es prepara una nova recta utilitzant concentracions de patró més baixes. Els resultats es poden observar a la *imatge 38* i a la *Taula 8*.



Imatge 38: Recta de calibratge cafeïna (1,2-120 ppm).

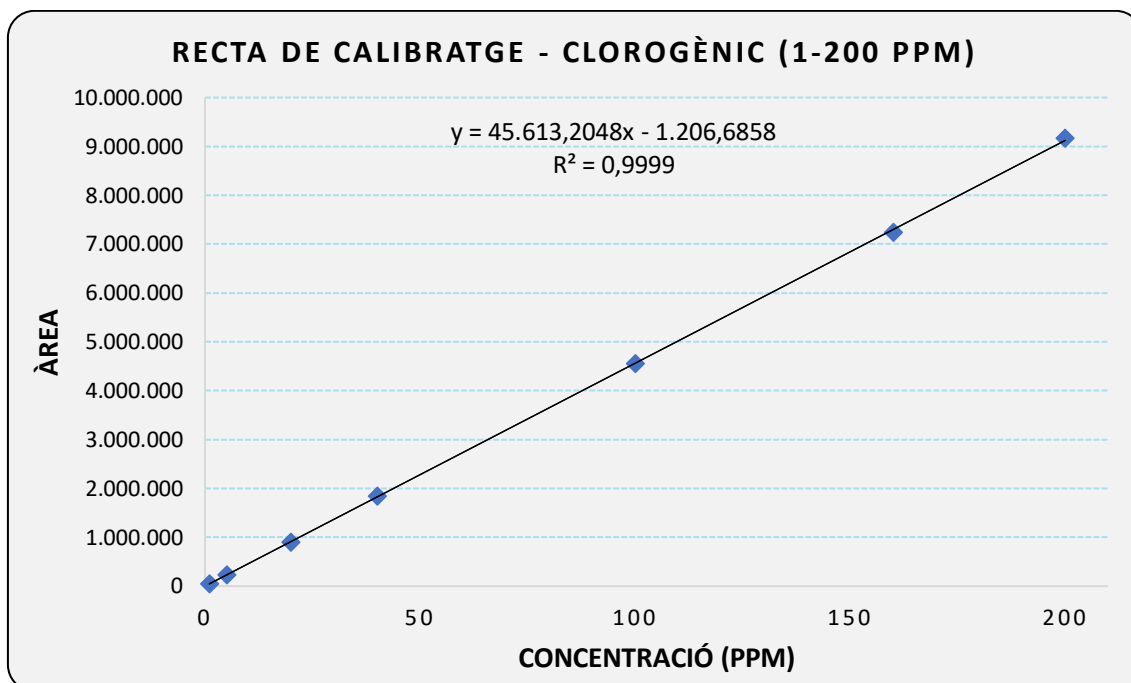
Patró cafeïna	Concentració (ppm)	Àrea
PC 1,2	1,2	98.474,60
PC 15	15	1.287.042,69
PC 30	30	2.584.084,91
PC 60	60	5.070.458,95
PC 120	120	10.313.426,83

Taula 8: Resultats de la recta de calibratge de la cafeïna (1,2-120 ppm).

La nova recta es fa a partir de patrons d'entre 1,2 i 120 ppm, i s'obté una R^2 de 0,9999.

3.3.2. Recta de calibratge de l'àcid clorogènic

Per tal d'obtenir la recta de calibratge de l'àcid clorogènic, es preparen patrons d'1, 5, 20, 40, 100, 160 i 200 ppm en aigua. En la *Imatge 39* i la *Taula 9*, es mostren els resultats obtinguts per a la recta de calibratge de l'àcid clorogènic.



Imatge 39: Recta de calibratge àcid clorogènic.

Patrò cafeïna	Concentració (ppm)	Àrea
PA1	1	46.667,48
PA5	5	229.442,86
PA20	20	899.716,00
PA40	40	1.845.146,72
PA100	100	4.558.246,09
PA160	160	7.241.467,90
PA200	200	9.163.411,88

Taula 9: Resultats de la recta de calibratge de l'àcid clorogènic.

El coeficient (R^2) és superior a 0,999, per tant, la regressió es considera adequada.

3.4. Extraccions amb vòrtex

En aquest apartat es presenten els resultats finals de l'estudi d'extracció de l'àcid clorogènic i la cafeïna del marró del cafè, utilitzant el mètode vòrtex i emprant mescles d'etanol/aigua en diferent proporció com a dissolvent d'extracció.

Es mostra en els dos subapartats una taula amb les dades mitjanes de concentració i massa, juntament amb els seus respectius coeficients de variació. També es mostra un gràfic amb els resultats de massa definitius, per a cada una de les extraccions dutes a terme amb la mescla d'etanol/aigua de 0, 20, 40, 60, 80 i 96% d'etanol. Aquests resultats es representen en forma de gràfic de barres perquè s'observi de forma clara l'eficiència de cada un dels mètodes usats. Cal tenir en compte que tots aquests resultats del clorogènic s'han calculat tenint en compte l'àrea d'un sol pic de clorogènic, el que correspon al patró utilitzat (tot i que el clorogènic té diferents isòmers). La comparació dels resultats obtinguts tenint en compte 1 sol pic o els pics de tots els isòmers es pot veure a l'Annex 1.

Per les tres últimes extraccions amb la mescla d'etanol/aigua 60, 80 i 96% d'etanol, tal com s'ha indicat anteriorment, s'ha diluït l'extracte 1:2 amb aigua per tal de poder fer l'anàlisi cromatogràfic de forma correcta. Aquesta dilució ja s'ha tingut en compte a l'hora de fer els càlculs i representar els resultats en les taules.

