

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
UNAN-LEÓN

ÁREA DEL CONOCIMIENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
ÁREA ESPECIFICA DE QUÍMICA



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADOS EN QUÍMICA**

Contenido de cafeína mediante espectrofotometría UV-vis en bebidas energéticas.

Autores:

- Br. Carlos Iván Salgado Darce.
- Br. Dulce María Salgado Ramírez.

Tutor:

MSc. Fabio José Pallaviccini Narváez.

León, Nicaragua 2025

2025: 46/19 ¡Siempre más allá! ¡Avanzando en Revolución!

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
UNAN-LEÓN

ÁREA DEL CONOCIMIENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
ÁREA ESPECIFICA DE QUÍMICA



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADOS EN QUÍMICA**

Contenido de cafeína mediante espectrofotometría UV-vis en bebidas energéticas.

Autores:

-  Br. Carlos Iván Salgado Darce.
-  Br. Dulce María Salgado Ramírez.

Tutor:

MSc. Fabio José Pallaviccini Narváez.

León, Nicaragua 2025

2025: 46/19 ¡Siempre más allá! ¡Avanzando en Revolución!

Resumen

La presente investigación científica se basa en un estudio comparativo de cafeína presente en 4 bebidas energizantes recolectadas en diferentes supermercados y pulperías de Nicaragua, se les cuantificó el contenido presente de cafeína empleando un método normalizado oficial por espectrofotometría UV-vis de la asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), este estudio tiene un enfoque cuantitativo, llevándose la etapa experimental en el laboratorio Instrumental del departamento de química de la UNAN-León. Se evaluaron los siguientes parámetros del desempeño del método: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación, así también como la verificación el contenido de cafeína presente en la muestra en cumplimiento a la normativa Ecuatoriana INEN 2411, 2015.

Se obtuvieron los resultados de estos parámetros, que para la linealidad presenta un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9999, precisión evaluada en términos de repetibilidad obteniéndose un %CV de 0.23% y 0.322%, una exactitud, expresada en % de recobro o recuperación que esta entre 100.47 y el 100.56 %, así también la exactitud de las muestras analizadas obteniendo porcentajes de 100.09%(RT), 100.52% (RB), 100.02% (MT) y 100.38 (FY) y límite de detección y cuantificación de 0.2668 y 0.8085.

Finalmente se leyeron las muestras de las bebidas analizadas (RT, RB, MT, FY) en el espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 275 nm, obteniéndose las absorbancias de estas y se calculó las concentraciones de cafeínas, estas se encuentran entre 274.49 a 320.41 ppm, lo que indica que 3 de estas concentraciones están dentro de lo establecido de la norma ecuatoriana, sobre pasando levemente la muestra que dio 320.41 ppm el límite máximo de concentración de 320 ppm. Lo que demuestra que el método es apto para la cuantificación de cafeína en bebidas energizantes.

Por último, se estimó la incertidumbre de la medición, para las cuatro muestras analizadas, siguiendo los pasos de acuerdo la ISO GUM.

CARTA DE AUTORIZACIÓN DEL TUTOR.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA UNAN-LEON
AREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA.
AREA ESPECIFICA DE QUÍMICA

León 01 de abril del 2025

A.: Dr. Sergio López.

Jefe de área específica de Química.

Estimado Dr:

El motivo de la presente es para informarle los estudiantes: Carlos Iván Salgado Darce y Dulce María Salgado Ramírez han concluido su tesis monográfica titulada: "Contenido de cafeína mediante espectrofotometría UV-vis en bebidas energéticas", requisito básico para optar al título de Lic. en química. La cual se llevó a cabo en cuatro etapas: Búsqueda Bibliográfica. Desarrollo y elaboración del protocolo, desarrollo parte experimental, redacción de la misma y revisión por parte del tutor.

Una vez revisada la misma considero que la tesis reúne la estructura referenciada en REGLAMENTO DE FORMAS DE FINALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS aprobado en Acta No. 484 de la Sesión Ordinaria del Consejo Universitario, celebrada en la Sala de Sesiones del Consejo Universitario, el día cuatro del mes de junio del año dos mil diecinueve y Publicada en la Gaceta Universitaria, por lo tanto cumple con los requisitos analíticos para poder ser entregada al jurado para su fase de culminación, la cual es su defensa, por lo antes mencionado, le solicito realice sus respectivas gestiones para el nombramiento del jurado relacionado con el tema.

Atte.



MSc Favio Pallavicini.

Tutor de tesis monográfica.

INDICE

I.	Introducción.....	1
II.	OBJETIVOS	2
II.1	Objetivo General	2
II.2	Objetivos específicos	2
III.	Marco Teórico	3
III.1	Generalidades de las bebidas energizantes.....	3
III.2	Diferencias entre bebidas energéticas y bebidas isotónicas.....	3
III.3	Componentes de las bebidas energizantes.....	4
III.3.1	Cafeína	4
III.3.1.1	Química de la cafeína	4
III.3.2	Guaraná	5
III.3.3	Taurina	5
III.3.4	Carbohidratos	5
III.3.5	Aminoácidos	6
III.3.6	Vitaminas	6
III.4	Espectrofotometría.....	7
III.4.1	El espectro electromagnético	8
III.4.2	La región UV	9
III.4.3	La región visible.....	9
III.4.4	Medición de la transmitancia y la absorbancia.....	9
III.4.5	Ley de Lambert-beer	10
III.4.5.1	Ley de Lambert.....	11
III.4.5.2	Ley de beer	11
III.4.5.3	Representación gráfica de la Ley de Lambert y Beer	12
III.5	Extracción líquido-líquido	12
III.6	Otras Técnicas analíticas para determinar cafeína en bebidas energéticas	13
III.6.1	Cromatografía de gases.....	13
III.6.2	Cromatografía líquida de alta resolución	13
III.6.3	Electroforesis Capilar	14
III.7	Parámetros del desempeño del método	14
III.7.1	Linealidad.....	14
III.7.2	Repetibilidad (precisión).....	14

III.7.3 precisión intermedia	14
III.7.4 Exactitud	15
III.7.5 Límite de detección	15
III.7.6 Límite de cuantificación.....	15
III.8 Herramientas estadísticas	16
III.8.1 Intercepto	16
III.8.2 Pendiente	16
III.8.3 Coeficiente de Determinación.....	16
III.8.4 Anova de un factor.....	16
IV. Metodología	17
IV.1 Tipo de estudio.....	17
IV.2 Selección de las muestras de estudio.....	17
IV.3 Población y muestra de estudio	17
IV.4 Fuente de información.....	18
IV.5 Instrumento de recolección de datos	18
IV.6 Materiales, equipos y reactivos.....	18
IV.6.1 Materiales	18
IV.6.2 Equipos	19
IV.6.3 Reactivos	19
IV.7 Tratamiento de datos	19
IV.8 Operacionalización de variables	19
IV.9 Procedimiento	19
IV.9.1 Preparación de soluciones	20
IV.9.2 Preparación de la curva estándar	21
IV.9.3 Determinación.....	22
IV.9.3.1 Extracción líquido – líquido	22
IV.9.4 Lectura de la muestra.....	23
V. Análisis de los Resultados.....	24
V.1 Selección de longitud de onda de mayor absorción.....	24
V.2 Linealidad	24
V.3 Precisión.....	25
V.3.1 Repetibilidad del estándar de 15 ppm de cafeína.....	26

V.3.2 precisión intermedia del estándar de 15 ppm	27
V.3.3 Determinación de la exactitud del estándar de 15 ppm.....	27
V.3.4 Determinación de la exactitud de las muestras analizadas	29
V.3.5 Determinación de la repetibilidad en las muestras	29
V.3.4.1 Determinación de valores Outlier (Test de Hubber).....	30
V.3.4.2 comparación de varianzas (Test de Cochran).....	30
V.3.4.4 Análisis de varianza (Anova de un factor)	31
V.4 Limites de detección y de cuantificación.....	32
V.4.1 límite de detección.....	32
V.4.2 límite de cuantificación	32
V.5 Resultados de concentración de cafeína en las bebidas energéticas.....	33
V.6 Evaluación de la incertidumbre	36
V.6.1 Modelo matemático y fuentes de incertidumbres.....	36
V.6.2 Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.....	37
V.6.2.1 Cálculo de la incertidumbre de medición de la absorbancia de la muestra	37
V.6.2.2. Cálculo de la incertidumbre de la pipeta de 10 ml.	38
V.6.2.3 Cálculo de la incertidumbre del matraz aforado de 50 ml.	38
V.6.2.4 Incertidumbre debido al intercepto:	39
V.6.2.5 Incertidumbre debido a la pendiente:	39
V.6.2. Cálculos de los coeficientes de sensibilidad para cada uno de los componentes de la incertidumbre.	40
V.6.3 Incertidumbre combinada.....	40
V.6.4 Contribución de cada uno de los componentes de las muestras.....	41
VI. Conclusiones	46
VII. Recomendaciones.....	48
VIII. Bibliografía	49
IX. Anexos	54

Dedicatoria

Dedicamos esta monografía, fruto de nuestro esfuerzo y dedicación a Dios en primera instancia, cuya guía, bendiciones han iluminado cada paso de este camino académico y nos ha fortalecido para alcanzar este peldaño de nuestra vida.

A nuestros padres por su confianza y apoyo puesto en nosotros durante los largos años de nuestros estudios, ya que sin ellos no habríamos alcanzado a formarnos profesionalmente.

A todos nuestros docentes desde nuestros inicios en la escuela primaria hasta el final en la universidad ya que sin ellos no hubiese sido posible el formarnos.

Agradecimientos

Agradecemos en primer lugar a Dios, nuestro padre celestial, fuente de sabiduría, al brindarnos un poco de esta, así también fuerza, paciencia y compromiso para hacer posible el culminar nuestro trabajo monográfico y alcanzar nuestra meta.

A nuestros padres, al darnos su amor, confianza y apoyo para poder desarrollar todas las actividades necesarias para llevar a cabo nuestro trabajo monográfico.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a las siguientes personas: MSc. Emilio Escoto, MSc. Vernon Sandoval, MSc. Jorge Cisne, PhD. Leonardo Mendoza, a la dirección del departamento de química a mano de PhD. Sergio Grío, al compartirnos un poco de su tiempo, apoyo y dedicación al momento de necesitar ayuda o consejo desarrollando nuestra investigación y práctica de la monografía.

Así también agradecemos de manera especial a nuestro tutor MSc. Fabio Pallaviccini, al brindarnos un poco de su tiempo, paciencia, apoyo y conocimiento, asesorándonos en cada paso del desarrollo de este trabajo monográfico.

I. Introducción

Las bebidas energéticas son bebidas analcohólicas que están compuestas por grandes cantidades de carbohidratos como: sacarosa, glucosa, aminoácidos vitaminas C, entre otras. También contienen sustancias derivadas de hierbas como: extracto de guaraná y ginsen y sustancias menores como la carnitina, inositol, pantoteato de calcio, biotina, glucoronolactona y ácido cítrico. (Menéndez, 2011).

El aumento del consumo de bebidas energéticas en la población nicaragüense ha incrementado en los últimos años, para ello se realiza este estudio determinando así la cantidad de cafeína, ya que el consumo excesivo de esta tiene efectos adversos en la salud.

La administración de alimentos y medicamentos (FDA) de los estados unidos indica que el consumo en exceso de cafeína puede causar nerviosismo, sensación de tristeza, alta frecuencia cardiaca, insomnio, dolor de cabeza, malestar estomacal, ansiedad entre otros, que pueden observarse efectos tóxicos. (FDA, 2018).

En Nicaragua no se cuenta con una normativa la cual especifique requisitos fisicoquímicos para bebidas energéticas; por lo cual, hemos tomado como referencia la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2411, 2015, establece como valor de dosis mínima 250 mg/L y un valor máximo de 320 mg/L, por ello se determinará si la cantidad de cafeína en 4 marcas de bebida energéticas seleccionadas se encuentren en los límites permisibles establecidos por la norma.

Es por eso que en el presente estudio se pretende comparar el contenido de 4 bebidas energéticas seleccionadas por categorías como: precio, disponibilidad, popularidad, a la vez comparando la concentración de cafeína que estas poseen en cumplimiento con la normativa INEN 2411, 2015, el estudio fue llevado a cabo empleando como método normalizado, cafeína en bebidas no alcohólicas 962.13 de la AOAC, mediante espectrofotometría UV-vis, así como también la evaluación de parámetros del método como: linealidad, precisión y exactitud y límites de detección y cuantificación.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo General

- ✚ Comparar el contenido de cafeína mediante espectrofotometría UV-vis en cuatro marcas de bebidas energéticas distribuidas en Nicaragua.

II.2 Objetivos específicos

- ✚ Evaluar parámetros del desempeño del método (linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación).
- ✚ Determinar las concentraciones de cafeína presente en las muestras con incertidumbres, empleado por el método de espectrofotometría UV-vis.
- ✚ Verificar el cumplimiento de los valores permisibles de cafeína contenidos en las bebidas energéticas según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2411, 2015.

III. Marco Teórico

III.1 Generalidades de las bebidas energizantes.

Las bebidas energizantes son bebidas funcionales no alcohólicas que presentan efecto estimulante y están compuestas por una serie especial de ingredientes característicos como cafeína, guaraná, taurina, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas u otras sustancias con efectos fisiológicos o valor nutricional. Estas pueden contener otros ingredientes como glucoronolactona, aditivos, conservantes entre otras sustancias. Estas están disponibles con distintas fórmulas y múltiples sabores, tanto con azúcares como con variantes sin esta, de manera que el consumidor tenga la opción de elegir la que se adapte más a su gusto.



Ilustración 1 Distintas Bebidas energizantes (Menéndez, 2011)

III.2 Diferencias entre bebidas energéticas y bebidas isotónicas

Las bebidas energéticas tienen amplia distribución, su consumo ha incrementado debido a su fácil acceso y a las características de inocuidad que se les atribuyen. El poco conocimiento de su composición lleva a la confusión con las bebidas isotónicas o hidratantes, usándolas de forma excesiva. (Menéndez, 2011)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como “bebidas energizantes a aquellas que contienen cafeína, vitaminas u otros ingredientes. Por lo general estas se comercializan con el fin de aumentar la energía e incrementar el rendimiento físico y mental”.

Debemos diferenciar las bebidas energéticas de las bebidas isotónicas, que estas últimas son de uso deportivo, en cambio las bebidas energéticas o hipertónicas poseen sustancias que estimulan el sistema nervioso central, que buscan generar al consumidor efectos energéticos.

Por el contrario, las bebidas isotónicas, también conocidas como rehidratantes o deportivas, poseen en su composición glucosa y sales minerales que favorecen la rehidratación. (Rivera, 2018)

III.3 Componentes de las bebidas energizantes.

Las bebidas energizantes tienen una serie de componentes que varían según el tipo, la marca y otros aspectos; pero tienen en común componentes básicos, he aquí una pequeña descripción de algunos de ellos:

III.3.1 Cafeína

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, esta se encuentra naturalmente en granos de café, cacao, hojas de té, bayas de guaraná, entre otros. Así también esta se encuentra de manera sintética en bebidas carbonatadas, energizantes, helados, dulces, postres, etc.

