Università
degli Studi
della Campania
*Luigi Vanvitelli*

Dipartimento di
Scienze e Tecnologie
Ambientali Biologiche e
Farmaceutiche

## CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN FARMACIA

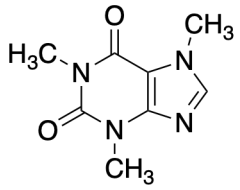
CHIMICA ORGANICA - LABORATORIO
Esercitazione n° 3

# Estrazione e ricristallizzazione della caffeina da caffè, tè e bevande energetiche

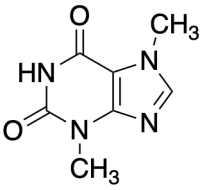
**Scopo dell'esperienza:** estrarre la caffeina da matrici di caffè e tè e da bevande commerciali che la contengono, separarla dalle principali sostanze interferenti e purificarla mediante ricristallizzazione. Le bevande energetiche possono dare rese basse o variabili: verificare sempre il contenuto di caffeina in etichetta.

### Teoria

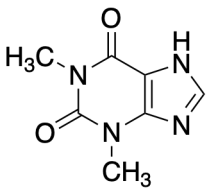
La caffeina è un alcaloide purinico appartenente alle metilxantine. È presente naturalmente nel caffè e nel tè; può essere aggiunta anche a bevande energetiche e ad altri prodotti. Il contenuto varia con la materia prima, il metodo di preparazione e la formulazione commerciale. Per le bevande confezionate occorre controllare l'etichetta e scegliere un campione dichiarato contenere caffeina.



caffeina
(1,3,7-trimetilxantina)



teobromina
(3,7-dimetilxantina)

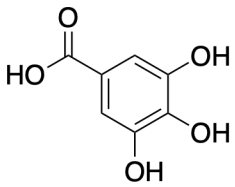


teofillina
(1,3-dimetilxantina)

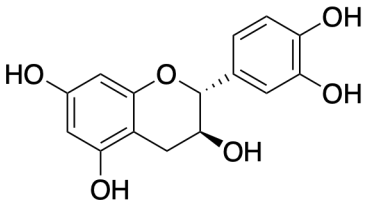
La caffeina è sufficientemente solubile in acqua calda da passare nell'infuso e, a temperatura ambiente, può distribuirsi anche in un solvente organico come l'acetato di etile. In condizioni debolmente basiche (circa pH 9–10) la caffeina resta prevalentemente neutra. La separazione liquido-liquido consente quindi di trasferirne una parte nella fase organica, senza garantire il recupero quantitativo.

In questa esercitazione si prepara un estratto acquoso da caffè macinato o foglie di tè, oppure si parte da una bevanda già pronta e degasata. Le estrazioni successive con porzioni fresche di acetato di etile, l'aggiunta di cloruro di sodio e l'essiccamento della fase organica favoriscono il recupero della caffeina. Dopo l'allontanamento del solvente, il prodotto grezzo si purifica per ricristallizzazione da etanolo. La verifica può essere eseguita misurando il punto di fusione; la TLC richiede un eluente verificato con uno standard di caffeina.

La difficoltà principale consiste nel separare la caffeina dai componenti della matrice. Negli infusi di caffè e tè sono presenti, tra gli altri, acidi fenolici, tannini, pigmenti e prodotti di ossidazione. Le bevande pronte possono inoltre contenere zuccheri, coloranti, aromi, taurina, vitamine e acidificanti; una parte di questi composti può accompagnare la caffeina durante l'estrazione.