L'anàlisi cromatogràfic s'ha dut a terme amb una fase mòbil de 93:7 (aigua:acetonitril), durant 30 minuts.

Els resultats de les extraccions que s'exposen, estan realitzats en duplicats (tret d'alguns casos que s'ha requerit fer triplicat, o quadruplicat a causa de l'alta variació). La concentració ve donada a partir de l'àrea del pic obtinguda del cromatograma i de l'equació resultant de les rectes de calibratge de cada anàlit. La massa s'ha calculat a partir del volum de la fase superior del tub d'assaig, i la concentració calculada prèviament.

3.4.1. Àcid clorogènic

Els resultats de les extraccions d'àcid clorogènic obtinguts a partir de la mitjana dels duplicats, es mostren en la *Taula 10*.

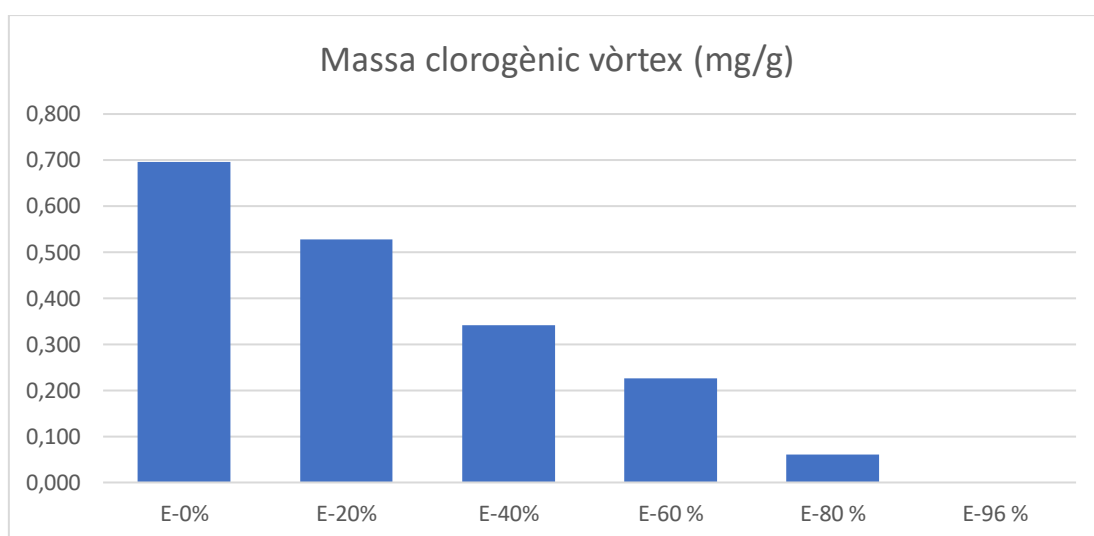
Mostra	Concentració mitja (ppm)	Coef. variació (%)	Massa mitja (mg/g)	Coef. variació (%)
E-0%	191,806	2,29	0,696	1,92
E-20%	154,658	20,70	0,528	19,63
E-40%	95,812	3,24	0,341	13,66
E-60 %	157,599	5,87	0,226	13,54
E-80 %	43,185	0,16	0,061	5,45
E-96 %	0,000	-	0,000	-

Taula 10: Resultats massa d'àcid clorogènic en vòrtex.

Els experiments realitzats amb el mètode vòrtex mostren uns bons resultats, ja que només en el cas de la mescla d'etanol/aigua 20% etanol, el coeficient de variació és elevat (tant per la mitja de concentració i la de massa).

Pel que fa a la concentració, destaquen les extraccions amb mescles d'etanol/aigua de 0 i 60% etanol, obtenint uns resultats de 191,806 i 157,599 ppm, respectivament. Tot i això, tal i com s'observa en el *Gràfic 1*, la major extracció de massa es dona en l'extracció que no conté etanol (mescla etanol/aigua 0% etanol). El valor més alt de massa d'àcid clorogènic extreta en les extraccions vòrtex ha sigut de 0,696 mg per cada gram de marro de cafè.

Cal destacar que la massa d'anàlit extreta disminueix progressivament a mesura que augmenta la concentració de la mescla d'etanol/aigua, fins al punt que en l'extracció amb la mescla etanol/aigua 96% d'etanol, no es detecta l'àcid clorogènic.



Gràfic 1: Massa d'àcid clorogènic en vòrtex.

3.4.2. Cafeïna

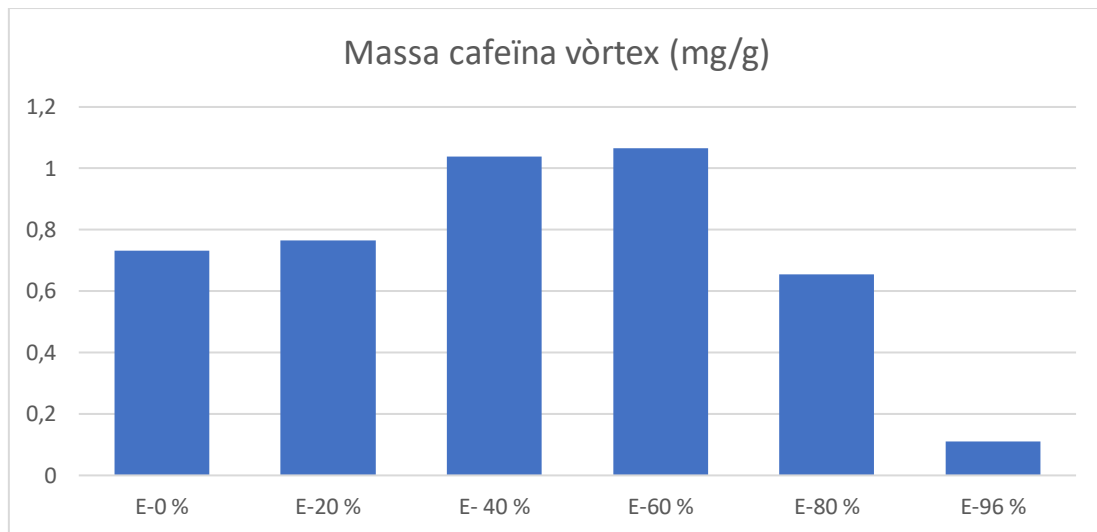
A partir de la mitjana dels duplicats de les extraccions de cafeïna amb vòrtex, s'obtenen els resultats mostrats en la *Taula 11*.