Esta estimula el sistema nervioso, brinda energía y elimina la somnolencia, las bebidas como la soda, café, energizantes y té son popularmente conocida por su componente principal que es la cafeína. (Interempresa, 2023)

III.3.1.1 Química de la cafeína

La cafeína en su estado puro es un polvo blanco y amargo, su fórmula química es C₈H₁₀N₄O₂, su nombre sistemático es 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona o 1,3,7-trimetilxantina y su estructura molecular es la siguiente:

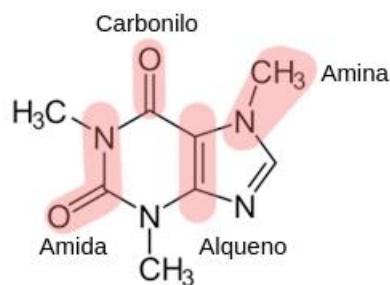


Ilustración 2 Estructura Química de la cafeína (Labster, 2023)

III.3.2 Guaraná

La guaraná cuyo nombre científico es *Paullinia cupana*, es una planta originaria del Amazonas. Es un ingrediente constantemente usado en las bebidas energéticas y puede resultar peligroso en grandes cantidades. La guaraná también contiene compuestos como la teobromina y teofilina, las cuales son similares a la cafeína. (Medlineplus, 2023)

La Administración de Medicamentos y Alimentos estadounidense (FDA) establece que la guaraná es reconocida como seguro, generalmente esto cuando se administra correctamente. No existe una dosis efectiva comprobada para la guaraná. (FDA, 2018)

III.3.3 Taurina

La taurina es un aminoácido natural derivado del metabolismo de la metionina y la cisteína, esto debido a que esta contiene un grupo ácido sulfónico, en lugar de un grupo ácido carboxílico. Componente abundante de los alimentos a base de pescado y carne, se ha utilizado como suplemento oral en el tratamiento de trastornos como la fibrosis quística y la hipertensión.

Tiene funciones importantes en el corazón, el cerebro y el sistema inmunológico, apoya el crecimiento de los nervios, mantiene una hidratación adecuada y produce sales biliares que ayudan en la digestión. (Geraciotti, 2013)

III.3.4 Carbohidratos

Los carbohidratos son moléculas que están formadas por átomos de hidrógeno, carbono y oxígeno, estos polihidroxialdehidos o cetonas se descomponen para formar compuestos, contienen almidón, fibra (cuyo sabor es dulce), así mismo contienen materiales estructurales como la celulosa. (LibreTExs, 2014)

Mayormente estos se encuentran en alimentos de origen vegetal, estos se encuentran en alimentos como: pan, cereales, pastas, miel, legumbres, etc. Las bebidas energizantes tienen dos tipos de carbohidratos: carbohidratos simples y

complejos. El tipo de carbohidratos está determinado por la estructura química de los alimentos y la rapidez con la que el cuerpo los digiere. (Bonin, 2020)

III.3.5 Aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas que están conformadas por un grupo amino en su extremo y un grupo carboxilo en el otro extremo de la molécula, conforman a las proteínas a la vez participan en las funciones celulares como la biosíntesis de porfirinas, pirimidinas, urea, etc. Estos se diferencian por la composición de su estructura química de sus grupos laterales R. (Olvera, 2012)

III.3.6 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas y a la vez complejas conforme a su estructura, son importantes para nuestro organismo en proporciones pequeñas, , en su mayoría las vitaminas a excepciones de las vitaminas estas también se conocen como micronutrientes B1, B2, D, K y ácido fólico no son sintetizadas por nuestro organismo y si llegan a hacerlo, lo hacen por cantidades insuficientes, por lo cual es necesario su consumo, para darle aporte a nuestro organismo. (Raviña, 2004)

Tabla 1 Componente de las bebidas energizantes comercializadas en Nicaragua (Profeco, 2015)

	RAPTOR	RED BULL	MONSTER ENERGY	FURY	ADRENALINE RUSH	AMP 365	JET
TAMAÑO PORCIÓN	250 mL	100 mL	200 mL	250 mL	237 mL	237 mL	250 mL
CALORIAS	110 kcal	45 kcal	92 kcal	115 kcal	120 kcal	110 kcal	60 kcal
AZUCAR	28 g	11 g	22 g	28 g	28 g	28 g	15 g
PROTEINA	0 g	0 g	0 g	0 g	1 g	0 g	0 g
CAFEINA	75 mg	19 mg	70 mg	75 mg	64 mg	71 mg	42 mg
TAURINA	750 mg	400 mg	600 mg	----	755 mg	700 mg	500 mg
GLUCORONO-LACTONA	----	----	4 mg	----	-----	----	----
CARBOHIDRATOS	29 g	11 g	22 mg	29 g	29 g	28 g	15 g
SODIO	40 mg	40 mg	155 mg	103 mg	90 mg	40 mg	10 mg
VITAMINA B2	----	----	88 %	----	-----	----	----
VITAMINA B3	80 %	100 %	47 %	50 %	-----	25%	----
VITAMINA B6	190 %	250 %	80 %	41 %	472 %	----	50 %
VITAMINA B12	20 %	80 %	500 %	----	187 %	----	----

III.4 Espectrofotometría

La Espectrofotometría es una técnica experimental muy empleada para la detección específica de moléculas. Se caracteriza por su precisión, su sensibilidad y su aplicación a moléculas de distinta naturaleza y estados de agregación.

Las moléculas absorben energía luminosa y la almacenan en forma de energía interna. Esto permite que se inicien ciclos importantes de muchos organismos, entre ellos el de la fotosíntesis en plantas y bacterias. La mecánica cuántica dice que la luz está compuesta de fotones cada uno de los cuales tiene una energía:

$$E_{\text{fotón}} = h \cdot v = h \cdot c / \lambda$$

donde c es la velocidad de la luz, v es su frecuencia, λ su longitud de onda y $h = 6.6 \cdot 10^{-34} \text{ J/s}$ es la constante de Planck. (Olavide, 2018)

Un espectrofotómetro UV/VIS mide la intensidad de la luz que pasa a través de una solución de muestra en una cubeta, y lo compara con la intensidad de la luz antes de que pase a través de la muestra.

Los espectrofotómetros están compuestos por una fuente de luz, lentes, una cubeta, un dispositivo dispersivo para separar las diferentes longitudes de onda de la luz (por ejemplo, un monocromador) y un detector adecuado.

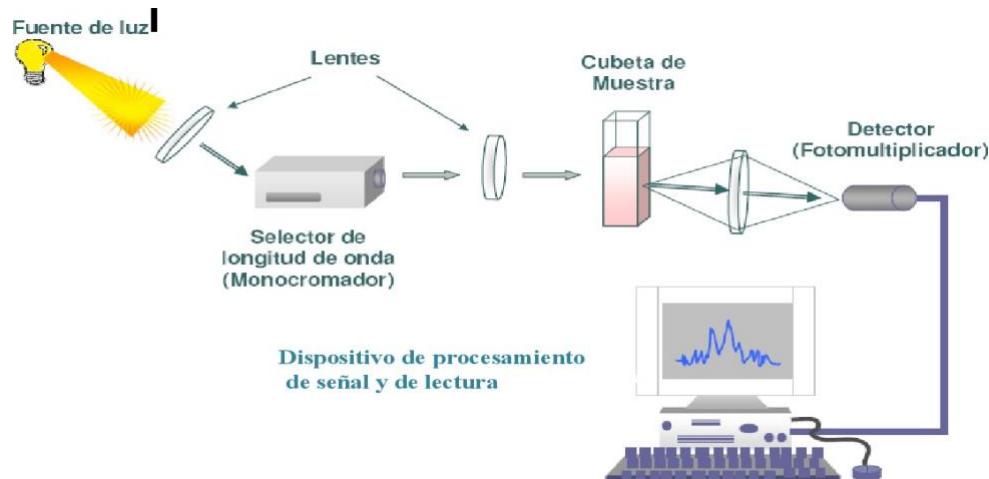


Ilustración 3 Componentes principales de un espectrofotómetro (Olsen, 1985)

III.4.1 El espectro electromagnético

La radiación ultravioleta y visible es una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación como la radiación infrarroja (IR), los rayos gamma, los rayos x, las ondas radioeléctricas, etc. (Agilent, 2021)

Cada color tiene una longitud de onda específica, como por ej: La luz roja con longitud de onda de 660 nm, en cambio la luz verde tiene una longitud de onda de 520 nm. Así, los diferentes componentes de la luz se caracterizan por una longitud de onda específica. La suma de todas las longitudes de onda, se denominan espectro. Más específicamente, un espectro representa una distribución de energía radiante. Por ejemplo, el espectro electromagnético de la luz visible oscila entre aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 700 nm.

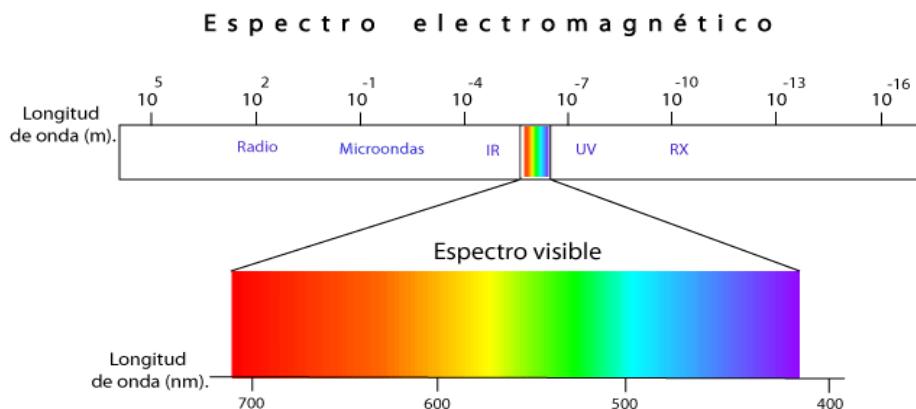


Ilustración 4 Espectro Visible(400-700nm) representación de una pequeña porción del espectro electromagnético (Cosimo, 2015)

La energía de las ondas electromagnéticas está relacionada con sus longitudes de onda; cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor es la energía. Por ejemplo, la luz violeta tiene una longitud de onda más corta que la luz roja y por tanto una mayor energía, mientras que la luz infrarroja tiene menos energía que la luz visible debido a su longitud de onda más larga.

La absorción de luz se puede emplear en la química analítica para la caracterización y cuantificación de sustancias. (Cosimo, 2015)

III.4.2 La región UV

Es el rango de longitudes de onda que van a partir de 195 a 400 nm, por lo cual esta región es de energía muy alta. Los compuestos que presentan dobles enlaces aislados, triples enlaces, grupos carbonilos, entre otros heteroátomos, tienen su absorbancia máxima en la región ultravioleta, importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de distintos compuestos orgánicos.

III.4.3 La región visible

En esta región el color visible de una solución corresponde a las distintas longitudes de onda de luz transmitida, es decir no absorbe. El color absorbido es el complementario del color transmitido. Para una medición de absorción es necesaria la longitud de onda de la solución coloreada que absorbe luz. (Nieves Abril Díaz, 2015)

Tabla 1 Colores de la luz visible, medida de la absorbancia (Miller, 2002)

Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)	Color absorbido	Color observado
380–420	Violeta	Amarillo verdoso
420–440	Azul violáceo	Amarillo
440–470	Azul	Naranja
470–500	Verde azulado	Rojo
500–520	Verde	Púrpura
520–550	Verde amarillento	Violeta
550–580	Amarillo	Azul violáceo
580–620	Naranja	Azul
620–680	Rojo	Verde azulado
680–780	Púrpura	Verde

III.4.4 Medición de la transmitancia y la absorbancia

Cuando un rayo de luz de determinada longitud de onda de intensidad (I_o) pasa a través de una solución de un compuesto que absorbe luz, el compuesto absorberá de la radiación incidente y dejará pasar el resto, cumpliéndose: $I_o = I_a + I_t$

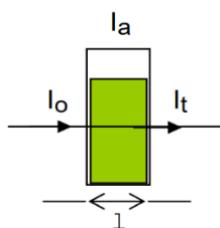


Ilustración 5 Representación Gráfica de un rayo de luz que incide de manera perpendicular sobre una dilución X compuesto (Díaz, 2018)

La **absorbancia (A)** es un concepto relacionado con la muestra, debido a que indica cual cantidad de luz es absorbida por la misma, es definida como el logaritmo de $1/T$, quedando: $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_0$. Si la intensidad incidente y la intensidad transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que no absorbe la muestra en determinada longitud de onda y por lo tanto A vale log 1 = 0.

La **transmitancia (T)** de una sustancia en solución, será la relación entre la cantidad transmitida de luz que llega al detector una vez atravesada la muestra, I_t y I_0 , cantidad de luz incidente sobre ella I_0 , se representa generalmente de la siguiente manera: $\%T = I_t/I_0 \times 100$.

III.4.5 Ley de Lambert-beer

Cuando un haz de luz monocromática atraviesa una solución, la absorbancia es proporcional a la distancia recorrida por la luz que pasa a través de la solución absorbente y a la concentración del analito. La distancia recorrida por la luz a través de la solución es el camino óptico y se mide comúnmente en cm.

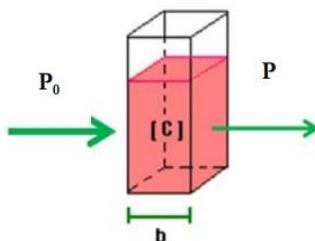


Ilustración 6 Ley de Lambert-Beer (Moreno, 2018)

P_0 = potencia de la luz monocromática incidente.

P = potencia de la luz luego de atravesar la solución de concentración

c y b = camino óptico

III.4.5.1 Ley de Lambert

Esta ley demuestra que cuando la luz monocromática pasa por un medio homogéneo, la reducción de la intensidad del haz de luz incidente será proporcional al espesor del medio, lo cual equivale que la intensidad de la luz transmitida disminuirá exponencialmente al incrementar el espesor del medio absorbente.

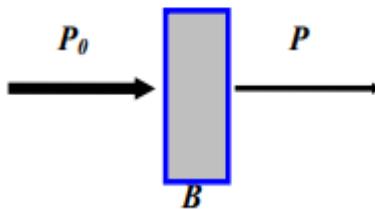


Ilustración 7 Ley de Lambert (Canuto, s.f.)

La siguiente relación matemática da cuenta de esta ley: $P/P_0 = e^{-kb}$

P₀: Intensidad de la luz incidente

P: Intensidad de la luz transmitida

b: Espesor del medio absorbente

k: es una constante, depende del espesor del medio absorbente, la naturaleza del soluto, la longitud de onda de la luz incidente y de la naturaleza del medio.

III.4.5.2 Ley de beer

La intensidad de un haz de luz monocromática se reduce exponencialmente al incrementar la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz atraviesa un medio homogéneo. (Canuto, s.f.)

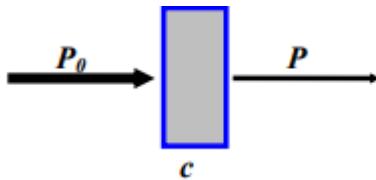


Ilustración 8 Ley de Beer (Canuto, s.f.)

La relación matemática correspondiente a esta ley es la siguiente: $P/P_0 = e^{-kc}$

P₀: Intensidad de la luz incidente.

P: Intensidad de la luz transmitida.

c: Concentración de la solución.