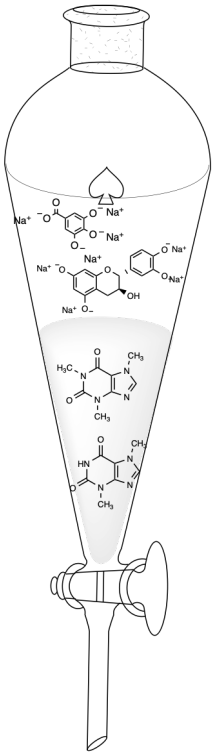



acido gallico




catechina

Molti composti fenolici sono acidi deboli; alcuni componenti, come l'acido gallico, possiedono anche un gruppo carbossilico. In ambiente basico possono formare sali più solubili nella fase acquosa.
Il carbonato di sodio può sostituire l'idrossido di sodio per rendere basica la fase acquosa. È una base meno forte: aggiungerlo gradualmente, controllando con cartina indicatrice fino a pH circa 9–10. A questo pH gli acidi carbossilici sono convertiti nei sali; una parte dei gruppi fenolici può ionizzarsi. Ciò favorisce la permanenza di molte sostanze acide nella fase acquosa, ma non assicura la rimozione completa di tutti i polifenoli.
La caffeina non presenta gruppi acidi che vengano convertiti in sali nelle condizioni adottate e rimane prevalentemente neutra. Può perciò distribuirsi nell'acetato di etile, mentre sali inorganici e molti composti polari restano nella fase acquosa.
L'acetato di etile è parzialmente solubile in acqua e, rispetto al diclorometano, trasferisce la caffeina con minore efficienza nelle condizioni studiate. Per migliorare il recupero si effettuano più estrazioni con porzioni fresche di solvente, anziché una sola estrazione con lo stesso volume totale. L'aggiunta di NaCl (salting-out) riduce la solubilità reciproca delle fasi e può agevolare la separazione; non sostituisce le estrazioni successive né l'essiccamento. L'acetato di etile ha densità inferiore a quella della soluzione acquosa salina e costituisce normalmente lo strato superiore.



| **Materiale occorrente** | |
|---|---|
| Imbuto separatore da 250 ml | Asta di sostegno |
| Imbuto separatore da 500 ml (per campioni da 200 ml) | Pinza e morsetto |
| Beuta da 100 ml | Imbuto e carta da filtro |
| Becher da 250–500 ml | Mortaio e pestello |
| Piastra riscaldante o bagno d'acqua | Garza o carta da filtro |

| | |
|---|---|
| Cilindro graduato da 100 ml | Etanolo 95% |
| Anello di Guko | Acetato di etile |
| Pallone da 100 ml con collo smeriglio | Carbonato di sodio |
| Imbuto filtrante di Büchner | Solfato di sodio anidro |
| Beuta codata da 500 ml | Cloruro di sodio |
| Vetrino da orologio | Cartine pH e rotavaporio, se disponibile |

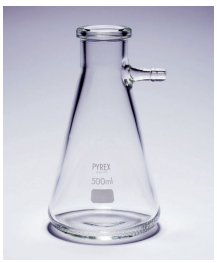
**ESECUZIONE**

- Preparazione da caffè o tè: pesare circa 5 g di caffè macinato o foglie di tè, aggiungere 100 ml di acqua calda e mantenere l'infusione prossima all'ebollizione per circa 10 minuti. Filtrare per rimuovere il materiale vegetale e lasciare raffreddare il filtrato.
- Preparazione da bevanda pronta: scegliere una bevanda che dichiari caffeina in etichetta, senza latte o panna. Prelevare circa 200 ml e mescolare in un becher fino a eliminare la maggior parte della carbonazione. Non trasferire una bevanda ancora effervescente nell'imbuto separatore.
- Aggiungere al campione una soluzione acquosa di carbonato di sodio, poco alla volta e mescolando. Controllare il pH e fermarsi a circa 9–10. Nei campioni acidi si sviluppa anidride carbonica: attendere che l'effervescenza sia terminata prima di procedere. Non aggiungere carbonato direttamente nell'imbuto separatore.
- Aggiungere alla fase acquosa circa 10 ml di soluzione satura di cloruro di sodio ogni 100 ml di campione e mescolare fino a uniformità. Il sale favorisce il salting-out dell'acetato di etile e può rendere più netta la separazione delle fasi.
- Per ogni 100 ml di fase acquosa, trasferire il campione in un imbuto separatore da 250 ml. Se si trattano 200 ml di bevanda, lavorare in due aliquote da circa 100 ml oppure usare un imbuto separatore di capacità adeguata.
- Estrarre ciascuna aliquota con 4 porzioni successive da 20–25 ml di acetato di etile. Dopo ogni aggiunta, chiudere l'imbuto, capovolgerlo e sfiatare frequentemente verso la cappa, tenendo l'apertura lontana da sé e dagli altri. Agitare con moderazione per limitare le emulsioni.
- Lasciare riposare fino alla separazione degli strati. Raccogliere la fase organica superiore in una beuta pulita; mantenere la fase acquosa nell'imbuto fino al completamento delle estrazioni. Se non è chiaro quale sia lo strato organico, verificarlo con una goccia d'acqua in un campione separato.
- Unire le porzioni di acetato di etile. Se necessario, ripetere l'estrazione della fase acquosa con altre piccole porzioni fresche e unire i nuovi estratti; l'aumento del numero di estrazioni può migliorare il recupero, ma aumenta il volume di solvente e dei rifiuti.
- Essiccare la fase organica aggiungendo solfato di sodio anidro in piccole porzioni e agitando. Aggiungerne finché i granuli restano liberi e la soluzione appare limpida; lasciare riposare alcuni minuti.
- Filtrare la soluzione essiccata attraverso cotone o carta da filtro in un pallone tarato. Risciacquare il solfato di sodio con pochi millilitri di acetato di etile e raccogliere il lavaggio nello stesso pallone.
- Allontanare l'acetato di etile con evaporatore rotante a pressione ridotta, sotto aspirazione e seguendo le istruzioni del laboratorio. Non usare fiamme libere e non evaporare il solvente su una piastra aperta. Pesare il residuo grezzo quando è asciutto.

