

Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

José Roberto López Bóbeda

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por:

José Roberto López Bóbeda

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Presentado por:

José Roberto López Bóbeda

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Julio Roberto López, M.Sc.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

López, J. Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana “Zamorano”, Honduras. 25p.

La grasa, sacarosa, cafeína, trigonelina y el ácido clorogénico son considerados como los precursores del sabor del café. Este estudio implementó los métodos y validó las curvas estándar para cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) basado en las publicaciones de S. Casal, M. B. Oliveira y M. A. Ferreira (1998) y de Chin-Long Ky, *et al.* (1997). Se cuantificaron nueve concentraciones de cafeína y trigonelina, y siete para ácido clorogénico con tres lecturas por concentración. El rango de concentración detectable que cubrieron las curvas de calibración de cafeína y trigonelina fue uno a 1000 $\mu\text{g/mL}$ y la de ácido clorogénico de uno a 500 $\mu\text{g/mL}$. El tiempo promedio de retención de la cafeína fue 24.45 ± 0.53 min (% CV=4.6), para la trigonelina fue 3.714 ± 0.07 min (% CV=1.9) y para el ácido clorogénico fue 9.519 ± 0.11 min (% CV=1.7). Se obtuvo un $R^2 \geq 0.999$ para cada una de las curvas indicando una relación directa entre la concentración de compuesto/mL de solución y su área de pico de cafeína registrado en el HPLC. Las concentraciones de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico del valor esperado de la curva estándar y el resultado obtenido en la dilución de validación fueron estadísticamente iguales ($P|t| > 0.95$), comprobando que la calibración fue hecha correctamente.

Palabras clave: café, calibración, denominación de origen, validación

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
5. CONCLUSIONES.....	18
6. RECOMENDACIONES.....	19
7. BIBLIOGRAFÍA.....	20
8. ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS FIGURAS Y ANEXOS

		Página
Cuadro		
1.	Tiempo de retención y (%) coeficiente de variación de cafeína.....	10
2.	Áreas promedio y (%) coeficiente de variación de cafeína.....	11
3.	Concentración de cafeína obtenida del modelo de regresión para las muestras de validación.....	12
4.	Tiempo de retención y (%) coeficiente de variación de trigonelina.....	13
5.	Áreas promedio y (%) coeficiente de variación de trigonelina.....	13
6.	Concentración de trigonelina obtenida del modelo de regresión para las muestras de validación.....	14
7.	Tiempo de retención y (%) coeficiente de variación de ácido clorogénico.....	15
8.	Áreas promedio y (%) coeficiente de variación de ácido clorogénico...	15
9.	Concentración de ácido clorogénico obtenida del modelo de regresión para las muestras de validación.....	16
10.	Concentraciones de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico en café de Marcala vs. concentraciones de la literatura.....	17
Figura		
1.	Curva estándar de cafeína.....	11
2.	Curva estándar de trigonelina.....	14
3.	Curva estándar de ácido clorogénico.....	16
Anexo		
1.	Prueba t de concentraciones reales y proyectadas de cafeína y ácido clorogénico.....	23
2.	Cromatograma con método para análisis de cafeína y trigonelina de muestras de café pergamino seco de Marcala, Honduras.....	24
3.	Cromatograma con método para análisis de ácido clorogénico de muestras de café pergamino seco de Marcala, Honduras.....	25

1. INTRODUCCIÓN

El café es el producto básico de exportación para los países centroamericanos, y sin duda el más importante. Quince de los 18 departamentos de Honduras son productores de café, con la excepción de Gracias a Dios, Islas de la Bahía y Valle. En Honduras se siembra un área de 270,000 hectáreas de café de las variedades Típica, Borbón, Cautuai, Caturra, Parainema y Lempira. Noventa y ocho por ciento del café es cultivado bajo sombra y noventa y cinco por ciento de la caficultura está en manos de pequeños productores. La producción promedio anual es de 4.4 millones de sacos de 46 kg, 3.8 millones de los cuales se exportan. Con estas cifras Honduras es el segundo país productor de Centroamérica (IHCAFE, 2008).