Mostra	Concentració mitja (ppm)	Coef. variació (%)	Massa mitja (mg/g)	Coef. variació (%)
E-0%	201,349	1,86	0,732	6,07
E-20%	224,056	3,34	0,766	2,25
E-40%	290,813	11,22	1,039	21,54
E-60%	270,173	9,72	1,065	10,16
E-80%	154,941	2,11	0,654	0,45
E-96%	24,380	0,42	0,110	1,81

Taula 11: Resultats massa de cafeïna en vòrtex.

Els experiments realitzats amb el mètode vòrtex mostren uns bons resultats, ja que només en el cas de la mescla d'etanol/aigua 40% etanol, el coeficient de variació és elevat (només en el cas de la massa).

Pel que fa a la concentració, destaquen les extraccions amb mescles d'etanol/aigua de 40 i 60% etanol, obtenint uns resultats de 290,813 i 270,173 ppm, respectivament. Aquestes també son les que major massa de cafeïna han aconseguit extreure, tal com s'observa en el *Gràfic 2*.



Gràfic 2: Massa de cafeïna en vòrtex.

El valor més alt de massa de cafeïna extreta en les extraccions vòrtex ha sigut d'1,065 mg per cada gram de marro de cafè, en l'extracció amb mescla d'etanol/aigua de 60% etanol.

La massa i concentració de cafeïna extreta disminueix en els dos extrems del gràfic, en les concentracions més i menys concentrades. El punt mig és on l'extracció és òptima.

Cal afegir també que, a diferència de les extraccions d'àcid clorogènic, la que utilitza la mescla d'etanol/aigua més concentrada (96% d'etanol) si detecta la cafeïna, tot i que els resultats són els més baixos.

3.5. Extraccions amb ultrasons

En aquest apartat es presenten els resultats finals de l'estudi d'extracció de l'àcid clorogènic i la cafeïna del marró del cafè, utilitzant el mètode d'ultrasons i emprant mescles d'etanol/aigua en diferent proporció com a dissolvent d'extracció. També es comparen els resultats a temperatura ambient i a 50 °C.

Es mostra en els dos subapartats una taula amb les dades de concentració i massa mitja, juntament amb els coeficients de variació de cada mostra. També es mostren gràfics amb els resultats de massa definitius, per a cada una de les extraccions dutes a terme amb la mescla d'etanol/aigua de 0, 20, 40, 60, 80 i 96% d'etanol. Aquests resultats es representen en forma de gràfic de barres perquè s'observi de forma clara l'eficiència de cada un dels mètodes usats.

Per les tres últimes extraccions amb la mescla d'etanol/aigua 60, 80 i 96% d'etanol, tal com s'ha indicat anteriorment, s'ha diluït l'extracte 1:2 amb aigua per tal de poder fer l'anàlisi cromatogràfic de forma correcta. Aquesta dilució ja s'ha tingut en compte a l'hora de fer els càlculs i representar els resultats en les taules.

L'anàlisi cromatogràfic s'ha dut a terme amb una fase mòbil de 93:7 (aigua:acetonitril), durant 30 minuts.

Els resultats de les extraccions que s'exposen, estan realitzats en duplicats (tret d'alguns casos que s'ha requerit fer triplicat, o quadruplicat a causa de l'alta variació). La concentració ve donada a partir de l'àrea del pic obtinguda del cromatograma i de l'equació resultant de les rectes de calibratge de cada anàlit. La massa s'ha calculat a partir del volum de la fase superior del tub d'assaig, i la concentració calculada prèviament. Es mostra, en cada taula, el coeficient de variació corresponent als resultats de concentració i massa per a cada concentració de la mescla d'etanol/aigua utilitzada.

3.5.1. Àcid clorogènic

A partir de la mitjana dels duplicats de les extraccions d'àcid clorogènic amb ultrasons, a temperatura ambient i a 50 °C, s'obtenen els resultats mostrats en la *Taula 12* i la *Taula 13*, respectivament.

Mostra	Concentració mitja (ppm)	Coef. variació (%)	Massa mitja (mg/g)	Coef. variació (%)
E-0%	61,402	20,46	0,207	20,19
E-20%	59,893	34,84	0,209	35,56
E-40%	37,906	8,96	0,145	10,64
E-60 %	58,355	2,25	0,077	4,02
E-80 %	15,765	14,41	0,021	42,40
E-96 %	0,000	-	0,000	-

Taula 12: Resultats d'àcid clorogènic en ultrasons, a T ambient.