- Ricristallizzazione: aggiungere al residuo etanolo al 95% in quantità minima. Scaldare il recipiente aperto su piastra o bagno d'acqua, sotto cappa e senza fiamme, aggiungendo altro etanolo caldo a piccole porzioni solo finché il solido si scioglie. Non scaldare recipienti chiusi.
- Lasciare raffreddare lentamente la soluzione senza disturbarla; quando è a temperatura ambiente, raffreddarla ulteriormente in bagno di ghiaccio. La quantità di caffeina, soprattutto nelle bevande, può essere troppo bassa per ottenere cristalli visibili: in tal caso si possono riunire estratti di campioni uguali prima della ricristallizzazione.
- Raccogliere i cristalli con filtrazione sotto vuoto, lavarli con poche gocce di etanolo freddo e lasciarli asciugare fino a massa costante. Pesare il prodotto e annotare l'origine del campione.
- Calcolare la resa. Per caffè o tè esprimere il prodotto rispetto alla massa iniziale; per una bevanda confezionata confrontare la massa isolata con il contenuto teorico ricavato dall'etichetta, indicando che si tratta di una stima e che l'estrazione non è quantitativa.
  Come controllo facoltativo, misurare il punto di fusione della caffeina purificata (valore di riferimento circa 235–237 °C). Per la TLC su silice F254 si può adottare come sistema di partenza acetato di etile contenente 0,1% di acido acetico: in uno studio su caffeina in campioni di caffè questo eluente ha dato Rf 0,33 ed è stato osservato sotto UV a 254 nm. Applicare sempre uno standard di caffeina sulla stessa lastrina; il valore di Rf può variare con la lastra e le condizioni di sviluppo.



IMBUTO BÜCHNER IN PORCELLANA



BEUTA CODATA



ANELLO DI GUKO

# Norme di sicurezza

L'acetato di etile è un liquido facilmente infiammabile: tutte le operazioni con solvente vanno svolte sotto cappa, lontano da fiamme, scintille e superfici calde. Indossare camice, occhiali e guanti compatibili indicati dalla SDS. Le fasi organiche e i residui vanno conferiti nei contenitori per rifiuti organici previsti dal laboratorio; non versarli nello scarico.

ACETATO DI ETILE - Elementi dell'etichetta*

*La classificazione e le frasi H/P dipendono dal prodotto: verificare l'etichetta e la SDS del fornitore effettivamente utilizzato.

| | |
|---|---|
| Pittogramma |  |
| Avvertenza | Pericolo |
| Indicazioni di pericolo | H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili<br>H319 Provoca grave irritazione oculare<br>H336 Può provocare sonnolenza o vertigini |
| Consigli di prudenza | P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille e fiamme libere.<br>P261 Evitare di respirare i vapori.<br>P280 Indossare guanti e proteggere gli occhi.<br>P305+P351+P338 In caso di contatto con gli occhi, sciacquare accuratamente per parecchi minuti. |
| Descrizioni supplementari del rischio | Consultare sempre la SDS del prodotto utilizzato. |

CARBONATO DI SODIO - Elementi dell'etichetta*

| | |
|---|---|
| Pittogramma |  |
| Avvertenza | Attenzione |
| Indicazioni di pericolo | H319 Provoca grave irritazione oculare |
| Consigli di prudenza | P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare<br>P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico |
| Descrizioni supplementari del rischio | nessuna |

*Etichettatura secondo la SDS del prodotto utilizzato.

ETANOLO 95% - Elementi dell'etichetta*

| | |
|---|---|
| Pittogramma |  |
| Avvertenza | Pericolo |
| Indicazioni di pericolo | H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili |

| | |
|---|---|
| | H319 Provoca grave irritazione oculare |
| Consigli di prudenza | P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. |
| Descrizioni supplementari del rischio | nessuna |

*Etichettatura secondo la SDS del prodotto utilizzato.

**Riferimenti essenziali**

Pacheco et al. Clean Technologies, 2021, 3, 19. doi:10.3390/cleantechnol3020019
ILO/WHO. International Chemical Safety Card 0367: ethyl acetate.
PubChem. Caffeine, CID 2519 (proprietà e punto di fusione).