Estas leyes se combinan en una sola, resultando la Ley de Lambert-Beer.

$$\log \frac{P_0}{P} = a \times b \times c$$

ó

$$A = \epsilon \times c \times b$$

III.4.5.3 Representación gráfica de la Ley de Lambert y Beer

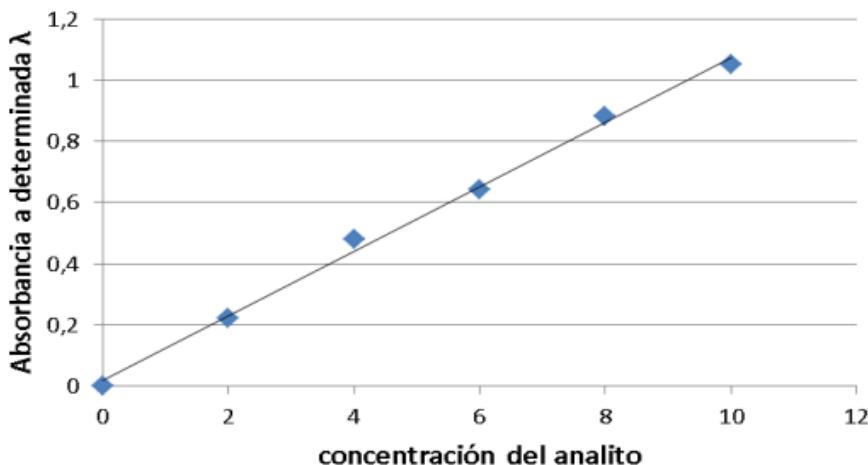


Ilustración 9 representación gráfica de la absorbancia medida a una longitud de onda determinada en función de la concentración de analito (Moreno, 2018)

En esta se puede observar la representación gráfica de la ley de Lambert-Beer, la cual es una recta. En el eje de las ordenadas (eje Y) están representados los valores de A y en el eje de las abscisas (eje X) están representadas las concentraciones del analito. La pendiente de la recta pertenece al producto $\epsilon \times b$.

III.5 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es una de las técnicas de preparación de muestras más antiguas. Permite mediante un proceso físico, purificar o extraer clases de compuestos (o solutos) de la matriz (o eluyente) en la que se solubilizan.

El disolvente de extracción no debe ser miscible con el eluyente y al mismo tiempo solubilizar tantos solutos como sea posible. La mezcla obtenida permite obtener el extracto (disolvente de extracción rico en solutos) y el refinado (eluyente empobrecido en solutos). Realizar varios pasos de extracción permite agotar el eluyente en soluto a favor de enriquecer el extracto. (Interchim, 2016)

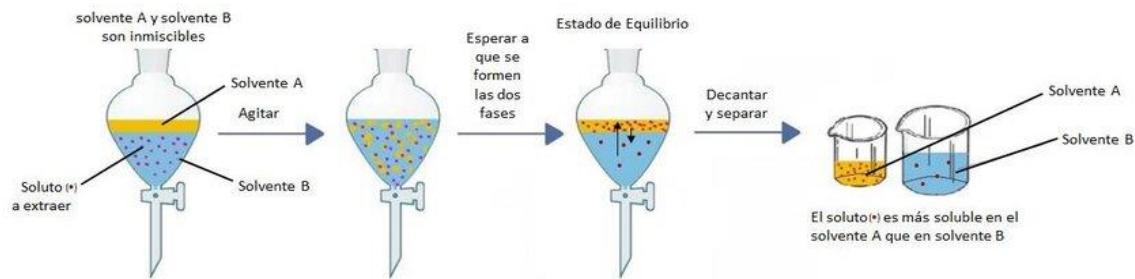


Ilustración 10 Extracción Líquido-Líquido (Arujo, 2023)

III.6 Otras Técnicas analíticas para determinar cafeína en bebidas energéticas

III.6.1 Cromatografía de gases

En cromatografía de gases los compuestos de una muestra vaporizada se separan como efecto de que se distribuyen entre una fase gaseosa y una fase estacionaria, la cual es un líquido volátil dentro de la columna.

La elución se desarrolla mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su función es transportar este a través de la columna. (Douglas A. Skoog D. M., 2015)

III.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es el tipo de cromatografía por elución más versátil y ampliamente utilizado. Se utiliza una presión elevada, esto para forzar al disolvente a que se desplace por una columna que contiene partículas finas, consiguiendo así separaciones de mayor resolución.

El equipo consta de un sistema de suministro de disolvente, un detector, una columna de alta presión, una válvula de inyección y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados. La fase móvil es un solvente líquido que contiene la muestra en forma de una mezcla de solutos. (Douglas A. Skoog D. M., 2015)

III.6.3 Electroforesis Capilar

La electroforesis es un método de separación que se fundamenta en las distintas velocidades de migración de especies cargadas dentro de un campo eléctrico de corriente directa.

Una separación electroforética se lleva a cabo mediante la inyección de una pequeña banda de la muestra en una solución amortiguadora alojada en un tubo estrecho o en un medio de soporte poroso y plano. Las separaciones se basan en las diferencias de la relación carga-tamaño entre los diferentes analitos presentes en la muestra. (Douglas A. Skoog D. M., 2015)

III.7 Parámetros del desempeño del método

III.7.1 Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad de generar resultados proporcionales a la concentración de un analito en un rango de aceptación. Generalmente se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación (r) elevado, del 0.99. No obstante, este criterio no basta para demostrar si existe relación lineal, La recta de calibración se representa con la siguiente ecuación:

$$y = a + bx$$

III.7.2 Repetibilidad (precisión)

Es el grado de similitud entre diversos resultados analíticos individuales, esto cuando el procedimiento se utiliza repetidamente a distintas porciones de una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de laboratorio, atmosféricas (presión, temperatura, etc) y periodos de tiempo iguales.

III.7.3 precisión intermedia

También conocida como reproducibilidad intralaboratorio, se evalúa mediante la comparación de los resultados de precisión de un método a lo largo del tiempo dentro de un mismo laboratorio. (Avendaño, 2015)

III.7.4 Exactitud

Evaluación de la diferencia entre los resultados esperados y el valor de referencia, debido a un error sistemático del método y del laboratorio, es compleja de determinar ya que el valor esperado siempre es desconocido, por ello se sugiere que el valor esperado se utilice un valor aceptado. La exactitud se suele medir en error absoluto y error relativo.

III.7.5 Límite de detección

Se refiere a la cantidad mínima qué puede detectarse por un método o bien por un sistema medición a un nivel de confianza establecido, este dependerá de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el tamaño de las fluctuaciones estadísticas en la señal del blanco.

III.7.6 Límite de cuantificación

Es la concentración mínima de un analito que origina medidas cuantitativas con apta exactitud y precisión, del rango lineal esto se puede considerar como límite inferior. (Douglas A. Skoog D. M., 2015)

III.7.7 Evaluación de la incertidumbre

La incertidumbre es el intervalo dentro del que se puede encontrar el valor real de aquello que se mide, esta engloba tanto errores aleatorios como sistemáticos. La incertidumbre se divide en 2 tipo A y B.

La incertidumbre tipo A: esta se evalúa mediante observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad, se estima en base de la dispersión de los resultados (desviación estándar) obtenida en el curso de la medición.

La incertidumbre tipo B: se evalúa por diversos resultados de mediciones anteriores, experiencias u conocimientos del comportamiento y las propiedades de los materiales e instrumentos o bien de especificaciones del fabricante.

A partir de las incertidumbres antes mencionadas se calcula la incertidumbre estándar, para luego evaluar la incertidumbre estándar. (Fanny Osorio, 2009)

III.8 Herramientas estadísticas

III.8.1 Intercepto

Relacionado con la presencia de errores sistemáticos o interferencias, el intervalo de confianza del intercepto debe incluir a 0 para efectuar con el requerimiento de proporcionalidad en los métodos. Se refleja en la siguiente ecuación: $a = \bar{y} - b_1 \bar{x}$

III.8.2 Pendiente

Esta demuestra la sensibilidad de la calibración del método, se expresa en unidades de concentración entre unidades de respuestas, se calcula con la siguiente ecuación: (Romero y Avendaño, 2015).

$$b_1 = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y})}{\sum(x_1 - \bar{x})^2}$$

III.8.3 Coeficiente de Determinación

El coeficiente de determinación (R^2) mide qué tan bien un modelo estadístico predice un resultado. El resultado está representado por la variable dependiente del modelo. El valor más bajo posible de R^2 es 0 y el valor más alto posible es 1. Cuanto mejor sea el modelo para predicciones, más cerca estará su R^2 de 1. (Turney, 2022)

III.8.4 Anova de un factor

El análisis de la varianza (ANOVA) es una técnica estadística que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. se puede emplear para separar el cambio causado por el error aleatorio de cualquier otra variación causada al variar el factor de control. De esta manera se puede contrastar si una alteración del factor de control lleva a diferencias significativas en los valores medios obtenidos.

ANOVA se puede utilizar para separar y estimar las fuentes de variación, Ambos tipos de análisis estadísticos descritos anteriormente, es decir, donde hay un factor, ya sea controlado o aleatorio, además del error aleatorio de las medidas, se conocen como ANOVA de un factor. (J, 2002)

IV. Metodología

IV.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio de esta investigación es comparativo y cuantitativo, ya que pretende comparar las cantidades de cafeína que contienen las distintas bebidas energizantes distribuidas en Nicaragua, obteniendo y evaluando los datos con un enfoque estadístico.

IV.2 Selección de las muestras de estudio

En los últimos años se han popularizado en Nicaragua una gran variedad de bebidas energéticas, por lo cual ha habido un gran aumento del consumo de estas por la población nicaragüense, uno de sus principales ingredientes es la cafeína, la que tiene efectos adversos en la salud, por ello se hace este estudio en este analito en cuestión, seleccionando cuatro distintas muestras de bebidas energéticas las cuales fueron elegidas por distintos criterios como:

- Popularidad: Su alto consumo por la población.
- Precio: diferencia de precios (del más bajo al más alto).
- Disponibilidad: se encuentran distribuidas por los distintos supermercados y pulperías del país.

En base a estos criterios se seleccionaron 6 marcas de bebidas energéticas distribuidas en nicaragua, de las cuales las elegidas a analizar son: **RB, MT, RT, FY**.

Estas se decidieron codificar, con el objetivo de evitar conflictos legales con las distintas empresas que podrían considerar que los resultados obtenidos en el estudio puedan dañar la imagen del producto.

IV.3 Población y muestra de estudio

La población se encuentra conformada por distintas bebidas energizantes, obtenida en diversos comercios nicaragüenses, analizadas mediante la extracción de la cafeína por extracción líquido – líquido y cuantificada por espectrofotometría ultravioleta visible.

IV.4 Fuente de información

Investigación bibliográfica (Libros de texto, Artículos científicos, Revistas científicas, Tesis, etc) y datos recolectados en la práctica.

IV.5 Instrumento de recolección de datos

Espectrofotómetro Uv-Visible Thermo Scientific GENESYS 10S

IV.6 Materiales, equipos y reactivos.

IV.6.1 Materiales

1. Beaker de 250 mL marca pyrex, clase A.
2. Beaker de 500 mL marca pyrex, clase a.
3. Erlenmeyer de 125 mL marca Kimax clase A.
4. Pizeta.
5. Espátula.
6. Varilla de vidrio.
7. Vidrio reloj marca Kimax.
8. Embudo de vidrio marca Pyrex.
9. Papel filtro Whatman.
10. Embudo de separación de 125 mL marca Pyrex
11. Soporte universal.
12. Soporte para embudo de decantación.
13. Probeta de 100 mL marca Kimax.
14. Probeta de 10 mL marca Kimax.
15. Balón de aforo de 100 mL, marca Pyrex, clase A, ± 0.8 mL, 20 °C.
16. Pipeta serológica de 10 mL marca Pyrex, clase A.
17. Pipeta volumétrica de 10mL marca Pyrex, clase A.
18. Pipeta volumétrica de 1 mL marca Pyrex, clase A.
19. Dispensador.
20. Celdas de cuarzo de 10 mm.

IV.6.2 Equipos

1. Balanza analítica sartorius practum: Repetibilidad 0,1 mg.
2. Agitador magnético.
3. Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Genesis 10S UV-Vis
repetibilidad: $\pm 0,5$ nm.

IV.6.3 Reactivos

1. Sulfito de sodio anhidro, 97.0%, Merck.
2. Tiocianato de potasio: 99.6 %, Baker Analyzed.
3. Ácido fosfórico.
4. Cloroformo 99.9 % Grado HPLC, Fisher Scientific
5. Hidróxido de sodio, 97.0 % Fisher Scientific.
6. Permanganato de potasio: 99.3 %, Fisher Scientific.
7. Estándar de cafeína.

IV.7 Tratamiento de datos

Este se realizará mediante la implementación de la herramienta Excel de Microsoft office, su extensión análisis de datos. Así también se aplicarán para su análisis herramientas de estadística básica.

IV.8 Operacionalización de variables

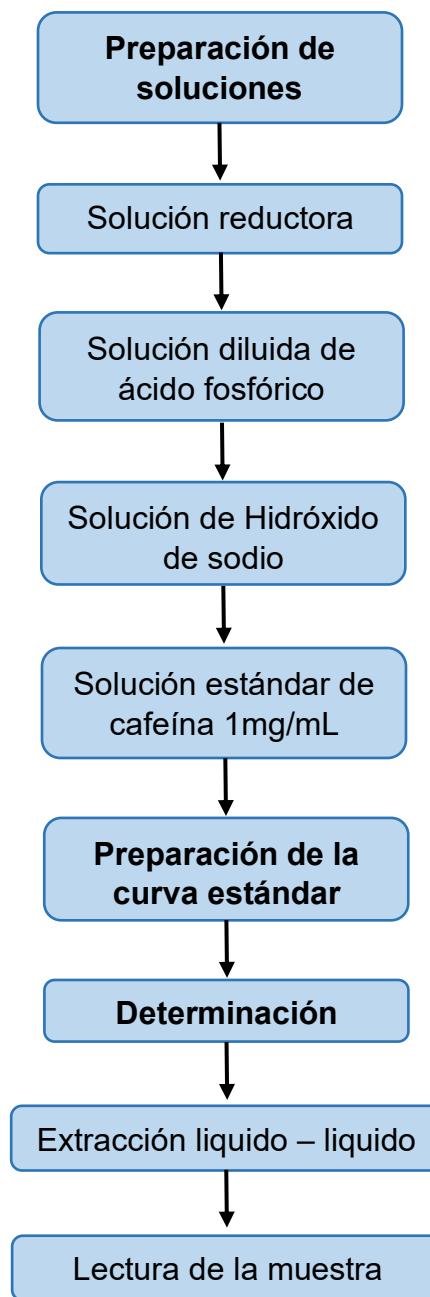
Se consideraron algunas variables para este estudio, sin embargo, sobresalen las siguientes:

Variables	Definición conceptual	Escala de medición	Indicadores
Temperatura	Magnitud física que expresa el grado de frío y calor.	cuantitativa	Termómetro
Absorbancia	Medición fotométrica de una sustancia que es absorbida.	cuantitativa	Espectrómetro

IV.9 Procedimiento

El procedimiento experimental está comprendido según el método normalizado de cafeína en bebidas no alcohólicas 962.13 de la AOAC, (AOAC, 2024) el cual de manera general se ve reflejado en el siguiente flujograma.

Gráfico 11. FlujoGRAMA del procedimiento



IV.9.1 Preparación de soluciones

IV.9.1.1 Solución reductora: Disolver 2.5 g de Sulfito de sodio (Na_2SO_3) y 2.5 g Tiocianato de potasio (KSCN) en agua destilada y diluir a 50 mL.