Debido a los persistentes precios bajos en el mercado causados por la sobreproducción de café, promover y mercadear café de alta calidad para aliviar las dificultades financieras es de alto interés para los productores. Muchos factores afectan la calidad del café desde problemas causados por condiciones ecológicas hasta las propiedades genéticas de los cultivares (Vaast *et al.*, 2004).

La grasa, sacarosa, cafeína, trigonelina y el ácido clorogénico son considerados como los precursores del sabor del café, especialmente la sacarosa. La condensación y la degradación de la sacarosa durante el tostado juegan un papel importante en la formación de sabor a través de reacciones de Maillard (Avelino *et al.*, 2005).

Este proyecto de graduación fue financiado por la Cuenta del Desafío del Milenio (MCA) debido a la utilidad que este proyecto tendrá para los productores de café de Honduras.

Según Vaast *et al.* (2004), la técnica NIRS permite diferenciar cafés de acuerdo a su origen regional y podría ser utilizada para certificar el origen geográfico del café. Para desarrollar una curva de NIRS para café en Honduras es necesario contar con métodos rápidos, exactos y precisos para cuantificar los compuestos químicos que caracterizan al café. La cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cumple con todos éstos requisitos.

El objetivo del presente estudio fue implementar dos métodos y validar curvas de calibración para cuantificar cafeína, trigonelina y ácido clorogénico mediante el uso de cromatografía líquida en el rango de uno a 1000 μg de cafeína o trigonelina/100 g de solución y de uno a 500 μg de ácido clorogénico/100 g de solución. Las validaciones y curvas de calibración se realizaron con diluciones conocidas de sus respectivos estándar. Se describe también los procesos de extracción de cada uno de éstos componentes para análisis de muestras de café.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CAFEÍNA

Cafeína es el nombre común para la trimetilxantina (1,3,7-trimetilxantina). Ésta es producida naturalmente por varias plantas, entre éstas el café, el guaraná, la yerba mate, el cacao y el té. Para las plantas la cafeína actúa como un pesticida natural, paralizando y matando insectos que intentan alimentarse de la planta (Helmenstine, 2001).

Se considera que 100 mg es una dosis normal de cafeína y que es aproximadamente la cantidad encontrada en una taza de café. Sin embargo algunas personas consumen más de 300 mg de café todos los días, lo que convierte al café en una de las drogas más populares en los Estados Unidos. Ésta es consumida generalmente en café, bebidas de cola, chocolate y té (Helmenstine, 2001).

2.2 TRIGONELINA

La trigonelina, junto con el café y los aminoácidos, conforman los componentes nitrogenados del café. La trigonelina representa cerca del 1 % del peso seco del café verde, pero no sobrevive al tostado convirtiéndose en ácido nicotínico, piridina y otros compuestos volátiles. Se cree que éstos conforman parte importante del sabor y aroma de un café de calidad (Clifford, 1975).

2.3 ÁCIDO CLOROGÉNICO

El ácido clorogénico comprende varios ésteres de ácidos quinínicos y representa del 7 al 10 % de la materia seca del café verde. Durante el tostado ocurren diferentes reacciones químicas que reducen significativamente el porcentaje de ácidos clorogénicos aún presentes después del tostado (Clifford, 1975).

2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía es una técnica para analizar o separar mezclas de gases, líquidos o sustancias disueltas. En general, todos los tipos de cromatografía involucran dos fases: fase estacionaria (el material adsorbente) y una fase móvil (el solvente que eluye). La separación depende de la competencia de las moléculas de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria (O'Leary, 2000).

La cromatografía líquida de alta resolución, o HPLC por sus siglas en inglés, es un método cromatográfico para separar y analizar mezclas de sustancias usando una columna que contiene microesferas recubiertas con la fase estacionaria y donde la fase móvil es bombeada a través de la columna con una bomba de alta presión. La emergencia de cada uno de los componentes de la muestra es analizada de la columna usando diferentes detectores (O'Leary, 2000).

En cromatografía de gases (GC), la única función de la fase móvil es transportar el compuesto. En cromatografía líquida (LC), el soluto interactúa con líquidos o mezclas de líquidos usadas como fase móvil. La selección de la fase móvil es crítica y uno de los criterios más críticos es la solubilidad (Nollet, 2000).