Mostra	Concentració mitja (ppm)	Coef. variació (%)	Massa mitja (mg/g)	Coef. variació (%)
E-0%	67,276	0,23	0,230	0,40
E-20%	69,235	9,47	0,249	8,82
E-40%	42,042	5,99	0,155	8,37
E-60 %	104,084	2,77	0,138	9,24
E-80 %	27,955	6,95	0,038	22,87
E-96 %	0,000	-	0,000	-

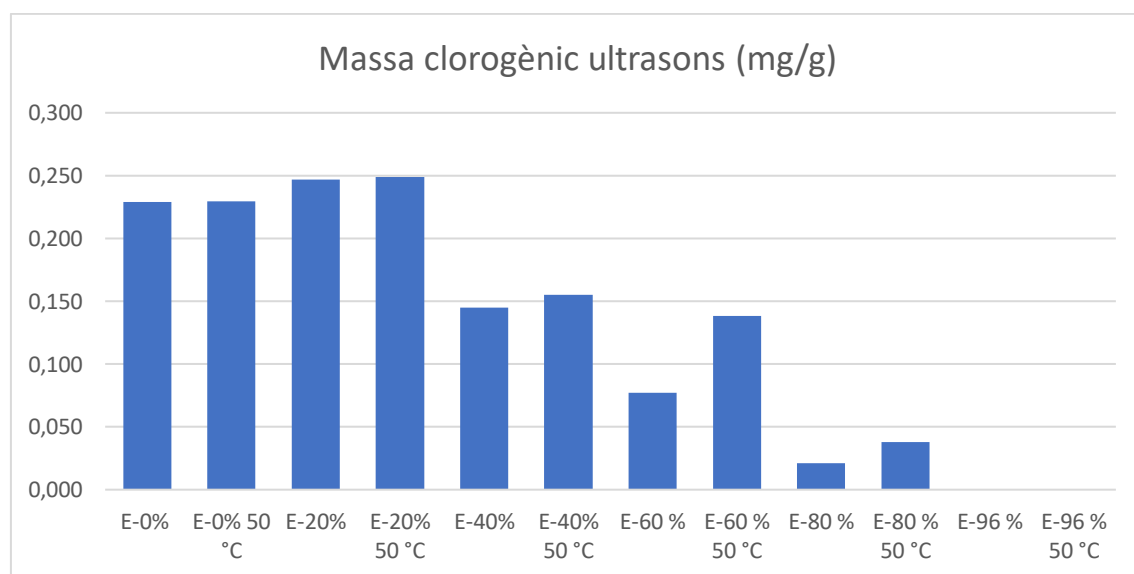
Taula 13: Resultats d'àcid clorogènic en ultrasons, a 50 °C.

Els experiments realitzats amb el mètode d'ultrasons mostren uns resultats més imprecisos, ja que apareixen diversos coeficients de variació elevats. D'aquests, destaca la mescla d'etanol/aigua amb 20% d'etanol a temperatura ambient, amb un 35% de variació aproximadament, tant per concentració com per massa. La major variació es troba en la mescla d'etanol/aigua amb 80% d'etanol a temperatura ambient, amb un 42% de desviació pel cas de la massa extreta.

Cal destacar que els resultats a 50 °C són molt més precisos que a temperatura ambient. En aquest cas només un valor del coeficient de variació s'excedeix, amb un 23% (mostra amb la mescla d'etanol/aigua 80% d'etanol).

Pel que fa a la concentració, destaca l'extracció a 50 °C amb mescla d'etanol/aigua del 60% etanol, obtenint un resultat de 104,084 ppm. Els següents resultats més elevats es troben en les mescles d'etanol/aigua més poc concentrades (0 i 20% etanol). Aquests es troben entre els 60 i 70 ppm.

Tot i això, tal i com s'observa en el *Gràfic 3*, els resultats de massa més elevats es donen en les extraccions dutes a terme amb la mescla d'etanol/aigua amb 0 i 20% d'etanol, tant a temperatura ambient com a 50 °C. El valor més alt de massa d'àcid clorogènic extret en les extraccions d'ultrasons ha sigut de 0,249 mg per cada gram de marro de cafè.



Gràfic 3: Massa d'àcid clorogènic en ultrasons.

De la mateixa manera que en l'extracció realitzada amb vòrtex, la massa d'anàlit extret disminueix a mesura que augmenta la concentració de la mescla d'etanol/aigua, fins al punt que en l'extracció amb la mescla etanol/aigua 96%, tampoc es detecta l'àcid clorogènic, en cap de les dues condicions de temperatura.

També cal destacar que, comparant les temperatures de treball, els resultats més elevats entre les mateixes mescles d'etanol/aigua es donen en les extraccions dutes a terme a 50 °C.

3.5.2. Cafeïna

A partir de la mitjana dels duplicats de les extraccions de cafeïna amb ultrasons, a temperatura ambient i a 50 °C, s'obtenen els resultats mostrats en les *Taules 14 i 15*.

Mostra	Concentració mitja (ppm)	Coef. variació (%)	Massa mitja (mg/g)	Coef. variació (%)
E-0%	58,913	18,83	0,199	18,58
E-20%	67,191	30,58	0,234	31,44
E-40%	93,558	9,96	0,358	11,64
E-60 %	118,486	2,19	0,469	1,27
E-80 %	101,077	10,68	0,407	10,05
E-96 %	6,967	2,03	0,029	2,37

Taula 14: Resultats de cafeïna en ultrasons, a T ambient.