IV.9.1.2 Solución diluida de ácido fosfórico: Diluir 1.5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) en 8.5 mL de agua destilada.

IV.9.1.3 Solución de Hidróxido de sodio: Disolver 2.5 g de hidróxido de sodio en 7.5 mL de agua destilada.

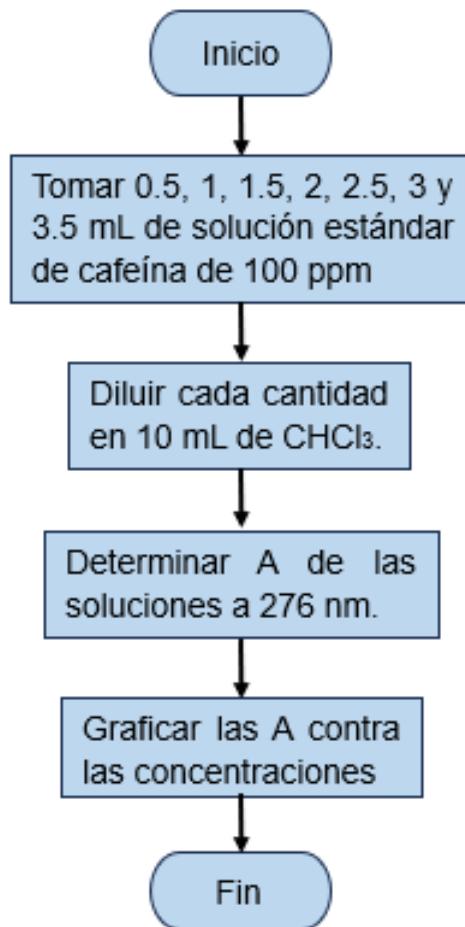
IV.9.1.4 Solución estándar de cafeína 1000 ppm: Disolver 50 mg de estándar de cafeína en cloroformo (CHCl_3) y diluir a 50 mL con cloroformo.

IV.9.1.5 Solución estándar diluida de cafeína 100 ppm: Tomar 2.5 ml de solución de 1000 ppm, adicionarla a un balón de aforo de 25 ml y aforar con cloroformo.

IV.9.2 Preparación de la curva estándar

1. Preparar soluciones estándar diluidas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 ppm balones de 10 mL.
2. Determinar Absorbancia (A) de todas las soluciones a aproximadamente 276 nm contra el blanco (CHCl_3) en celdas de 1 cm.
3. Grafique absorbancia (A) contra la concentración.

Gráfico 12 Flujograma de la preparación de soluciones

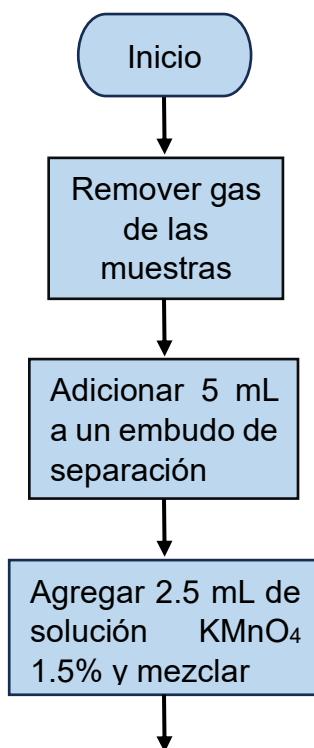


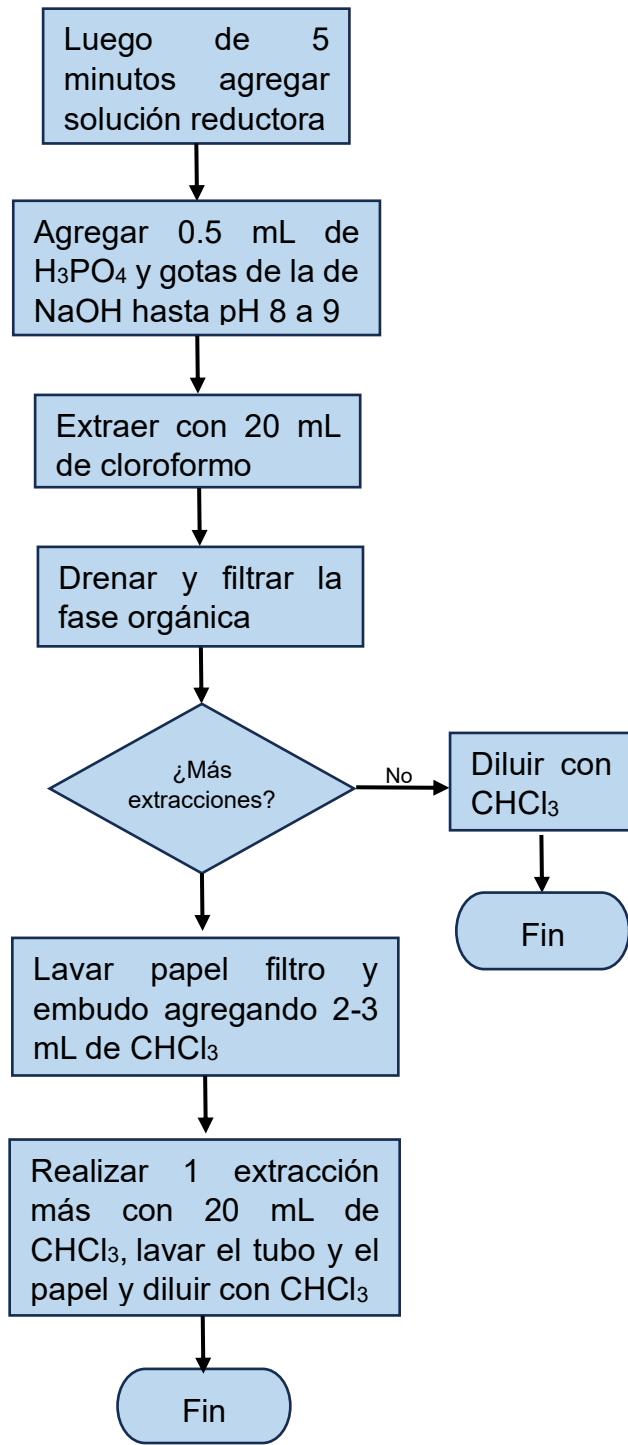
IV.9.3 Determinación

IV.9.3.1 Extracción líquido – líquido.

1. Remueva el gas por agitación o tratamiento ultrasónico.
2. Pipetear 5 mL de la muestra en un beaker de 100 mL, agregar 2.5 ml de solución KMnO_4 al 1.5% (p/v) y mezcle.
3. Después de exactamente 5 minutos, agregar 5 mL de solución reductora y mezcle. Agregar 0.5 mL de solución diluida de H_3PO_4 .
4. Agregar gotas de solución de NaOH hasta tener un pH entre 8 y 9 (de 2 a 3 gotas) mezclar y extraer con 25 mL de cloroformo durante 1 minuto.
5. Agitar y liberar el gas del embudo de separación y drenar la capa inferior (Fase orgánica), y filtre a través de papel de 7 cm en un beaker de 250 mL.
6. Agregar 2-3 mL de CHCl_3 al embudo de separación y drenar a través de un papel filtro, posteriormente lavar el papel filtro con 2-3 mL de CHCl_3 .
7. Extraer la solución con 20 mL de CHCl_3 , lave el tubo y el papel como antes.
8. Verter la fase orgánica a un matraz de 50 mL y aforar con CHCl_3 .

Gráfico 13 Flujograma del proceso de la determinación





IV.9.4 Lectura de la muestra

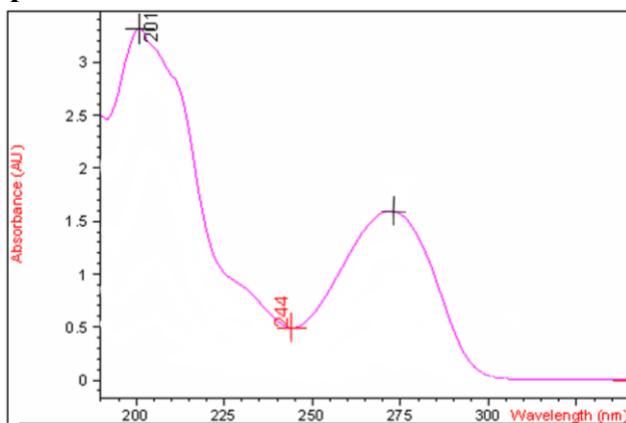
1. Determinar la absorbancia (A) de esta solución a la longitud de onda máxima de máxima absorbancia.
2. Determinar la concentración de cafeína a partir de una curva estándar (curva de calibración normal).

V. Análisis de los Resultados

V.1 Selección de longitud de onda de mayor absorción

Se realizó un barrido espectral en el espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Genesis 10S, para una solución de estándar de cafeína de una concentración de 30 ppm usando una celda de cuarzo, haciendo el barrido a un rango de longitud de onda entre 200-300 nm, siendo su mayor región de absorción de 245 a 285 nm, teniendo este un pico máximo en 276 nm de absorción.

Gráfico 4 Barrido espectral de cafeína



V.2 Linealidad

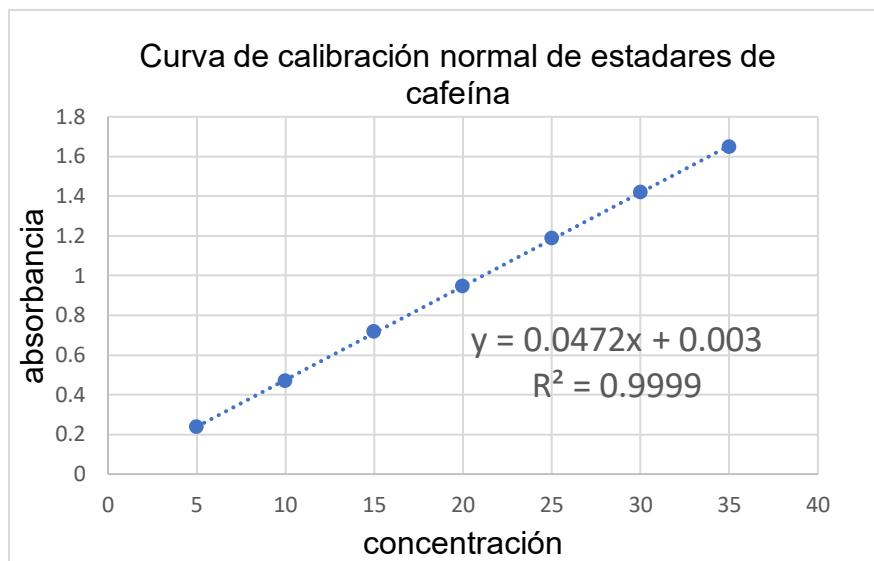
Se realizó el estudio de linealidad para conocer el grado de linealidad del método desarrollado, esto haciendo una de referencia, preparando una serie de estándares de cafeína que van desde 5 a 35 ppm, realizándose la lectura en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Genesis 10S a una longitud de onda de 276 nm.

En la siguiente tabla se muestran tanto las distintas concentraciones de los estándares de cafeína con su respectiva absorbancia, la curva de calibración normal y los resultados obtenidos mediante los parámetros de regresión de la curva de calibración normal.

Tabla 2 Absorbancias leídas de los estándares (5-35 ppm) de cafeína.

Concentración	Absorbancia
0	0
5	0.236
10	0.468
15	0.719
20	0.947
25	1.189
30	1.418
35	1.647

Gráfico 2 Curva de Calibración normal (CCN)



Como se observa en el gráfico 2: Curva de calibración normal se obtuvo una pendiente 0.047 y un intercepto de 0.003 de un coeficiente de determinación (R^2) = 0.9999. El valor de R^2 que recomienda la NIST debe oscilar entre 0.995 y 1 y, por lo cual el valor obtenido de $R^2=0.9999$ se puede afirmar que se cumple con el parámetro de linealidad, es decir que existe una buena relación lineal entre la concentración de los estándares y la absorbancia.

V.3 Precisión

Para evaluar este parámetro se utilizaron como parámetros de desempeño la repetibilidad y precisión intermedia.

V.3.1 Repetibilidad del estándar de 15 ppm de cafeína.

La repetibilidad es evaluada con el fin de corroborar la concordancia entre los resultados obtenidos de distintos analistas, mediante las mismas condiciones de laboratorio y atmosféricas, este procedimiento se implementó a un nivel de concentración de 15 ppm, esto por dos días consecutivos y por quintuplicado. Ha estos datos se les calculó su promedio (\bar{x}), desviación estándar y coeficiente de variación (CV).

Formulas empleadas para determinar la precisión:

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x}_{promedio})^2}{(n - 1)}}$$

Porcentaje de coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{Desviación\ Estándar}{Promedio} \times 100$$

Tabla 3 Repetibilidad del estándar de 15 ppm

Replicas	Día 1	Día 2
1	0.716	0.712
2	0.713	0.715
3	0.713	0.712
4	0.715	0.717
5	0.712	0.716
Promedio (\bar{x})	0.712	0.7144
Desv. Estándar (S)	0.0016	0.0023
% CV	0.23	0.32

Según la guía de validación de métodos analíticos del colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos para determinar repetibilidad por método espectrofotométrico, el %CV no debe ser mayor a 3%, en este ensayo el % CV es de 0.23 % y 0.32% en ambos días, lo que indica una buena precisión y el método cumple con el parámetro.

V.3.2 precisión intermedia del estándar de 15 ppm

La precisión intermedia es determinada preparando 5 soluciones estándares a nivel de concentración de 15 ppm por cada analista, esto a condiciones de laboratorio y atmosféricas iguales. Los resultados de ambos analistas se mezclan entre sí para obtener el coeficiente de variación combinado y así estimar la precisión intermedia.

Tabla 4 Precisión intermedia del estándar de 15 ppm del analista 1 y 2

Replicas	Analista 1	Analista 2
1	0.716	0.712
2	0.713	0.715
3	0.713	0.712
4	0.715	0.717
5	0.712	0.716
Promedio (\bar{X})	0.71320	
Desv. Estándar (S)	0.00197	
% CV	0.28	

El criterio de aceptación para la determinación de la precisión intermedia establece que el % CV no debe ser mayor al 3%, esto según la guía de validación de métodos analíticos del colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A, C, (García, 2002), en este ensayo el % CV es de 0.28 % lo que indica una excelente precisión.

V.3.3 Determinación de la exactitud del estándar de 15 ppm

La exactitud es evaluada mediante la preparación de una serie de 5 estándares a nivel de concentración de 15 ppm, esto realizado por 2 analistas en condiciones tanto de laboratorio como atmosféricas iguales. La exactitud se asocia con el término porcentaje de recuperación o recobro, este indica la presencia de errores sistemáticos en los resultados de análisis, por lo cual en este caso este fue el parámetro de desempeño para la estimación de la exactitud del método.

El porcentaje de recobro es el criterio más empleado para estimar la exactitud de un método, muestra la relación existente entre la cantidad obtenida y la cantidad real definida por el método.