Los solutos vencen la retención cuando existe una interacción débil con la fase estacionaria. La fase móvil debe ser elegida de acuerdo a la naturaleza del soluto (polar, no polar, iónico). La fase estacionaria más usada según encuestas en muchas publicaciones es la fase reversa. En este modo la fase móvil tiene una polaridad mayor a la de la fase estacionaria. Normalmente, la fase estacionaria es de naturaleza hidrofóbica (Nollet, 2000).

2.5 ESTUDIOS PREVIOS

Ky, *et al.* (2001), hicieron numerosas evaluaciones con café verde de las dos especies de mayor importancia económica en el mundo: *Coffea arabica L.* y *Coffea canephora P.* Los parámetros de aroma analizados por éstos utilizando HPLC fueron: los dos alcaloides, cafeína y trigonelina, ácido clorogénico y sacarosa. Los resultados revelaron que las dos especies muestran diferencias significativas en todos los compuestos. Comparando los contenidos promedio entre especies encontraron que *C. arabica* contiene más trigonelina y sacarosa y *C. canephora* presentó más ácido clorogénico y cafeína. También encontraron diferencias en las concentraciones de cada uno de éstos dependiendo del país del cual provenía la muestra.

Según Vaast *et al.* (2004), existen diferencias entre la composición bioquímica del café entre regiones. La técnica NIRS permite diferenciar el café de acuerdo al lugar donde proviene, y podría ser utilizada para certificar el origen geográfico del café.

En un estudio realizado en Costa Rica no se encontró correlación entre las características sensoriales del café y los contenidos de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico (Avelino *et al.*, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad Zamorano, localizada a 30 Km. de Tegucigalpa, a una altura de 814 msnm, en el departamento de Francisco Morazán, en las siguientes coordenadas: N 14° Y O 87°, con una precipitación promedio anual de 1,100 mm, y una temperatura promedio anual de 24 °C.

3.2 MATERIALES

1. Estándar de cafeína (Sigma Aldrich C1778-VL).
2. Estándar de trigonelina hidroclicorada (Sigma Aldrich T5509-1G).
3. Estándar de ácido clorogénico, mínimo 95% titulación (Sigma Aldrich C3878-2500MG).
4. Solución Carrez
 - a. Acetato de Zinc cristalizado
 - b. Ácido acético glacial
 - c. Agua destilada
 - d. Hexacyanoferrato de Potasio
5. Metanol (MeOH). 99.93% de pureza. Grado HPLC. Sigma Aldrich.
6. Fosfato de Sodio Monobásico, 99.0% de pureza. Sigma Aldrich.
7. Filtros Millex®-HV13, Durapore® PVDF, 13 mm (0.45 µm) Sigma Aldrich.
8. Viales de 4 ml. Supelco.
9. Puntas volumétricas de 20 y 1000 µL. Fisherbrand.
10. Cristalería de laboratorio y papel aluminio.
11. Papel filtro Whatman No. 1.
12. Filtro de membrana de 0.2mm.

3.3 EQUIPO

1. Balanza analítica OHAUS Adventurer No. AR2140.
2. Estación química para HPLC Agilent 1100.
3. Microdesgasificador al vacío Agilent 1100.
4. Bomba cuaternaria Agilent 1100.
5. Detector de arreglo de diodos Agilent 1100.
6. Válvula de inyección Rheodyne 7725i.

7. Molino Thomas-Whiley Modelo 4
8. Tamiz de 0.6 mm. W.S. Tyler, Incorporated
9. Columna ZORBAX ODS Agilent (4.6 x 250mm x 5 μ m).
10. Precolumna Zorbax SB-C18 (4.6 x 12.5mm) 4 μ m.

3.4 METODOLOGIA

El método utilizado para cuantificar cafeína y ácido clorogénico fue adaptado del método de *Cassal et al.* (1998).

El método utilizado para medir ácido clorogénico fue adaptado de *Ky, et al.* (1997).