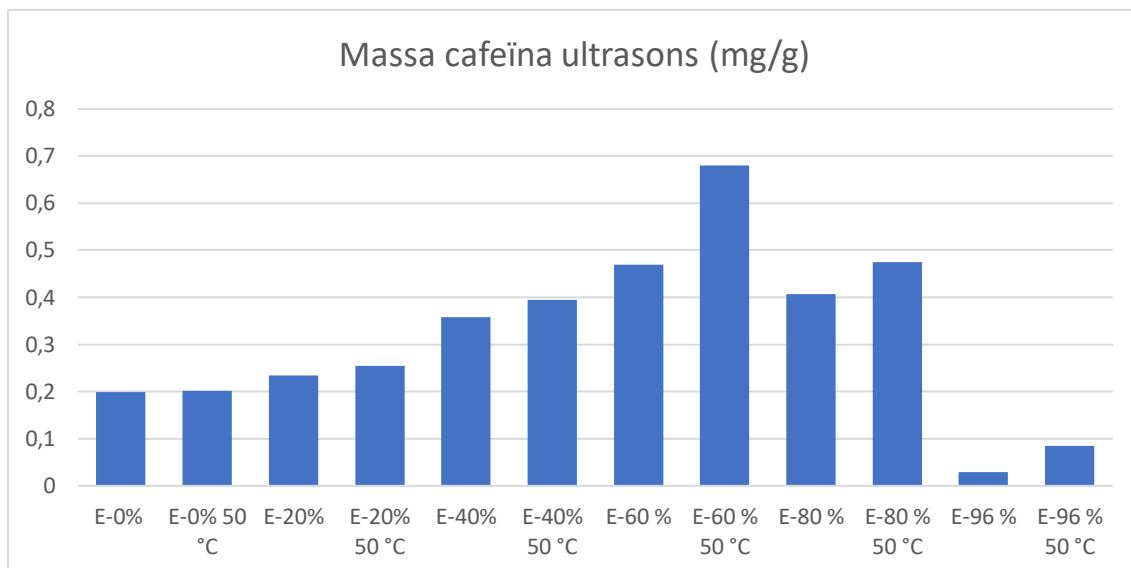
Mostra	Concentració mitja (ppm)	Coef. variació (%)	Massa mitja (mg/g)	Coef. variació (%)
E-0%	58,993	7,01	0,201	7,64
E-20%	70,806	11,87	0,254	11,22
E-40%	107,156	9,03	0,395	11,40
E-60 %	170,596	3,82	0,680	4,13
E-80 %	114,907	5,11	0,474	6,18
E-96 %	20,146	2,12	0,084	1,96

Taula 15: Resultats de cafeïna en ultrasons, a 50 °C.

Els experiments realitzats amb el mètode d'ultrasons per cafeïna mostren uns millors resultats que pel clorogènic, ja que el coeficient és elevat només en dos casos: en la mescla d'etanol/aigua 20% etanol, amb 31% (tant concentració com massa), i la de 0% d'etanol, amb un 19% (tant concentració com massa). Aquests coeficients elevats només es donen en la temperatura ambient, a 50 °C tots són correctes.

Pel que fa a la concentració, destaca l'extracció amb mescla d'etanol/aigua de 60% etanol, obtenint un resultat de 170,596 i 118,486 ppm, a 50 °C i a temperatura ambient, respectivament. Altres resultats destacables es donen en les mescles d'etanol/aigua de 40 i 80% d'etanol, però en menor mesura, entre 93,558 i 114,907 ppm.

L'extracció amb la mescla d'etanol/aigua de 60% etanol a 50 °C també és la que major massa de cafeïna aconsegueix extreure, tal com s'observa en el *Gràfic 4*. En total s'ha extret 0,680 mg de cafeïna per cada gram de marro de cafè.



Gràfic 4: Massa de cafeïna en ultrasons.

De la mateixa manera que en el mètode vòrtex, la massa i concentració de cafeïna extreta disminueix en els dos extrems del gràfic, en les concentracions més i menys concentrades. El punt mig és on l'extracció és òptima.

Cal afegir també que, a diferència de les extraccions d'àcid clorogènic, la que utilitza la mescla d'etanol/aigua més concentrada (96% d'etanol) si detecta la cafeïna, tot i que els resultats són els més baixos.

L'extracció amb la mescla d'etanol/aigua amb 60% d'etanol, a temperatura ambient, extreu una massa similar a les extraccions amb la mescla d'etanol/aigua amb 80% d'etanol (en ambdues temperatures).

També destacar que, de la mateixa manera que en l'estudi d'àcid clorogènic, els resultats més elevats entre igual concentració, pel que fa a les temperatures, es donen en les extraccions dutes a terme en 50 °C.

3.6. Comparació dels diferents mètodes d'extracció

En la *Taula 16* i *Taula 17*, es mostra el resum dels millors resultats amb els diferents mètodes d'extracció, en funció de la massa d'àcid clorogènic i cafeïna extreta per gram de marro de cafè.