Formulas usadas para evaluar la exactitud

Fórmula para determinar porcentaje de Recuperación (%R)

$$\%R = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración añadida}} \times 100$$

Tabla 5 Evaluación de la exactitud, Analista 1

Analista 1			
concentración añadida	Absorbancias	concentración recuperada	% recuperación
15	0.716	15.12	100.78
15	0.713	15.05	100.36
15	0.713	15.05	100.36
15	0.715	15.1	100.64
15	0.712	15.03	100.22
Promedio			100.47

Tabla 6 Evaluación de la exactitud, Analista 2

Analista 2			
concentración añadida	Absorbancias	concentración recuperada	% recuperación
15	0.712	15.12	100.22
15	0.715	15.05	100.64
15	0.712	15.05	100.22
15	0.717	15.1	100.92
15	0.716	15.03	100.78
Promedio			100.56

La guía de validación de métodos analíticos del colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A,C, (García, 2002), para determinación de la exactitud por método espectrofotométrico el % de recobro debe estar en un rango del 97 a 103%, en este ensayo el % de recobro del analista 1 es 100.47 y la del analista 2 es 100.56, lo que indica una buena exactitud.

V.3.4 Determinación de la exactitud de las muestras analizadas

Tabla 8 Evaluación de la exactitud de las muestras

Muestra	Concentración Teórica de la muestra	Concentración Experimental de la muestra	% Recuperación
RT	5.48	5.49	100.09
RB	5.86	5.89	100.52
MT	6.40	6.40	100.02
FY	5.72	5.74	100.38

Los resultados obtenidos con las muestras, todas tienen un porcentaje de recuperación parecido siendo de las muestras el menor de 100.02 % y el mayor de 100.52 %, los cuales permanecen dentro del rango de 97 a 103 % establecido por la guía de validación de métodos analíticos del colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A,C.

V.3.5 Determinación de la repetibilidad en las muestras

La repetibilidad de la muestra es evaluada con el fin de corroborar el grado de similitud en los resultados obtenidos de cada muestra de bebida energizante en 4 días consecutivos.

Tabla 9 Repetibilidad en las muestras

REPETIBILIDAD				
Días	RT	MT	RB	FY
1	1.293	1.509	1.382	1.349
2	1.294	1.511	1.381	1.351
3	1.292	1.509	1.383	1.35
4	1.293	1.51	1.382	1.349
Promedio	1.293	1.50975	1.382	1.3497
Desv. Estándar (S)	0.00082	0.00096	0.00082	0.00096
% CV	0.063	0.063	0.059	0.071

Los resultados obtenidos del % CV de las muestras por un intervalo de 4 días son menores al máximo del 3% establecido por la guía de validación de métodos analíticos del colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A, C, (García, 2002), por lo cual los resultados presentan una buena precisión.

V.3.4.1 Determinación de valores Outlier (Test de Hubber)

También para evaluar la precisión se necesita descartar la existencia de valores Outlier's o anómalos en los resultados obtenidos en las absorbancias del estándar de cafeína (**ver tabla nº6, anexos**) y de las muestras de bebidas energizantes esto será evaluando mediante la prueba de Hubber.

Formulas empleadas para el test de Hubber

$$LI = \text{Mediana} - 3.5 \times \text{MAD}$$

$$LS = \text{Mediana} + 3.5 \times \text{MAD}$$

Tabla 10 Resultados del Test de Hubber

Hubber				
Días	RT	MT	RB	FY
1	1.293	1.509	1.382	1.349
2	1.294	1.511	1.381	1.351
3	1.292	1.509	1.383	1.35
4	1.293	1.51	1.382	1.349
media	1.293	1.50975	1.382	1.34975
Mediana	1.293	1.5095	1.382	1.3495
MAD	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
LI	1.29125	1.50775	1.38025	1.34775
LS	1.29475	1.51125	1.38375	1.35125

Como se observan en la tabla, los datos de las absorbancias de las muestras se encuentran dentro de los límites de la serie, lo que significa que ni un valor es anómalos es decir que pertenece a la serie de datos, al igual que los estándares de cafeína los valores están dentro de la serie de datos.

V.3.4.2 comparación de varianzas (Test de Cochran)

Este fue empleado con el fin de rectificar si existe homogeneidad en las varianzas de las absorbancias de las concentraciones de cafeína en muestras.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : las varianzas de los resultados de absorbancias de las concentraciones de cafeína en muestras son iguales.

H_a : las varianzas de los resultados de absorbancias de las concentraciones de cafeína en muestras son distintas.

Fórmula empleada:

$$G_c = \frac{S^2 \max}{\sum S_i^2}$$

Su criterio de aceptación es el siguiente:

$G_{\text{cal}} < G_{(0.05;k;n-1)}$, se acepta la H_0 de las concentraciones de cafeína en muestras.

Se calculó el valor de G calculado, siendo este de $G_{\text{cal}} = 0.2895$, el valor de G de tabla fue de $G_{\text{tab}} = 0.684$, dado que el valor de G_{cal} es menor que G_{tab} se acepta la hipótesis nula y se concluye que las varianzas de las absorbancias de las 4 muestras analizadas iguales.

V.3.4.4 Análisis de varianza (Anova de un factor)

Se empleó Anova de un factor con el fin de contrastar si hay diferencias entre las medias, cuando existe una posible variación causada por algún factor. Para ello se usó la herramienta Minitab, se utilizan los datos de la tabla n°11

Tabla 11 Concentraciones de cafeínas de las muestras

RT	MT	RB	FY
27.447	32.043	29.340	28.638
27.468	32.085	29.319	28.681
27.426	32.043	29.362	28.660
27.447	32.064	29.340	28.638

Se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): Todas las medias de las concentraciones de cafeína en muestras son iguales.

Hipótesis alternativa (H_1): No todas las medias de las concentraciones de cafeína en muestras son iguales.

Su criterio de aceptación es el siguiente: $P > \alpha$ se acepta la hipótesis nula de las absorbancias de las concentraciones de cafeína en las muestras.

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Tabla 12 resultados de ANOVA de un factor

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Días	3	0.0019	0.00064	0.00	1.000
Error	12	45.8200	3.81833		
Total	15	45.8219			

Como se aprecia en la tabla de anova de un factor, el valor de P es mayor que el valor α , es decir $P = 1 > \alpha = 0.05$, razón por lo cual se acepta la hipótesis nula, y rechazamos la hipótesis alternativa, es decir que no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de cafeína de las distintas bebidas energizantes estudiadas en los 4 días consecutivos.

V.4 Limites de detección y de cuantificación.

Se determino el límite de detección y cuantificación con el fin de detectar cantidades a nivel traza de analito, para ello es necesario conocer parámetros de regresión lineal como: Intercepto, pendiente y el desvió del intercepto de la curva de calibración.

Tabla 13 Parámetros de regresión Lineal

parámetros de regresión	
Intercepto	0.003
Pendiente	0.047

V.4.1 límite de detección

Para determinar el límite de detección se usó la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times Sb_0}{b_1}$$

Mediante el uso de esta ecuación se obtuvo como resultado un límite de detección de 0.26 ppm, con esta concentración mínima detectable se considera que el método para determinar cafeína es apto en la detección de cantidades a nivel traza.

V.4.2 límite de cuantificación

Este se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 \times Sb_0}{b1}$$

Como resultado se obtuvo un límite de cuantificación de 0.80 ppm, este indica la cantidad mínima cuantificable de cafeína mediante este método, estos límites son esenciales para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos en prácticas usando el método de espectrofotometría UV-vis para cafeína en bebidas energizantes.

V.5 Resultados de concentración de cafeína en las bebidas energéticas.

Para conocer las concentraciones de cafeína en las 4 bebidas energéticas las muestras fueron leídas en celdas de cuarzo en el espectrofotómetro UV-vis Genesis 10 S, donde se obtuvieron las absorbancias de cada muestra y mediante estas se calculó las concentraciones de cafeína.

Parámetros de regresión lineal usados para esta determinación, ver en tabla 11

Tabla 14 Resultados de las absorbancias de las muestras

Muestras	Absorbancias
RT	1.293
RB	1.382
MT	1.509
FY	1.349

Tabla 15 Resultados de mg de cafeína por cada 100 mL de porción

mg de cafeína/100 mL
27.42 mg
29.31 mg
32.01 mg
28.61 mg

Ecuación de la recta empleada para calcular los mg de cafeína obtenidos

$$Y = bx + a$$

Esta se despeja en función de X

$$x = \frac{Y - a}{b}$$

Estos resultados fueron determinados utilizando las absorbancias obtenidas de las muestras menos el intercepto y dividido por la pendiente, quedando:

$$x = \frac{1.293 - 0.003}{0.047} = 27.42 \text{ mg}$$

Tabla 16 Resultados de concentración de cafeína por cada 100 mL de porción de muestra de bebidas energizantes

Muestras	Concentración en ppm
RT	274.23
RB	293.15
MT	320.15
FY	286.13

Formulas empleadas para la determinar la concentración de cafeína en ppm

$$Cm = \frac{Am - a}{b} \times Fd$$

Donde:

Am = Absorbancia de la muestra

a = Intercepto

b = Pendiente

Fd = Factor de dilución (50/5)

Estos resultados fueron determinados utilizando las absorbancias obtenidas de las muestras menos el intercepto y dividido por la pendiente, obtenidos de la CCN y esto multiplicado por el factor de dilución que es el volumen del matraz aforado (50 mL) entre el volumen tomado de la muestra de bebida energizante (5 mL), quedando:

$$CM = \frac{1.293 - 0.003}{0.047} \times \frac{50}{5}$$

$$Cm = 274.23 \text{ ppm}$$

Todos los resultados obtenidos de concentración de las muestras de las bebidas energizantes fueron comparados con los límites permisibles de cafeína establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2411, la cual en el capítulo 4 de requisitos que deben cumplir las bebidas energéticas, en su acápite 4.2 establece los requisitos químicos para las bebidas energéticas, en el cual se encuentra la cafeína.

Estos requisitos se ven reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 17 Requisitos químicos para las bebidas energéticas (INEN, 2016)

Requisito	unidad	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Cafeína	mg/L	250	320	AOAC 962.13
Taurina	mg/L		4000	HPLC
Glucoronolactona	mg/L		2400	HPLC
Carnitina	mg/L		500	HPLC

Acorde a lo establecido por la normativa el límite mínimo de cafeína en bebidas energéticas debe ser 250 ppm y el límite máximo de 320 ppm. Los resultados obtenidos de la práctica demuestran que todas las muestras analizadas cumplen con el requerimiento de cafeína, encontrándose todos dentro de los límites permisibles establecidos.

La muestra que presento menos cafeína fue RT con 274.23 ppm, y la muestra con más cafeína fue M encontrándose en el límite máximo permisible con 320.15 ppm.

Tabla 18 Cantidad de cafeína por porción según la tabla nutricional del envase

Muestras	mg de cafeína por porción	mg de cafeína calculada por porción	Sesgo
RT	90 mg/ 300 mL	82.3 mg	-7.7
RB	32 mg/100 mL	29.3 mg	-2.7
MT	80 mg/240 mL	76.9 mg	-3.1
FY	75 mg/250 mL	71.6 mg	-3.4

Para determinar la cantidad de cafeína por porción se utilizará como referencia las cantidades en mg encontradas de cafeína y el volumen de porción establecido. Como se observa en la muestra RT el envase establece que cada 300 mL de porción tiene 90 mg de cafeína, y la cantidad calculada según los valores de mg de cafeína de la tabla N°13, este se multiplica por el volumen de porción; obteniéndose así los

mg de cafeína obtenidos, que en el caso de RT es de 82.3 mg, lo cual es menos cantidad que la establecida por la tabla nutricional, así también en el caso de las muestras RB, MT y FY están debajo que la cantidad establecida por su tabla nutricional de cada bebida, sin embargo el contenido de cafeína en la bebida RB es la más próxima al valor de la tabla nutricional, esto se ve reflejado en el sesgo, siendo de -2.7.

V.6 Evaluación de la incertidumbre

Para evaluar la incertidumbre de una medición fotométrica, se utilizó una de las muestras analizadas de bebidas energética y se le calculó su concentración utilizando los parámetros de la CCN.

V.6.1 Modelo matemático y fuentes de incertidumbres

Se encuentra un modelo matemático que se utilizará para calcular la concentración siendo:

$$C_m = \left(\frac{A_m - a}{b} \right) * Fd \left(\frac{V_2}{V_1} \right)$$

En donde:

A_m: absorbancia de la muestra

b: pendiente

a: intercepto

V1: volumen de la alícuota de la muestra de 5 mL

V2: volumen de la dilución de la muestra de 50 mL

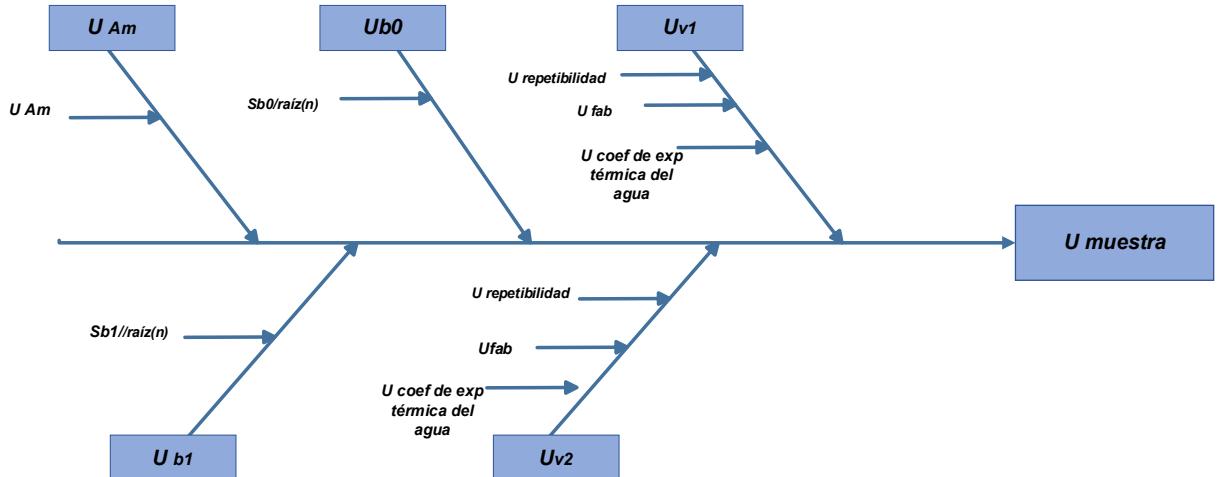
Sustituimos en la ecuación:

$$C_m = \left(\frac{1.293 - 0.003}{0.047} \right) * Fd \left(\frac{50 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \right) = 274.23 \text{ ppm}$$

De modo que a partir de este modelo matemático se identifican las principales fuentes de incertidumbres, para cada componente por medio del diagrama causa-

efecto, donde cada uno de estos componentes posee otras fuentes de incertidumbres presente en el diagrama a continuación.

Ilustración 14 Diagrama Causa-Efecto componentes de las incertidumbres



De este sobresalen 5 componentes principales que influyen en la incertidumbre de la muestra de bebida energizante.

μ_{Am} : incertidumbre de la absorbancia de la muestra

μ_{b0} : incertidumbre del intercepto

μ_{b1} : incertidumbre de la pendiente

μ_{v2} : incertidumbre del balón de 50 mL

μ_{v1} : incertidumbre de la pipeta de 5 mL

V.6.2 Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.

V.6.2.1 Cálculo de la incertidumbre de medición de la absorbancia de la muestra.

Por lo que, dentro de los componentes de esta, se toma en cuenta los cálculos de la absorbancia de la muestra.