3.4.1 Diseño experimental

Se desarrollaron tres curvas de calibración para cuantificar cafeína, trigonelina y ácido clorogénico utilizando nueve concentraciones de solución estándar en el caso de la cafeína y la trigonelina y seis concentraciones para la calibración de la curva de ácido clorogénico. Las concentraciones correspondientes a las curvas de cafeína y trigonelina fueron: uno, 10, 50, 100, 150, 200, 400, 700 y 1000 μ g de estándar/mL de agua. En el caso del ácido clorogénico las concentraciones fueron: uno, 50, 100, 150 y 500 μ g/mL de metanol. Se hicieron tres lecturas por cada nivel para cada curva de calibración y se midió la absorbancia a 276nm, 268nm y 325nm para cafeína, trigonelina y ácido clorogénico respectivamente expresada como área bajo el pico correspondiente al compuesto. El criterio de selección que confirma la linealidad del modelo fue el coeficiente de determinación (R^2) \geq 0,999 en Microsoft Office Excel 2007.

3.4.2 Desarrollo de curvas estándar de calibración para cafeína, trigonelina y ácido clorogénico

Para la generación de las curvas estándar de ácido clorogénico, cafeína y trigonelina se prepararon diluciones de agua en el caso de la cafeína y la trigonelina y de metanol en el caso del ácido clorogénico, con sus respectivos estándar.

3.4.2.1 Preparación de las diluciones estándar de cafeína y trigonelina

- El agua utilizada para la preparación de las soluciones se trató en todos los casos de agua destilada y filtrada a través de filtros de papel Whatman [®] número dos de 42.5mm de diámetro.

Se pesaron 100 mg de cafeína los cuales fueron diluidos en agua destilada y filtrada para obtener una solución con una concentración de 10 mg/mL de agua. De dicha solución se tomó un mL y se diluyó en nueve mL de agua para obtener una concentración de 1000 μ g/mL. Tomando 0.5, uno, 1.5, dos, cuatro y siete mL de la solución anterior y aforando a 10 mL con agua se obtuvieron las concentraciones de 50, 100, 150, 200, 400 y 700

$\mu\text{g/mL}$. De la solución de $100 \mu\text{g/mL}$ se tomó un mL y se aforó a 10 mL con agua obteniendo la concentración de $10 \mu\text{g/mL}$. Finalmente se repitió el procedimiento anterior con la solución de $10 \mu\text{g/mL}$ para obtener la concentración de un $\mu\text{g/mL}$.

Las diluciones de trigonelina se prepararon de la misma forma que las de cafeína.

3.4.2.2 Preparación de las diluciones estándar de ácido clorogénico

Para las diluciones de estándar de ácido clorogénico se preparó una solución de $1000 \mu\text{g/mL}$ de metanol. De esta se tomaron uno, 1.5, y cinco mL aforando a 10 mL con metanol para obtener las soluciones de 100 , 150 y $500 \mu\text{g/mL}$ de solución de $100 \mu\text{g/mL}$ se tomaron cinco mL y se procedió de la misma manera para obtener las soluciones de uno, 10 , 50 , $80 \mu\text{g/mL}$. De la solución de $10 \mu\text{g/mL}$ se tomó un mL que se aforó también a 10 mL de metanol para obtener la solución de un $\mu\text{g/mL}$.

- Todos los tubos de ensayo fueron rotulados de acuerdo al nivel de concentración
- Para cada tubo de ensayo se asignó un vial, previamente forrado con papel aluminio y rotulado.
- De cada balón se extrajeron tres mL de solución estándar con jeringas de inyección y se hicieron pasar por filtros de cero $0.2 \mu\text{m}$ para ser transferidos a sus respectivos viales.

3.4.2.3 Preparación de muestras de café para análisis de cafeína y trigonelina

Los granos de café verde que fueron sometidos a extracción fueron molidas y pasados a través de un tamiz de $600 \mu\text{m}$ inmediatamente antes de ser utilizadas. Una porción de dos g de café molido fue extraído con un total de 100 ml de agua hirviendo en agitación utilizando un magneto durante 5 min. Tres ml de esta solución fueron filtrados a través de un filtro de membrana de $0.2 \mu\text{m}$ (Casal *et al.*, 1999).