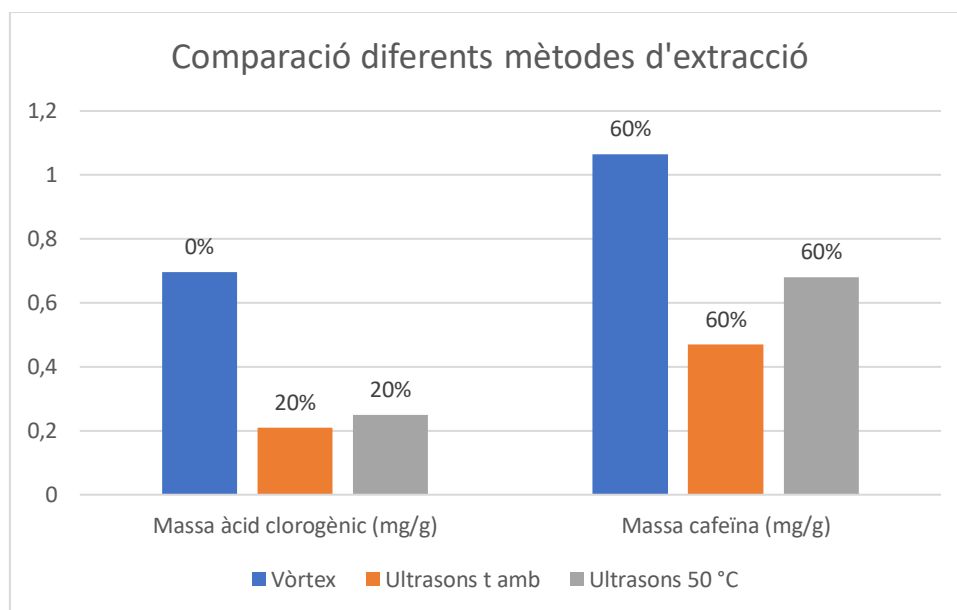
Mètode	Mescla etanol/aigua (% etanol)	Massa àcid clorogènic (mg/g)
Vòrtex	0	0,696
Ultrasons T amb	20	0,209
Ultrasons 50 °C	20	0,249

Taula 16: Comparació massa d'àcid clorogènic extreta segons mètode d'extracció.

Mètode	Mescla etanol/aigua (% etanol)	Massa cafeïna (mg/g)
Vòrtex	60	1,065
Ultrasons T amb	60	0,469
Ultrasons 50 °C	60	0,680

Taula 17: Comparació massa de cafeïna extreta segons mètode d'extracció.

Com s'observa en la *Taula 16*, per a l'àcid clorogènic es treballa millor amb una mescla d'etanol/aigua baixa en etanol, d'un 0 i 20% etanol, en aquest cas. En canvi, en la *Taula 17*, s'observa que per la cafeïna els resultats òptims es donen utilitzant una mescla d'etanol/aigua del 60% d'etanol.



Gràfic 5: Comparació diferents mètodes d'extracció.

En el *Gràfic 5* es pot observar la gran diferència entre els mètodes d'extracció. S'observa en cada barra el percentatge d'etanol referent a la mescla del dissolvent d'etanol/aigua. Convé destacar l'eficiència del mètode vòrtex, que en ambdós anàlisis aconseguir extreure major quantitat de massa per gram de marro de cafè.

Pel que fa a l'extracció amb ultrasons, els resultats més alts s'observen a la temperatura de 50 °C, en el cas de la cafeïna. Per l'àcid clorogènic, s'extreu pràcticament la mateixa quantitat de massa en ambdós casos.

4. Conclusions

El cafè és un dels productes més utilitzats a escala mundial. Per aquest motiu, també és un dels que més residus genera. Amb aquest treball s'ha pretès estudiar la viabilitat de diferents mètodes per a extreure i recuperar la cafeïna i l'àcid clorogènic del marro del cafè, dos productes importants que habitualment no s'aprofiten, ja que el marro no es reutilitza. Aquest camp d'estudi és valuós pel fet que si es desenvolupa en l'àmbit industrial, es podria reaprofitar i revalorar una gran quantitat d'aquest residu, perquè és un procediment senzill.

En primer lloc, cal destacar la dificultat en la determinació de la fase mòbil. Es van dur a terme moltes injeccions en l'HPLC per a triar la més adient, i fins passats 5 sessions de laboratori, no es va decidir la que finalment seria la utilitzada (93:7, aigua:acetonitril). Posteriorment, no va haver-hi cap problema amb aquesta.

És important recalcar també, la complexitat de tot el procés relacionat amb l'HPLC i el seu programari. Amb el temps es va acabar agafant l'hàbit i finalment ja es treballava amb fluïdesa.

A banda d'això, l'objectiu principal d'aquest treball ha quedat assolit. Aquest, consistia a comparar diferents mètodes d'extracció i mescles d'etanol/aigua com a dissolvents, per observar quin era el millor a l'hora d'extreure l'àcid clorogènic i la cafeïna. Analitzant els resultats finals obtinguts, es pot concloure que:

El mètode amb el qual s'aconsegueix extreure una major quantitat d'ambdós anàlits és el vòrtex. Cal subratllar que els resultats d'ultrasons són notablement més baixos en les dues temperatures estudiades.

La major massa d'àcid clorogènic extreta amb vòrtex ha estat 0,696 mg/g i en ultrasons, 0,249 mg/g (aquests valors s'han quantificat tenint en compte només 1 sol isòmer de clorogènic, el del patró utilitzat). En aquest cas la diferència suposa un 64%. S'ha observat que totes les extraccions d'àcid clorogènic mostren un patró similar, obtenint els resultats òptims utilitzant aigua com a dissolvent o una barreja etanol/aigua 20/80. Es pot afirmar que l'augment d'etanol en el dissolvent interacciona amb la molècula d'àcid clorogènic i fa minvar els resultats.

Pel que fa a la cafeïna, la major massa extreta ha estat 1,065 mg/g, mentre que amb ultrasons 0,680 mg/g. Per la cafeïna la diferència no és tan elevada, arribant al 36%. De la mateixa manera que en l'àcid clorogènic, els resultats de cafeïna mostren un patró similar en els diferents mètodes d'extracció. En aquest cas, els resultats òptims es donen en els valors mitjos de concentració d'etanol, concretament amb la mescla d'etanol/aigua del 60% d'etanol. Això implica que la molècula de cafeïna té més afinitat amb l'etanol i suporta millor els seus efectes.

S'ha de tenir en compte que, tot i haver una lleu diferència, els millors resultats d'ultrasons es donen amb la temperatura de 50 °C.