- Incertidumbre debido a la absorbancia de la muestra

$$\mu_{Am} = S_{Am}/\sqrt{n} = \frac{0.00082}{4} = 0.00041$$

V.6.2.2. Cálculo de la incertidumbre de la pipeta de 10 ml.

En la pipeta, se presentan tres posibles fuentes de Incertidumbres las cuales son: la incertidumbre del fabricante, la incertidumbre debido a la repetibilidad y la incertidumbre debido a la expansión térmica del solvente. Esta se calcula con la siguiente ecuación:

$$\mu_{pipeta} = \sqrt{\mu_{rep}^2 + \mu_{fab}^2 + \mu_{exp}^2}$$

μ_{rep} : Desviación obtenida en la calibración de la pipeta con el volumen vertido

μ_{fab} : Incertidumbre que se define dentro de los límites de su distribución triangular.

μ_{exp} : Incertidumbre es debida al volumen, variación de temperatura y el factor del coeficiente de expansión térmica del agua

calculamos las 3 fuentes de incertidumbre de la siguiente manera:

$$\mu_{rep} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0.0335}{\sqrt{10}} = 0.01059363$$

$$\mu_{fab} = \frac{a}{\sqrt{6}} = \frac{0.020}{\sqrt{6}} = 0.00816$$

$$\mu_{exp} = \frac{v^* \partial T^* \alpha}{2 * \sqrt{3}} \frac{10 * 7.4 * 2.07 * 10^{-4}}{2 * \sqrt{3}} = 0.013265$$

sumando estos tres componentes no da como resultado:

$$\mu_{pipeta} = \sqrt{(0.01059363)^2 + (0.00816)^2 + (0.013265)^2} = 0.0188$$

V.6.2.3 Cálculo de la incertidumbre del matraz aforado de 50 ml.

Al igual que el anterior calculo, calculamos las incertidumbres para el balón volumétrico de 50 ml, este presenta 3 posibles fuentes de Incertidumbres dentro de estas están: La incertidumbre del fabricante, la incertidumbre debido a la repetibilidad y la incertidumbre debido a la expansión térmica del solvente.

Lo podemos calcular con la siguiente ecuación:

$$\mu_{matraz} = \sqrt{\mu_{rep}^2 + \mu_{fab}^2 + \mu_{exp}^2}$$

Donde:

μ_{rep} : Desviación obtenida en la calibración del matraz con el volumen vertido

μ_{fab} : Incertidumbre que se define dentro de los límites de su distribución triangular.

μ_{exp} : Incertidumbre es debida al volumen, variación de temperatura y el factor del coeficiente de expansión térmica del agua

calculamos sus 3 fuentes de incertidumbres, con las siguientes ecuaciones:

$$\mu_{rep} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0.0335}{\sqrt{10}} = 0.01059363$$

$$\mu_{fab} = \frac{a}{\sqrt{6}} = \frac{0.05}{\sqrt{6}} = 0.0204$$

$$\mu_{exp} = \frac{v^* \partial T^* \alpha}{2 * \sqrt{3}} = \frac{50 * 7.4 * 2.07 * 10^{-4}}{2 * \sqrt{3}} = 0.06632$$

sumando estos tres componentes no da como resultado:

$$\mu_{matraz} = \sqrt{(0.01059363)^2 + (0.0204)^2 + (0.06632)^2} = 0.0719$$

V.6.2.4 Incertidumbre debido al intercepto:

$$\mu_{b0} = \frac{S_{b0}}{\sqrt{n}}$$

$$\mu_{b0} = \frac{0.584}{\sqrt{4}} = 0.292$$

V.6.2.5 Incertidumbre debido a la pendiente:

$$\mu_{b1} = \frac{S_{b1}}{\sqrt{n}}$$

$$\mu_{b1} = \frac{0.026}{\sqrt{4}} = 0.013$$

V.6.2. Cálculos de los coeficientes de sensibilidad para cada uno de los componentes de la incertidumbre.

Estos se obtienen mediante la derivada parcial del modelo matemático a continuación:

$$C_{Am} = \left(\frac{\partial C_m}{\partial Am} \right) = \frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 2.12$$

$$C_{b0}: \left(\frac{\partial C_m}{\partial b_0} \right) = -\frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = -2.12$$

$$C_{V1}: \left(\frac{\partial C_m}{\partial V_1} \right) = \frac{Am - b_0}{b_1 * V_2} = \frac{1.293 - 0.003}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 0.54$$

$$C_{b1} = \left(\frac{\partial C_m}{\partial b_1} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1^2 * V_2} = \frac{(1.293 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{0.047^2 * 50 \text{ mL}} = -58.39$$

$$C_{V2} = \left(\frac{\partial C_m}{\partial V_2} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1 * V_2^2} = \frac{(1.293 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{0.047 * (50 \text{ mL})^2} = -0.054$$

una vez calculado los coeficientes de sensibilidad para cada componente, podemos aplicar la ley de propagación de la incertidumbre a través del cálculo de la incertidumbre combinada

V.6.3 Incertidumbre combinada

$$U_{Cm} = \sqrt{(U_{Am}^2 * C_{Am}^2) + (U_{b0}^2 * C_{b0}^2) + (U_{V1}^2 * C_{V1}^2) + (U_{b1}^2 * C_{b1}^2) + (U_{V2}^2 * C_{V2}^2) + (2 * C_{b0} * C_{b1} * U_{b0} * U_{b1} * R)}$$

μ_{am} : La incertidumbre de absorbancia medida de la muestra (RT).

C_{am} : Coeficiente de sensibilidad de absorbancia medida.

μ_{bo} : La incertidumbre del intercepto.

C_{bo} : Coeficiente de sensibilidad del intercepto.

μ_{v1} : Incertidumbre del volumen de la pipeta.

C_{v1} : Coeficiente de sensibilidad del volumen de la pipeta.

μ_{b1} : La incertidumbre de la pendiente.

C_{b1} : Coeficiente de sensibilidad de la pendiente.

μ_{v2} : La incertidumbre del volumen del matraz

C_{v2} : Coeficiente de sensibilidad del volumen del matraz

Sustituimos en la ecuación:

$$U_{Cm} = \sqrt{(0.00041^2 * 2.12^2) + (0.292^2 * -2.12^2) + (0.0719^2 * 0.54^2) + (0.013^2 * -58.39^2) + (0.0188^2 * -0.054^2) + (2 * -2.12 * -58.39 * 0.292 * 0.013 * 0.9999186)}$$

$$U_{Cm} = 1.3$$

El valor de la incertidumbre expandida a un nivel de confianza de 95.45 de probabilidad; $\mu_{exp}=2 \times 1.37 = 2.7$ por ende, el valor de su concentración con su incertidumbre expandida:

$$C_m \pm \mu_{exp} = 274.23 \pm 2.7$$

Aplicación de la ley de propagación a muestras RB, M y FY

De la misma manera que la anterior, se calculan los coeficientes de sensibilidad y sus incertidumbres combinadas, se aplicó la ley de propagación obteniéndose valores (ver en anexo, tabla 2), los resultados obtenidos se observan en la tabla 18

Tabla 19 Concentraciones e incertidumbres combinadas para las muestras

muestras	concentraciones	Incertidumbres
RT	274.23 ppm	1.37 x 2 = ± 2.7
RB	293.15 ppm	1.43 x 2 = ± 2.8
MT	320.15 ppm	1.50 x 2 = ± 3.2
FY	286.13 ppm	1.41 x 2 = ± 2.8

V.6.4 Contribución de cada uno de los componentes de las muestras.

Se observa el resumen todos los parámetros que intervienen en la evaluación de la Incertidumbre tabla N°18 en esta, se muestran las variables de x_i del modelo matemático de la ecuación, el valor correspondiente de cada una de las incertidumbres (μ) así como, los coeficientes de sensibilidad de cada variable (C_o), la multiplicación al cuadrado de μ y C_o , con su índice de contribución (% Ind.) calculado con la siguiente ecuación:

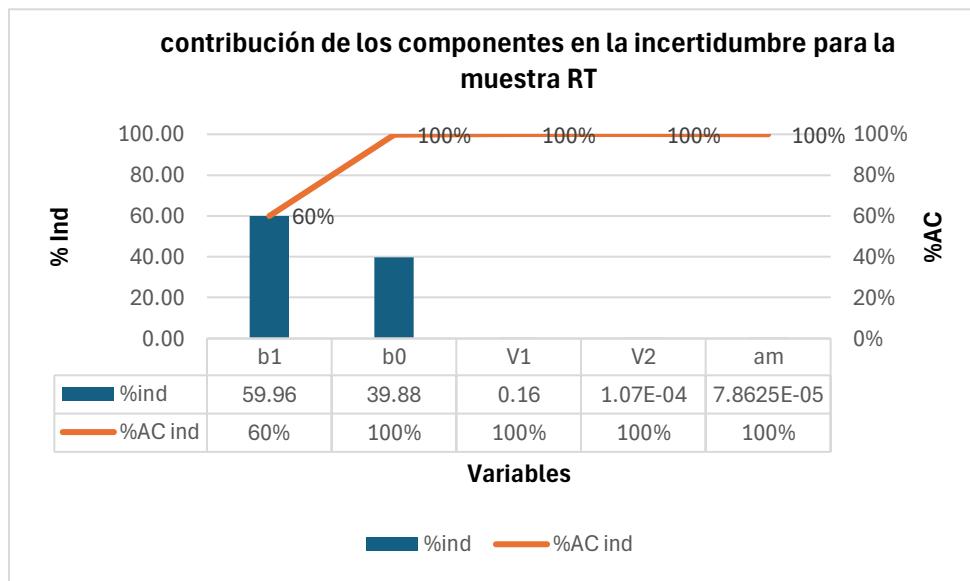
$$Ind\% = \frac{(\mu C_o)^2}{\sum (\mu C_o)^2} (100)$$

Tabla 20 Balance en la incertidumbre de la medición

parámetro	x_i	μ	C_o	$\mu * C_o$	$(\mu * C_o)^2$	% Ind.
b_0	0.003	0.2920	-2.1200	-0.6190	0.3832	39.8801
b_1	0.047	0.0130	-58.3900	-0.7591	0.5762	59.9629
V_1	5	0.0719	0.5400	0.0388	0.0015	0.1569
V_2	50	0.0188	-0.0540	-0.0010	0.0000	0.0001
a_m	1.293	0.0004	2.1200	0.0009	0.0000	0.0001
$\sum (\mu * C_o)^2$					0.961	

En cuanto a las contribuciones de cada componente, se observan que las mayores fueron: la medición del pendiente siendo de (59.96%) y el intercepto (39.88%), los componentes del volumen presentan una contribución de (0.15, y las de menor contribución es la de la absorbancia de la muestra con 0.0001% y la del volumen 2 siendo de 0.0001%, esto también se ve reflejado en el diagrama de Pareto.

Gráfico 5 Diagrama de Pareto para las contribuciones de las incertidumbres en la concentración de la muestra RT



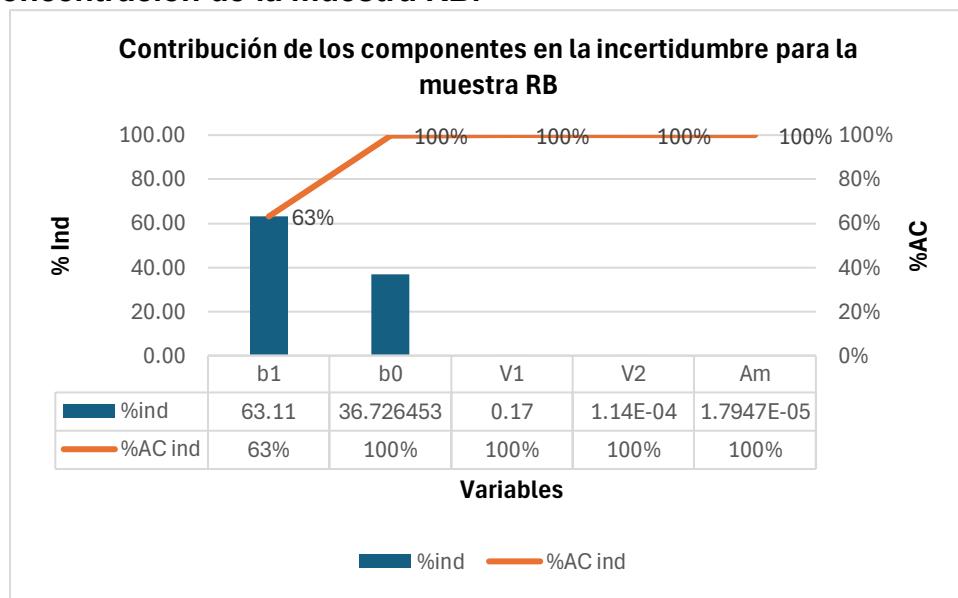
Donde se observa nuevamente que las variables que contribuyen a un 100% en caso de (b_0 , V_1 , V_2 y A_m) del total en la evaluación de la incertidumbre.

Tabla 21 Balance de la incertidumbre en la muestra RB

Muestra RB						
parámetro	x_i	M	C_o	$\mu^* C_o$	$(\mu^* C_o)^2$	% Ind.
b_0	0.003	0.292	-2.12	-0.61904	0.38321052	36.7264525
b_1	0.047	0.013	-62.42	-8.11E-01	0.65846733	63.1067464
V_1	5	0.0719	0.58	0.041702	0.00173906	0.16666919
V_2	50	0.0188	-0.058	-0.0010904	1.189E-06	0.00011395
a_m	1.382	0.00020412	2.12	0.00043274	1.8727E-07	1.7947E-05
$\sum (\mu^* C_o)^2$					1.04341829	

Se observa que en esta se presenta las mayores contribuciones en la pendiente e intercepto siendo de: (36.72 y 63.10%), seguido de las contribuciones del volumen 1 y volumen 2 presentando un (0.16 y 0.0001 %) las de menor contribución fue la de la absorbancia de la muestra presentando valores de 1.74×10^{-5} , esto también se refleja en el diagrama a continuación.

Gráfico 6 Diagrama de Pareto para las contribuciones de las incertidumbres en la concentración de la muestra RB.