3.4.2.4 Preparación de muestras de café para análisis de ácido clorogénico

Todas las muestras fueron previamente congeladas para minimizar la degradación del ácido clorogénico. Las muestras fueron molidas y pasadas por un tamiz de $600 \mu\text{m}$. Las muestras fueron nuevamente formadas y se tomó un g de cada muestra para ser extraído en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de mezcla metanol-agua (70/30) y 0.5% (masa/volumen) de Na_2SO_3 . El erlenmeyer fue agitado durante aproximadamente 10 horas a una temperatura de 4°C en oscuridad a una agitación de 125 rpm. El extracto orgánico fue filtrado para eliminar el polvo (Ky *et al.*, 1997).

Los reactivos de la solución Carrez consisten en dos soluciones. La solución I fue preparada disolviendo 21.9 g de acetato zinc cristalizado y tres mL de ácido acético glacial en 100 mL de agua destilada. La solución II consistió en 10.6 g de potasio hexacianoferrato (Fe_{2+}) en 100 mL de agua destilada. El material coloidal presente en el

extracto fue precipitado añadiendo 1 mL de solución I, más 1 mL de solución II, diluido a 50 mL con mezcla de metanol con agua (70/30). Tres ml de esta solución fueron filtrados a través de un filtro de membrana de 0.2 mm (Ky *et al.*, 1997).

3.4.2.5 Métodos cromatográficos de análisis

Las diluciones estándar de cafeína y trigonelina se inyectaron en el HPLC para ser cuantificadas. Posteriormente el conjunto de cromatogramas por estándar de solución permitió obtener la curva estándar de calibración con su respectivo modelo de regresión.

Se utilizó el HPLC Agilent modelo 1100 junto al software ChemStation Rev. A. 10.02 [1757]. Se creó el método de análisis CAFETRIGO bajo las siguientes condiciones.

Las diluciones estándar de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico se inyectaron en el HPLC para ser cuantificadas. Posteriormente el conjunto de cromatogramas por estándar de solución permitió obtener la curva estándar de calibración con su respectivo modelo de regresión.

Se utilizó el HPLC Agilent modelo 1100 junto al software ChemStation Rev. A. 10.02 [1757]. Se crearon los métodos de análisis en el software; CAFETRIGO para cafeína y trigonelina y CLOROGEN para ácido clorogénico, bajo las siguientes condiciones: se usó un inyector manual Agilent 1100 con una válvula de inyección Rheodyne 7725i ajustada a un volumen de inyección de 20 μ L; se tomaron 20 μ L de cada vial de solución estándar para ser inyectados en la válvula de inyección y se realizaron tres inyecciones por cada nivel de solución estándar. Se utilizó una columna analítica ZORBAX ODS Agilent (4.6 x 250 mm) 5 μ m de tamaño de partícula con una precolumna ZORBAX SB C-18 (4.6 x 12.5 mm) 4 μ m. Los estándares de las muestras fueron analizados a una temperatura de 20°C. La tasa de flujo y las fases móviles variaron dependiendo del método utilizado.

La detección se hizo con un detector de arreglo de diodos (DAD por sus siglas en inglés). La cuantificación o análisis se determinó por las áreas bajo el pico para cada uno de los compuestos analizados. Las diluciones estándar de uno a 1000 μ g de cafeína o trigonelina/mL de agua y de uno a 500 μ g de ácido clorogénico/mL de metanol y el área registrada bajo el pico de cada uno de los estándares en unidades de mili absorbancia por segundo (mAU*s) permitió construir cada curva estándar de regresión lineal con su respectivo límite mínimo de detección para cada compuesto estándar de solución.

3.4.2.5.1 Método cromatográfico de análisis para cafeína y trigonelina

La trigonelina y la cafeína utilizaron una tasa de flujo de 1.0 mL/min. Los solventes de la fase móvil fueron: A, fosfato de sodio monobásico 0.2 M a pH 4; B, metanol grado HPLC. El gradiente fue el siguiente: al minuto 0 se usó 7 % del solvente B, al minuto 4 se usó 9% de B, al minuto 6 se usó 25 %, al minuto 13 se usó el 29 % y al minuto 21 se usó 50 % de B. La detección se hizo a 268nm para la trigonelina y a 276nm en el caso de la cafeína. La duración del análisis cromatográfico para la elaboración de la curva estándar fue de 30 min.