S'ha observat que l'etanol intervé en la forma del cromatograma obtingut per HPLC. A mesura que se n'augmenta la concentració en l'extracció, el pic de la cafeïna en el cromatograma es deforma. Per aquest motiu va ser clau diluir les mescles d'etanol/aigua iguals o superiors al 60%, ja que es va aconseguir evitar aquesta deformació i es va millorar la quantificació.

Cal tenir també en compte la descomposició del marro, perquè s'ha observat que les concentracions dels anàlits disminueixen dràsticament amb el pas del temps (disminució d'un 68% el clorogènic i un 80% la cafeïna en 8 mesos). És important comptar amb marro nou per a assegurar que els resultats són els òptims.

Com a conclusió final, afegir que el treball que s'ha realitzat és una petita part d'un gran camp d'estudi del qual se'n poden extreure molts més resultats i conclusions. Cal continuar investigant i experimentant amb diferents mètodes i procediments per a trobar el més eficient i que sigui viable per a traslladar-lo al nivell industrial.

Caldria provar altres dissolvents diferents de l'etanol, que siguin més afins a l'àcid clorogènic i interactuïn diferent amb els anàlits o altres fases mòbils que aportin cromatogrames més nets.

5. Bibliografía

- [1] International Coffee Organization, “Datos históricos.” https://www.ico.org/es/new_historical_c.asp (accessed Mar. 21, 2022).
- [2] P. S. Murthy and M. Madhava Naidu, “Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review,” *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 66, pp. 45–58, Sep. 2012. doi: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005.
- [3] L. dos Santos, “Extracción de ácido clorogénico y cafeína a partir de posos de café.”
- [4] M. D. Pavlović, A. v. Buntić, S. S. Šiler-Marinković, and S. I. Dimitrijević-Branković, “Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee,” *Separation and Purification Technology*, vol. 118, pp. 503–510, 2013, doi: 10.1016/j.seppur.2013.07.035.
- [5] F. Acevedo *et al.*, “Spent coffee grounds as a renewable source of bioactive compounds,” *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, vol. 7, no. 3, pp. 420–428, Jul. 2013, doi: 10.1166/jbmb.2013.1369.
- [6] H. Xu, W. Wang, X. Liu, F. Yuan, and Y. Gao, “Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction,” *Industrial Crops and Products*, vol. 76, pp. 946–954, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.054.
- [7] L. F. Ballesteros, M. J. Ramirez, C. E. Orrego, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, “Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds,” *Journal of Food Engineering*, vol. 199, pp. 1–8, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.11.014.
- [8] Y. F. Shang, J. L. Xu, W. J. Lee, and B. H. Um, “Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction,” *South African Journal of Botany*, vol. 109, pp. 75–80, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.sajb.2016.12.011.
- [9] A. S. Caballero-Galván, D. L. Restrepo-Serna, M. Ortiz-Sánchez, and C. A. Cardona-Alzate, “Analysis of Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (*Coffea arabica*),” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 9, no. 12, pp. 2381–2389, Dec. 2018, doi: 10.1007/s12649-018-0332-8.
- [10] N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, and P. Maran Jeganathan, “Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds,” *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 34, pp. 206–213, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.05.005.
- [11] Gene A. Spiller, *Caffeine*. CRC Press, 1997. doi: 10.1201/9781420050134.ch2.
- [12] S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira, “Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, no. 5, pp. 661–672, Jul. 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0565-z.
- [13] S. Perta-Crisan, C. Ursachi, and F.-D. Munteanu, “TRENDS IN VALORISATION OF SPENT COFFEE GROUNDS: A REVIEW,” 2019. [Online]. Available: <https://www.statista.com/chart/8602/top->

- [14] D. Nelson L., M. Cox M., and A. Lehninger L., *Principios de Bioquímica*, 7a ed. OMEGA, 2018.
- [15] M. Chávez-Sifontes and M. E. Domine, "LIGNINA, ESTRUCTURA Y APLICACIONES: MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL," Chávez-Sifontes & Domine, 2013. [Online]. Available: http://www.excedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/15
- [16] K. Speer and I. Kölling-Speer, "The lipid fraction of the coffee bean," 2006.
- [17] N. Martinez-Saez *et al.*, "Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products," *Food Chemistry*, vol. 216, pp. 114–122, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.173.
- [18] Bionity, "Caffeine." <https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Caffeine.html> (accessed Apr. 08, 2022).
- [19] M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, and M. B. Katan, "Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans 1," *J. Nutr*, vol. 131, pp. 66–71, 2001, Accessed: Apr. 08, 2022. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jn/article/131/1/66/4686566>
- [20] National Cancer Institute, "Chlorogenic acid," Jun. 02, 2014.
- [21] F. Suñer, M. Castelló, L. Seguí, and N. Betoret, "Fundamentos de la Extracción Sólido-Líquido."
- [22] Haiju Laboratory, "The working principle and use of vortex mixer," Jul. 27, 2020. <https://www.haiju-lab.com/The-working-principle-and-use-of-vortex-mixer-id3323432.html> (accessed Mar. 24, 2022).
- [23] Q. Nelly Carolina Medina Torres, "Efecto Del Ultrasonido En La Extracción Y Nanoencapsulación De Polifenoles De Limón Persa," 2017.
- [24] C. Carvalho, C. Narváez, and M. Páez, "GUÍA SOBRE PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA Y SUS APLICACIONES."
- [25] Vera Koester, "What is HPLC?," Jun. 20, 2016. https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC.html (accessed Apr. 08, 2022).
- [26] SHIMADZU, "What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ?."
- [27] Dr. Roger Terrill, "An Introduction to High Performance Liquid Chromatography".
- [28] M. N. Clifford, S. Knight, B. Surucu, and N. Kuhnert, "Characterization by LC-MS n of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 6, pp. 1957–1969, Mar. 2006, doi: 10.1021/jf0601665.