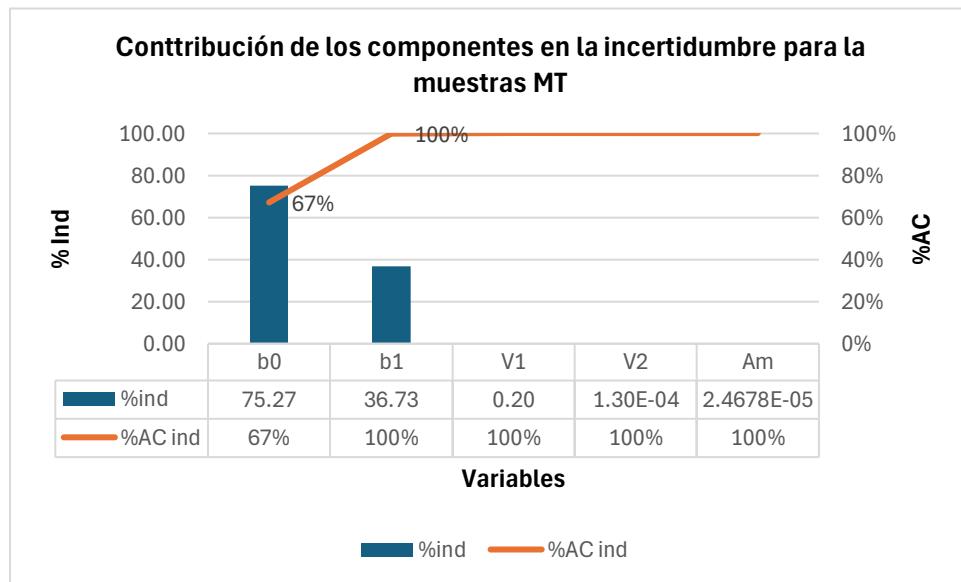
También se observa nuevamente que las variables que contribuyen a un 100% en caso de (b0, V1, V 2 y Am) del total en la evaluación de la incertidumbre

Tabla 22 Balance de la incertidumbre en la muestra MT

Muestra MT						
parámetro	x_i	M	C_o	$\mu^* C_o$	$(\mu^* C_o)^2$	% Ind.
b_0	0.003	0.292	-2.12	-0.61904	0.38321052	36.72645253
b_1	0.047	0.013	-68.17	-0.89	0.78536816	75.26877518
V_1	5	0.0719	0.64	0.046016	0.00211747	0.202936088
V_2	50	0.0188	-0.062	-0.0011656	1.3586E-06	0.000130209
a_m	1.293	0.00023936	2.12	0.00050744	2.5749E-07	2.46777E-05
$\sum (\mu^* C_o)^2$					1.17069777	

Se puede observar que las mayores contribuciones fueron: la incertidumbre de la pendiente (75.26%), seguido de la contribución del intercepto (36.72%), las incertidumbres de menor contribuciones fueron: volumen 1 (0.20 %), volumen 2 (0.00013%) y la incertidumbre la absorbancia de la muestra (2.46×10^{-5}), este se refleja en el diagrama siguiente:

Gráfico 7 Diagrama de Pareto para las contribuciones de las incertidumbres en la concentración de la muestra MT.



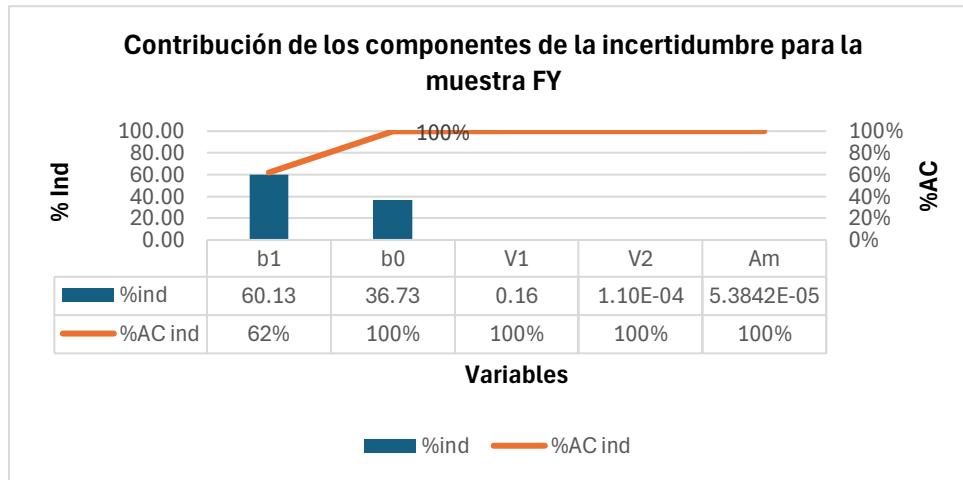
Se aprecia que las variables que contribuyen a un 100% en caso de (b_0 , V_1 , V_2 y A_m) del total en la evaluación de la incertidumbre

Tabla 23 Balance en la incertidumbre en la muestra FY

Muestra FY						
Parámetro	x_i	M	C_o	$\mu^* C_o$	$(\mu^* C_o)^2$	% Ind.
b_0	0.003	0.292	-2.12	-0.61904	0.38321052	36.7264525
b_1	0.047	0.013	-60.93	-7.92E-01	0.62740657	60.1299188
V_1	5	0.0719	0.57	0.040983	0.00167961	0.16097152
V_2	50	0.0188	-0.057	-0.0010716	1.1483E-06	0.00011005
a_m	1.293	0.00035355	2.12	0.00074953	5.618E-07	5.3842E-05
$\sum (\mu^* C_o)^2$					1.01229841	

La mayor contribución proporcionada para el caso de la muestra FY, fue la medición de la pendiente siendo de 60.12 % seguido de la medición del intercepto siendo un 36.72%, el volumen 1, volumen 2 y absorbancia de las muestras presentan contribuciones menores siendo de 0.16%, 0.00011% y 5.38×10^{-5} , este reflejado en el grafico de Pareto

Gráfico 8 Diagrama de Pareto para las contribuciones de las incertidumbres en la concentración de la muestra FY.



Las variables que contribuyen a un 100% en caso de (b0, V1, V 2 y Am) del total en la evaluación de la incertidumbre.

VI. Conclusiones

Una vez dado por finalizados las actividades investigativas, experimentales, así también como la expresión de los análisis de los resultados se puede concluir que:

- Se seleccionaron cuatro distintas muestras de bebidas energéticas, adquiridas de supermercados de la ciudad de León-Nicaragua, estas fueron seleccionadas acorde a criterios como: popularidad, precio y disponibilidad, las elegidas fueron, RB, MT, RT y FY, estas fueron codificadas con el propósito de evitar conflictos legales con las empresas donde estas fueron elaboradas.
- Se evaluaron parámetros del desempeño del método como:
 - La linealidad, esta se ha comprobó un coeficiente de determinación de $(R^2) = 0.9999$, este valor debe oscilar dentro del rango establecido por la NIST (0.998 y 1), esto en un rango de concentración de 5-35 ppm, lo cual indica una buena relación lineal entre la concentración y la absorbancia.
 - Se determinó el límite de detección (L.D), el cual fue de 0.2668 ppm, con esta concentración mínima detectable se considera que el método para determinar cafeína es apto en la detección de cantidades traza, así como también se determinó el límite de cuantificación (LC), siendo de 0.8085 ppm, lo cual indica la concentración mínima cuantificable de cafeína y el método es adecuado para la determinación de cafeína.
 - Al evaluar la precisión esta fue expresada en repetibilidad de un estándar de 15 ppm, la precisión intermedia del mismo estándar, y la repetibilidad de las muestras. Para estas evaluaciones su criterio de aceptación es que el % CV no debe ser mayor del 3%, siendo como resultado de estas menores que el límite máximo permisible, indicando que existe una buena precisión y el método cumple con el parámetro.

- se estimó la exactitud de un estándar de cafeína de 15 ppm, siendo su criterio de aceptación que su % de recobro debe estar en un rango del 97 a 103%, teniendo como resultado un % de recobro del analista 1 es 100.47% y la del analista 2 es 100.556%, indicando así que ambos analistas cuentan con buena exactitud.
- Se determinaron las concentraciones de cafeína en las muestras de bebidas energizantes, usando para su extracción como solvente el cloroformo (CHCl_3) y siendo leídas las muestras mediante espectrofotometría UV-vis a una longitud de onda de 275 nm, la incertidumbre de la medición aplicada a las cuatro muestras analizadas, los resultados de las concentraciones de las muestras con sus incertidumbres fueron de: ± 2.7 para RT, ± 2.8 para la muestra RB, ± 3.0 para MT y ± 2.8 para FY.
- Según los límites permisibles de cafeína establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2411 establece que las bebidas energéticas deben oscilar un rango de cafeína de entre 250-320 ppm, esto comparado con los valores de concentración obtenidos, la muestra RT es la que posee menor concentración de cafeína con 274.23 ppm, siguiendo la muestra FY con 286.13 ppm, RB con 293.15 ppm y la muestra con mayor concentración de cafeína fue MT con 320.15 ppm.

VII. Recomendaciones

Ya finalizada esta investigación monográfica tomando en consideración los resultados obtenidos son convenientes las siguientes recomendaciones:

- Analizar otros analitos presentes en las bebidas energéticas como la Taurina.
- Garantizar el uso de materiales de referencia certificados, también el uso de instrumentos calibrados que aseguren Trazabilidad.
- Realizar una validación para este tema específico.
- Aplicar este método a otras bebidas energéticas comercializadas.
- Usar un rotaevaporador con el fin de recuperar el cloroformo usado en las preparaciones de soluciones y muestras.

VIII. Bibliografía

- ❖ Agilent. (23 de Julio de 2021). Agilent. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-uv-vis-basics-5980-1397en-agilent.pdf>
- ❖ AMEZQUITA-CAZAREZ, K. B.-A.-D. (30 de septiembre de 2018). *ECOFRAN*. https://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Aplicacion_Cientifica_y_Tecnica/vol4num13/Revista_de_Aplicaci%C3%B3n_Cient%C3%ADfica_y_T%C3%ACcnica_V4_N13_4.pdf
- ❖ AOAC. (2024). AOAC. http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=378
- ❖ Arujo, N. (Agosto de 2023). *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Proceso-de-extraccion-liquido-liquido-en-un-embudo-de-decantacion-Solvente-A_fig4_373773521
- ❖ Avendaño, K. E. (2015). *UNAN-León*. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/4007>
- ❖ Bonin, C. (26 de Junio de 2020). *Coffe Altection*. http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=378
- ❖ Canuto, J. (s.f.). *Academia*. https://www.academia.edu/37240501/FUNDAMENTOS_DE_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA
- ❖ Chad J. Reissig, E. C. (01 de Enero de 2009). *Science Direct*. <https://www.sciencedirect.com/journal/drug-and-alcohol-dependence/vol/99/issue/1>

- ❖ Cosimo, A. D. (13 de Septiembre de 2015). *Researchgate*. https://www.researchgate.net/publication/321017142_UVVIS_Spectrophotometry_-_Fundamentals_and_Applications
- ❖ Díaz, M. (2018). *UCO*. <https://www.ucm.es/dptos/bioquimica-biol%20mol/pdfs/08%20ESPECTROFOTOMETRIA.pdf>
- ❖ Douglas A. Skoog, D. (s.f.). *Fundamentos de química analítica*. Cengage Learning. <https://doi.org/10.1021/ed061p51>
- ❖ Douglas A. Skoog, D. M. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. Cengage Learning. <https://doi.org/10.1021/ac00245a003>
- ❖ Douglas A. Skoog, F. J. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning.
- ❖ Efsa. (6 de Marzo de 2013). *An official website of the European Union*. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130306>
- ❖ Efsa. (06 de Marzo de 2013). *Unión Europea*. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/caffeine>
- ❖ Efsa. (06 de Marzo de 2016). *Unión Europea*. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/caffeine>
- ❖ FDA. (13 de Abril de 2018). *FDA*. <https://www.fda.gov/news-events/comunicados-de-prensa/la-fda-toma-medidas-para-proteger-los-consumidores-de-los-suplementos-alimenticios-que-contienen>
- ❖ García, M. A. (2002). *Studocu*. <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-nacional-autonoma-de-mexico/tecnologia-farmaceutica-i/guia-para-validacion-de-metodos-analiticos-cnqfb-2002-compress/54308576>
- ❖ Geraciotti, D. J. (10 de Diciembre de 2013). *Cleveland Clinic*. <https://www.ccjm.org/content/83/12/895>

- ❖ Gonzales, M. J. (15 de Junio de 2023). *Metro Worlds News*. <https://www.metroworldnews.com/estilo-vida/2023/06/16/que-es-la-taurina-beneficios-y-efectos-secundarios-del-suplemento-de-bebida-energetica/>
- ❖ GUERRERO, G. A. (2021). *Repository Javeriana*. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/58027/TRABAJO%20FINAL%20TG%20Gabriela%20Araez%20Guerrero%20%281%29.pdf?sequence=1>
- ❖ Harris, D. C. (2007,..2016). *Analisi Químico Cuantitativo*. Reverté S.A.
- ❖ INEN. (25 de Noviembre de 2016). *StudyLib*. <https://studylib.es/doc/8154430/nte-inen-2411---servicio-ecuatoriano-de-normalizaci%C3%B3n#:~:text=REQUISITOS%201.%20NTE%20INEN%202411:2015%20Primera%20revisi´n%20OBJETO%20Esta%20norma>
- ❖ Interchim. (24 de Abril de 2016). *Interchim*. https://blog_fr.interchim.com/extraction-liquide-liquide-preparation-echantillon/
- ❖ Interempresa. (02 de Enero de 2023). *Interempresa*. <https://biblio.upmx.mx/estudios/Documentos/adiccioncafeina021.asp>
- ❖ J, M. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson.
- ❖ Labster. (08 de Enero de 2023). *Labster Theory pages*. Labster. <https://theory.labster.com/es/cafffeines-chemical-structure/>
- ❖ LibreTexs. (18 de Julio de 2014). *LibreTexs Chemistry*. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Basics_of_General_Organic_and_Biological_Chemistry_\(Ball_et_al.\)/16%3A_Carbohydrates/16.01%3A_Carbohydrates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Basics_of_General_Organic_and_Biological_Chemistry_(Ball_et_al.)/16%3A_Carbohydrates/16.01%3A_Carbohydrates)
- ❖ LibreTexs Chemistry. (18 de Julio de 2014). [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Basics_of_General_Organic_and_Biological_Chemistry_\(Ball_et_al.\)/16%3A_Carbohydrates/16.01%3A_Carbohydrates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Basics_of_General_Organic_and_Biological_Chemistry_(Ball_et_al.)/16%3A_Carbohydrates/16.01%3A_Carbohydrates)

- ❖ Fanny Osorio, I. E. (Noviembre de 2009). *UNAN-León*.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/retrieve/2738>

- ❖ Medlineplus. (09 de Octubre de 2023). *NIH*.
<https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/935.html>

- ❖ Menéndez, M. G. (30 de Agosto de 2011). *Scielo*.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v59n3/v59n3a08.pdf>

- ❖ Miguel Cote-Menéndez, C. X.-G.-T.-L. (30 de Agosto de 2011). *Scielo*.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v59n3/v59n3a08.pdf>

- ❖ Miller, J. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson.

- ❖ Moreno, M. (2018). *Studocu*. <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-politecnico-nacional/quimica-industrial/espectrofometria-2019-version-final/8384743>

- ❖ Nieves Abril Díaz, J. A.-V. (23 de Julio de 2015). *UCO*.
https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biologia/pdf/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf

- ❖ Olsen, E. (1985). *SEMANTIC SCHOLAR*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/M%C3%A9todos-%C3%B3pticos-de-an%C3%A1lisis-Olsen/12b72e6252c8ce2c7b929b8255b674042e7512e2>

- ❖ Olvera, C. G. (2012). *UNAM*.
https://fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_5.pdf

- ❖ Oscar Mauricio Aguilar Mejía, C. F.-P.-M.-P. (2008). *Dialnet*.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4905157>

- ❖ otros, M. D. (2018). *UCO*. https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biologia/pdf/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf

- ❖ Pérez Aldas, L. V. (Marzo de 2022). *UTA*.
<https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/34983>

- ❖ s/uploads/attachment/file/100355/RC460_Bebidas_con_Cafeina_Taurina.pdf
- ❖ Quezada Romero, K. E. (2015). *UNAN-León*. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/4007>
- ❖ Raviña, M. P. (2004). *Dialnet*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5325213>
- ❖ Rivera, J. (20 de Junio de 2018). *IPSUSS*. <https://ipsuss.cl/columnas-de-opinion/josefa-rivera/no-confunda-las-bebidas-energeticas-con-las-isotonicas>
- ❖ Roussos A., F. A. (s.f.). *PKP*. https://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_10/num_2/RSAN_10_2_124.pdf
- ❖ Turney, S. (22 de Abril de 2022). *Scribbr*. <https://www.scribbr.com/statistics/coefficient-of-determination/>
- ❖ Wesling Argeñal, A. E. (2015). *UNAN-León*. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3957/1/228566.pdf>

IX. Anexos

Ilustración 1 Método AOAC 962.13 cafeína en bebidas alcohólicas

29.1.17

AOAC Official Method 962.13 Caffeine in Nonalcoholic Beverages First Action 1962

Method II

A. Reagents

- (a) *Reducing solution*.—Dissolve 5 g Na_2SO_3 and 5 g KSCN in H_2O and dilute to 100 mL.
- (b) *Dilute phosphoric acid solution*.—Dilute 15 mL H_3PO_4 to 85 mL with H_2O .
- (c) *Sodium hydroxide solution*.—Dissolve 25 g NaOH in 75 mL H_2O .
- (d) *Caffeine standard solution*.—1 mg/mL. Dissolve 100 mg in CHCl_3 and dilute to 100 mL with CHCl_3 .