3.4.2.5.2 Método cromatográfico y de análisis de ácido clorogénico

En el caso del ácido clorogénico se usó una tasa de flujo de 0.8mL/min. La fase móvil constó de dos solventes, A y B. El solvente A fue agua con 2 mM de ácido fosfórico, pH 2.7, conteniendo 5% de metanol; el solvente B fue metanol conteniendo 5 % de 2 mM de ácido fosfórico, pH 3.9. Se utilizó el siguiente gradiente: mezcla A-B (75/25) a solvente B puro en 45 min de gradiente lineal. La detección se hizo a una longitud de onda de 325 nm, correspondiente la máxima absorción del ácido clorogénico (Ky *et al.*, 1997). La duración del análisis de cromatográfico de los estándar fue 15 min por corrida.

3.4.2.6 Obtención de curvas de calibración por regresión lineal

Se obtuvo modelos lineales de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico y se realizaron gráficas de tendencia correspondientes a cada estándar. La variable dependiente fue el área promedio bajo el pico de cada nivel del cromatograma correspondiente al nivel de solución estándar. La variable independiente fue la concentración de cafeína, trigonelina o ácido clorogénico expresada en μg de compuesto/mL de agua o metanol.

Por ser curvas estándar de calibración se aceptó sólo modelos de regresión que tengan un coeficiente de determinación o $R^2 \geq 0.999$. Esto favorece el poder de predicción de las curvas para obtener valores precisos con respecto a muestras de alimentos a cuantificar.

3.4.3 Validación de las curvas de calibración con diluciones estándar

Con el objetivo de verificar la precisión y exactitud de los modelos de regresión obtenidos de las curvas estándar se realizaron diluciones de validación. Estas diluciones fueron analizadas y cuantificadas bajo las mismas condiciones cromatográficas que las diluciones estándar.

La validación consistió en usar tres concentraciones de estándar y hacer tres repeticiones por concentración. Luego se comparó la concentración obtenida con la curva de calibración vs. la concentración inyectada por medio de una prueba T en el programa SAS. Las concentraciones usadas para la validación de las curvas de cafeína y trigonelina fueron 25 $\mu\text{g/mL}$, 175 $\mu\text{g/mL}$ y 800 $\mu\text{g/mL}$. Las concentraciones usadas para la validación de la curva de ácido clorogénico fueron: 30, 80 y 250 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.3.1 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Sistemas de Análisis Estadísticos (SAS®, por sus siglas en inglés). Se evaluaron los resultados con un nivel de significancia de 5 % ($P < 0.05$). Se realizó una prueba T para determinar la ausencia de diferencias estadísticas entre las concentraciones de ácido clorogénico, cafeína y trigonelina reales versus las cuantificadas por el ChemStation Rev. A. 10.02 [1757] del HPLC de acuerdo a los modelos de calibración desarrollados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE CAFEÍNA

En el cuadro 1 se muestra que los coeficientes de variación de los tiempos de retención respecto a cada nivel de solución estándar fueron <1%. Por lo tanto se determinó que el HPLC Agilent 1100 fue preciso al identificar cafeína en cada cromatograma en el rango de concentración establecido en el estudio.

Al determinar la curva estándar de cafeína se identificó que el tiempo de retención varió de un nivel a otro en segundos, es así que el tiempo promedio de retención del estándar fue de 24.45 ± 0.53 min. Por lo tanto fue a este tiempo donde la cafeína fue identificada y cuantificada por el HPLC.

Cuadro 1. Tiempo de retención y (%) coeficiente de variación de cafeína.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min) ^a	(%) Coeficiente de variación ^b
1	24.769 ± 0.284	1.1
10	24.891 ± 0.054	0.2
50	24.718 ± 0.042	0.2
100	24.690 ± 0.027	0.1
150	24.522 ± 0.088	0.4
200	24.370 ± 0.026	0.1
400	24.184 ± 0.021	0.1
700	24.095 ± 0.021	0.1
1000	23.244 ± 0.134	0.6

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de Cafeína

^b (%) coeficiente de variación del tiempo promedio de retención de cada nivel de dilución estándar de Cafeína

En el cuadro 2 se muestran las áreas promedio de cafeína respecto a cada nivel de solución estándar. Las áreas promedio obtenidas por el cromatógrafo líquido respecto a cada nivel de dilución estándar fueron precisas ya que obtuvieron % CV menores a 7.5%.