ANNEX 1. Comptabilització de pics de clorogènic

En el cas de l'àcid clorogènic, tal com s'explica en la memòria, existeixen varis isòmers d'aquesta molècula, que es tradueixen en diferents pics en el cromatograma obtingut per l'HPLC. Un d'aquests isòmers (àcid 5-Clorogènic, més concretament, àcid 5-Cafeoilquínic), és el que s'utilitza com a patró per quantificar. En la bibliografia existeixen referències que quantifiquen el clorogènic només amb el pic del patró (com ha estat el cas en aquest projecte) i d'altres que sumen les àrees dels pics dels altres isòmers per donar la quantitat total de clorogènic. En aquest annex, s'han volgut mostrar les diferències en fer-ho d'una manera o de l'altra.

El dopatge d'algunes mostres, ha permès identificar quin és el pic del patró de clorogènic utilitzat. En la *Taula 1818* i *Taula 19* es pot observar la diferència entre les dues versions de comptabilització de pics: comptar tots els pics de clorogènic (els que tenen l'àrea superior a 100.000 unitats), i comptar només el pic que augmenta en el dopatge.

Mostra	Extracció	Mitja tots pics (ppm)	Coef. Variació (%)	Mitja 1 pic (ppm)	Coef. Variació (%)	Increment ppm (%)
E-0%	Vòrtex	401,42	0,4	191,81	2,3	109,3
E-20%	Vòrtex	285,03	13,0	154,66	20,7	84,3
E-40%	Vòrtex	181,86	24,2	95,81	3,2	89,8
E-60%	Vòrtex	334,63	7,4	157,60	5,9	112,3
E-80%	Vòrtex	84,03	0,4	43,18	0,2	94,6
E-96%	Vòrtex	0,00	-	0,00	-	-
E-0%	Ultr. (t amb)	126,27	17,9	61,40	20,5	105,6
E-20%	Ultr. (t amb)	104,83	28,3	59,89	34,8	75,0
E-40%	Ultr. (t amb)	62,73	9,5	37,91	9,0	65,5
E-60%	Ultr. (t amb)	115,85	2,0	58,36	2,3	98,5
E-80%	Ultr. (t amb)	21,21	16,7	15,76	14,4	34,5
E-96%	Ultr. (t amb)	0,00	-	0,00	-	-
E-0%	Ultr. (50°C)	112,85	15,1	67,28	0,2	67,7
E-20%	Ultr. (50°C)	113,61	9,8	69,24	9,5	64,1
E-40%	Ultr. (50°C)	67,19	6,3	42,04	6,0	59,8
E-60%	Ultr. (50°C)	205,58	2,1	104,08	2,8	97,5
E-80%	Ultr. (50°C)	48,05	8,3	27,95	6,9	71,9
E-96%	Ultr. (50°C)	0,00	-	0,00	-	-

Taula 18: Comparació de concentració en les diferents comptabilitzacions de pics.

Mostra	Extracció	Mitja tots pics (mg/g)	Coef. Variació (%)	Mitja 1 pic (mg/g)	Coef. Variació (%)	Increment massa (%)
E-0%	Vòrtex	1,46	4,6	0,70	1,9	109,4
E-20%	Vòrtex	0,97	11,9	0,53	19,6	84,4
E-40%	Vòrtex	0,65	34,2	0,34	13,7	91,9
E-60%	Vòrtex	0,49	13,3	0,23	13,5	118,2
E-80%	Vòrtex	0,12	6,1	0,06	5,5	94,6
E-96%	Vòrtex	0,00	-	0,00	-	-
E-0%	Ultr. (t amb)	0,43	19,5	0,21	20,2	105,7
E-20%	Ultr. (t amb)	0,37	29,1	0,21	35,6	75,0
E-40%	Ultr. (t amb)	0,24	11,1	0,14	10,6	65,5
E-60%	Ultr. (t amb)	0,15	3,4	0,08	4,0	98,6
E-80%	Ultr. (t amb)	0,03	49,1	0,02	42,4	34,1
E-96%	Ultr. (t amb)	0,00	-	0,00	-	-
E-0%	Ultr. (50°C)	0,38	14,4	0,23	0,4	67,7
E-20%	Ultr. (50°C)	0,41	9,1	0,25	8,8	64,1
E-40%	Ultr. (50°C)	0,25	8,7	0,15	8,4	59,8
E-60%	Ultr. (50°C)	0,27	7,3	0,14	9,2	97,5
E-80%	Ultr. (50°C)	0,95	3,6	0,48	22,9	97,3
E-96%	Ultr. (50°C)	0,00	-	0,00	-	-

Taula 19: Comparació de massa en les diferents comptabilitzacions de pics.

En la *Taula 18* i *Taula 19* es mostren els resultats en concentració i en massa de clorogènic, respectivament, obtinguts comptabilitzant els pics de tots els isòmers del clorogènic o comptabilitzant un sol pic, el del patró. També s'afegeix una columna amb el % d'augment, calculat com l'augment de concentració o de massa en considerar tots els pics de clorogènic respecte de considerar un sol pic.

S'observa una important diferència entre ambdós mètodes, tant per la concentració com per la massa. Per culpa d'aquesta variació tan elevada, es decideix utilitzar els resultats obtinguts a partir del pic que augmenta amb el dopatge, ja que és el que coincideix amb el patró que s'ha utilitzat per a realitzar la recta de calibratge.