B. Preparation of Standard Curve

Prepare diluted standard solutions containing 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, and 2.00 mg caffeine/100 mL CHCl_3 . Determine *A* of all solutions at ca 276 nm against CHCl_3 in 1 cm matched cells. Plot *A* against concentration or use linear regression analysis of data points.

C. Determination

Remove any gas by agitation or ultrasonic treatment. Pipet 10 mL test portion into 125 mL separator, add 5 mL 1.5% KMnO_4 solution (w/v), and mix. After exactly 5 min, add 10 mL reducing solution and mix. Add 1 mL dilute H_3PO_4 solution, mix, add 1 mL NaOH solution, mix, and extract with 50 mL CHCl_3 1 min. After separation, drain lower layer through 7 cm paper into 100 mL glass-stoppered volumetric flask. Add 2–3 mL CHCl_3 to separator and drain through paper to rinse separator stem. Wash paper with 2–3 mL CHCl_3 . Re-extract solution with 40 mL CHCl_3 and wash stem and paper as before. Dilute to volume with CHCl_3 . Determine *A* of this solution at wavelength of maximum *A* against CHCl_3 . Determine concentration of caffeine from standard curve or by linear regression and calculate mg/100 mL beverage.

References: *JAOAC* 41, 617(1958); 45, 252(1962).

Tabla 1 Comparación de varianzas (Test de Cochran)

$$\alpha = 0.05$$

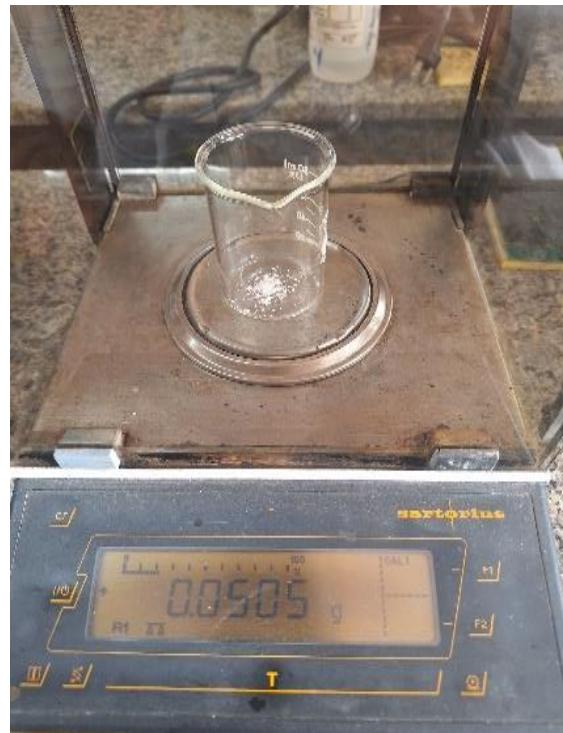
n

<i>k</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.336	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

Equipos

Espectrofotómetro UV-vis Genesys 10S Doble fotodiodos de silicio Lampara flash de xénon Rango de longitud de onda: 190-1.100 nm Velocidad de rotación: 11.000 nm/min Velocidad de barrido: 10-4.200 nm/min Exactitud: $\pm 1,0$ nm Repetibilidad: 0,5 nm	
Agitador ultrasónico Branson 2510R-MTH Temporizador: analógico Calentador: Sí Frecuencia: 40 Hz Rango de temperatura: ambiente-69°C Capacidad: $\frac{3}{4}$ galones (2,8 L) Alimentación: 117 V	
Balanza Analítica Sartorius AC210S Modelo: GMBH (AC210S) Linealidad: 0.2 mg Repetibilidad: $\pm 0,1$ mg Desviación sensible: más de 3 ppm/°C Capacidad: 210 g Frecuencia: 50 Hz Voltaje: 240 V	

Ilustración 2 Pesaje de est\'andar de cafe\'ina



Ilustraci\'on 3 Soluciones est\'andar de cafe\'ina de 1000 y 100 ppm



Ilustración 4 soluciones patrones de 5-35 ppm



Ilustración 5 Desgasificación de la muestra

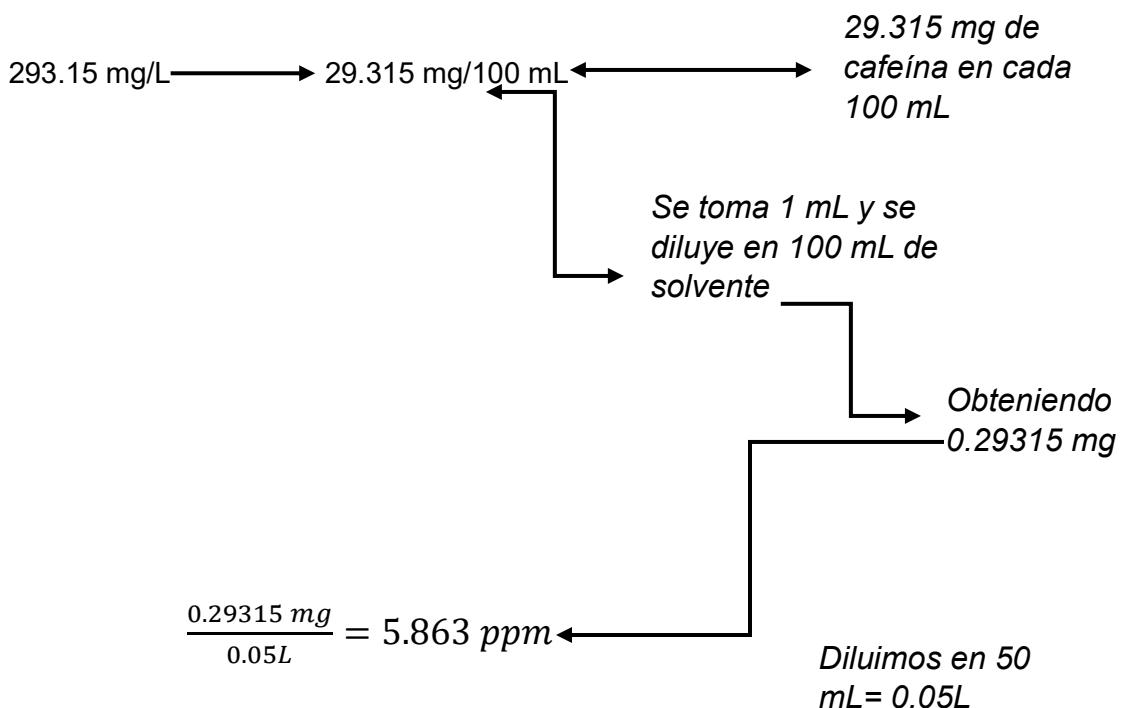


Ilustración 6 Extracción líquido-líquido de cafeína de la muestra



Cálculo de la exactitud en las muestras-Muestra RB

Paso 1. Calculamos la concentración teórica



Paso 2. Calculamos la concentración experimental

Usando la siguiente ecuación:

$$Y = bx + a$$

Despejando la ecuación

$$X = \frac{Y - a}{b}$$

$$X = \frac{0.374 - 0.003}{0.047} = 7.89 - 2 \text{ ppm} = 5.89 \text{ ppm}$$

Dilución del estándar de 0.1 mg en 100 mL = 2 ppm

Paso 3. Calculamos el % de recobro

Usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{concentración Teórica}} \times 100$$

$$\% \text{ recobro} = \frac{5.89 \text{ ppm}}{5.863 \text{ ppm}} \times 100 = 100.46\%$$

Este cálculo se realiza igual para las 3 muestras restantes.

Cálculos de los coeficientes de sensibilidad de las muestras RB, M y FY

- Cálculos de los coeficientes de sensibilidad para cada uno de los componentes de la incertidumbre para la muestra **RB**

$$\begin{aligned}
 C_{Am} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{Am}} \right) = \frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 2.12 \\
 C_{b0} &: \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{b0}} \right) = -\frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = -2.12 \\
 C_{V1} &: \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{V1}} \right) = \frac{Am - b_0}{b_1 * V_2} = \frac{1.382 - 0.003}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 0.58 \\
 C_{b1} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{b1}} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1^2 * V_2} = \frac{(1.382 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{(0.047)^2 * 50 \text{ mL}} = -62.42 \\
 C_{V2} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{V2}} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1 * V_2^2} = \frac{(1.382 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{0.047 * (50 \text{ mL})^2} = -0.058
 \end{aligned}$$

Muestra M

$$\begin{aligned}
 C_{Am} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{Am}} \right) = \frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 2.12 \\
 C_{b0} &: \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{b0}} \right) = -\frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = -2.12 \\
 C_{V1} &: \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{V1}} \right) = \frac{Am - b_0}{b_1 * V_2} = \frac{1.509 - 0.003}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 0.64 \\
 C_{b1} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{b1}} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1^2 * V_2} = \frac{(1.509 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{(0.047)^2 * 50 \text{ mL}} = -68.17 \\
 C_{V2} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{V2}} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1 * V_2^2} = \frac{(1.509 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{0.047 * (50 \text{ mL})^2} = -0.062
 \end{aligned}$$

Muestra FY

$$\begin{aligned}
 C_{Am} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{Am}} \right) = \frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 2.12 \\
 C_{b0} &: \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{b0}} \right) = -\frac{V_1}{b_1 * V_2} = \frac{5 \text{ mL}}{0.047 * 50 \text{ mL}} = -2.12 \\
 C_{V1} &: \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{V1}} \right) = \frac{Am - b_0}{b_1 * V_2} = \frac{1.349 - 0.003}{0.047 * 50 \text{ mL}} = 0.57 \\
 C_{b1} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{b1}} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1^2 * V_2} = \frac{(1.349 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{(0.047)^2 * 50 \text{ mL}} = -60.93 \\
 C_{V2} &= \left(\frac{\partial_{cm}}{\partial_{V2}} \right) = -\frac{(Am - b_0) * V_1}{b_1 * V_2^2} = \frac{(1.349 - 0.003) * 5 \text{ mL}}{0.047 * (50 \text{ mL})^2} = -0.057
 \end{aligned}$$

Tabla 2 Incertidumbres combinadas de las muestras RB, M y FY

muestra RB		muestra M		muestra FY	
u am	0.0002	u am	0.00023936	u am	0.00035355
uv1	0.0188	uv1	0.0188	uv1	0.0188
uv2	0.0719	uv2	0.0719	uv2	0.0719
ub1	0.013	ub1	0.013	ub1	0.013
Ubo	0.292	ubo	0.292	ubo	0.292
Cam	2.12	cam	2.12	cam	2.12
cb0	-2.12	cb0	-2.12	cb0	-2.12
cv1	0.58	cv1	0.64	cv1	0.57
cb1	-62.42	cb1	-68.17	cb1	-60.93
cv2	-0.058	cv2	-0.062	cv2	-0.057
R	0.9999186	r	0.9999186	r	0.9999186
Ucm	2.8	Ucm	3.2	Ucm	2.8

Tabla 3 Regresión Lineal usando Excel

X	Y	Y'	Er	$(yi - \bar{Y})^2$	$(xi - \bar{X})^2$	$(xi)^2$
5	0.236	0.23882143	-0.00282143	0.50050572	225	25
10	0.468	0.47464286	-0.00664286	0.22244698	100	100
15	0.719	0.71046429	0.008535714	0.05561175	25	225
20	0.947	0.94628571	0.000714286	0	0	400
25	1.189	0.003	1.186	0.88978794	25	625
30	1.418	1.41792857	7.14286E-05	0.22244698	100	900
35	1.647	1.65375	-0.00675	0.50050572	225	1225
20	0.946286			2.39130509	$\sum = 700$	3500
A	0.003					
B	0.047164					

Desviación residual:

$$S_{x/y} = \frac{\sqrt{\sum (yi - \hat{Y})^2}}{n - 2}$$

Sustituimos la ecuación:

$$S_{x/y} = \frac{\sqrt{2.39130509}}{7 - 2} = 0.6915$$

Desvío del intercepto

$$S_{b0} = \frac{\sqrt{\sum (xi)^2}}{n \sum (xi - \bar{X})^2}$$

$$S_{b0} = 0.6915 \frac{\sqrt{3500}}{7(700)} = 0.584$$

Desvío de la pendiente

$$S_{b1} = \frac{Sx/y}{\sqrt{\sum (xi - X)^2}}$$

$$S_{b1} = \frac{0.6915}{\sqrt{700}} = 0.026$$

Tabla 4 Resultados de calibración del matraz de 50 mL

peso del instrumento vacío (g)	Volumen vertido
38.98	49.96068352
38.98	49.89034467
38.98	49.89034467
38.98	49.89225386
38.98	49.87024785
38.98	49.88240642
38.98	49.86060138
38.98	49.86984591
38.98	49.86522365
38.98	49.8591946
Media	49.87632714
Desvt.Est	0.029695156

Tabla 5 Resultados de calibración de la pipeta de 10 mL

peso del instrumento vacío (g)	Volumen vertido
102.6	9.897681671
112.45	9.817294408
122.22	9.877584855
132.04	9.837391224
141.81	9.867536447
151.63	9.827342816
161.42	9.827342816
171.19	9.827342816
180.98	9.787149185
190.73	9.810260523
Media	9.827342816
Desv.Est	0.03354172

Tabla 6 cálculos de test de Huber para la determinación de valores Outlier de los estándares de cafeína

Concentración	Absorbancia
0	0
5	0.236
10	0.468
15	0.719
20	0.947
25	1.189
30	1.418
35	1.647
mediana	0.947
MAD	0.475
LI	-0.7155
LS	2.6095

Tabla 7 cálculos de test de cochran usando Excel

Días	RT	MT	RB	FY
1	1.293	1.509	1.382	1.349
2	1.294	1.511	1.381	1.351
3	1.292	1.509	1.383	1.35
4	1.293	1.51	1.382	1.349
Promedio	1.293	1.50975	1.382	1.34975
Desves	0.000816497	0.00095743	0.0008165	0.00095743
varianza (S ²)	6.66667E-07	9.16667E-07	6.66667E-07	9.16667E-07
Gcal	0.2895			
Gtab	0.684			

Ilustración 7 Gráficos de Residuos