Cuadro 2. Áreas promedio y (%) coeficiente de variación de cafeína.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo ^a retención (min)	Área promedio ^b (mAU*s)	Coefficiente de variación (%)
1	24.769 \pm 0.284	87.96539 \pm 5.742	6.5
10	24.891 \pm 0.054	803.724 \pm 47.560	5.9
50	24.718 \pm 0.042	2597.360 \pm 17.955	0.7
100	24.690 \pm 0.027	4781.633 \pm 41.557	0.6
150	24.522 \pm 0.088	8278.028 \pm 86.162	1.0
200	24.370 \pm 0.026	10868.333 \pm 131.777	1.2
400	24.184 \pm 0.021	21602.600 \pm 188.596	0.9
700	24.095 \pm 0.021	36740.100 \pm 2765.091	7.5
1000	23.244 \pm 0.134	52557.733 \pm 564.410	1.1

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de cafeína.

^b Área promedio de tres lecturas por nivel de dilución estándar de cafeína.

Se muestra en la figura 1 la curva estándar para la cuantificación de cafeína que se obtuvo por regresión lineal. La variable dependiente muestra el área de cafeína reportada por cada cromatograma realizado. La variable independiente representa los μg de cafeína/mL de agua.

Se obtuvo un coeficiente de determinación de de 0.9997, indicando una relación directa entre la concentración de cafeína en $\mu\text{g/mL}$ y su área de pico de cafeína registrado en el HPLC.

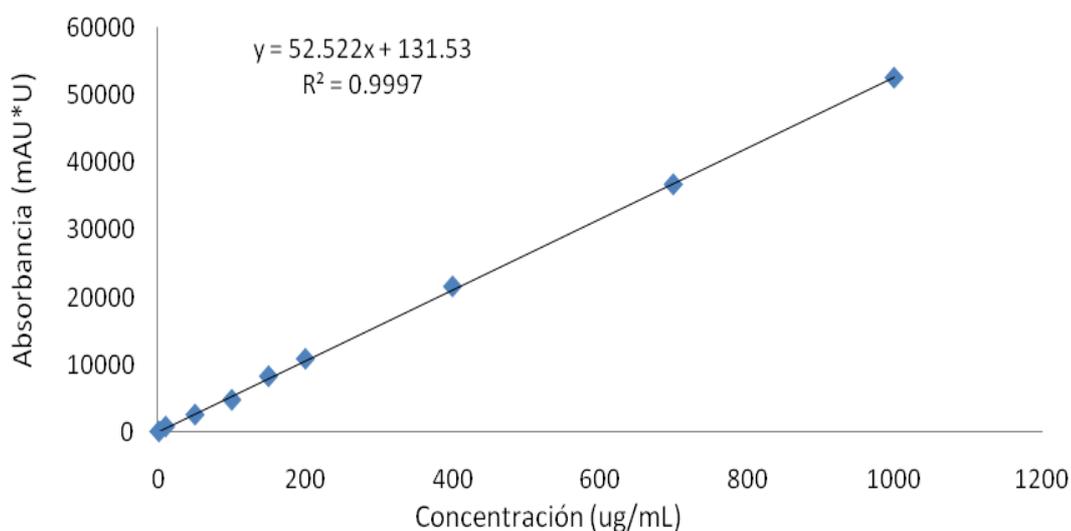


Figura 1. Curva estándar de cafeína.

La curva estándar permitirá cuantificar cafeína en el rango de 1 a 1000 μg de cafeína/mL de agua. Por lo tanto, al analizar cualquier alimento que no sea café será necesario consultar bibliografía para tener una idea de la cantidad de cafeína que éste posee para poder definir si está dentro de la curva de calibración. Para la mayoría de los alimentos será necesario diluir la muestra en diez a 1000 mL de agua debido a que la mayoría de los alimentos que contienen cafeína la contienen en concentraciones mayores a un mg/mL. El té es un ejemplo de esto, que contiene 19.67 mg de cafeína/100g de té hervido preparado con agua destilada (Nutritiondata.com, 2008).

En el Cuadro 3 se muestra la concentración obtenida en software ChemStation Agilent para las muestras de validación. Es importante conocer que, una solución de validación solo se reporta como cafeína si se ajusta al tiempo de retención promedio de la curva estándar.

Cuadro 3. Concentración de cafeína obtenida del modelo de regresión para las muestras de validación.

Concentración conocida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración obtenida del modelo ($\mu\text{g/mL}$)	(%) Coeficiente de variación
25	24.270 ± 2.216	9.1
180	174.929 ± 6.04	3.5
800	784.556 ± 68.874	8.8

La prueba T (Anexo 1) determinó de que la probabilidad de que las diferencias entre la concentración de cafeína del valor esperado de la curva estándar y el resultado obtenido en la dilución de validación ocurran por casualidad fue ($P|t|>0.967$). Por lo tanto la curva estándar de calibración tuvo un buen poder de predicción de cafeína en el rango detectable de estándar de dilución.

4.2 DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE TRIGONELINA

El cuadro 4 muestra que los coeficientes de variación de los tiempos de retención respecto a cada nivel de solución estándar fueron $<3.438\%$, por lo tanto se determinó que el HPLC Agilent 1100 fue preciso al identificar trigonelina en cada cromatograma. Al determinar la curva estándar de trigonelina se identificó que el tiempo de retención varió de un nivel a otro en segundos, es así que el tiempo promedio de retención del estándar fue de 3.714 ± 0.071 min. Por lo tanto fue a este tiempo donde la trigonelina fue identificada y cuantificada.

Cuadro 4. Tiempo de retención y (%) coeficiente de variación de trigonelina.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min) ^a	Coefficiente de variación (%) ^b
1	3.776 ± 0.016	0.2
10	3.725 ± 0.012	0.3
50	3.718 ± 0.020	0.5
100	3.708 ± 0.010	0.3
150	3.713 ± 0.008	0.2
200	3.831 ± 0.132	3.4
400	3.702 ± 0.016	0.4
700	3.624 ± 0.041	1.1
1000	3.680 ± 0.075	2.0

a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de trigonelina

b (%) coeficiente de variación del tiempo promedio de retención de cada nivel de dilución estándar de trigonelina

En el cuadro 5 se muestran las áreas promedio de trigonelina y % CV respecto a cada nivel de solución estándar. Las áreas promedio obtenidas fueron precisas ya que se obtuvieron % CV < 7.9.

Cuadro 5. Áreas promedio y (%) coeficiente de variación de trigonelina.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo ^a retención (min)	Área promedio ^b (mAU*s)	Coefficiente de variación (%)
1	3.776 ± 0.016	60.762 ± 1.222	2.0
10	3.725 ± 0.012	297.554 ± 17.273	5.8
50	3.718 ± 0.020	1328.677 ± 36051	2.7
100	3.708 ± 0.010	2398606 ± 65.698	2.7
150	3.713 ± 0.008	3058.689 ± 58.929	1.9
200	3.831 ± 0.132	4131.446 ± 327.771	7.9
400	3.702 ± 0.016	8606.833 ± 628.857	7.3
700	3.624 ± 0.041	15025.025 ± 581.891	3.9
1000	3.680 ± 0.075	22251.550 ± 662.431	3.0

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de trigonelina

^b Área promedio de tres lecturas por nivel de dilución estándar de trigonelina.

La figura 2 muestra la curva estándar para la cuantificación de trigonelina que se obtuvo por regresión lineal. Al igual que la curva de calibración de cafeína la variable dependiente muestra el área de trigonelina reportada por cada cromatograma realizado y la variable independiente representa los μg de trigonelina/mL de agua. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.999, indicando una relación directa entre la

concentración de trigonelina/mL de agua y su área de pico de trigonelina registrado en el HPLC.

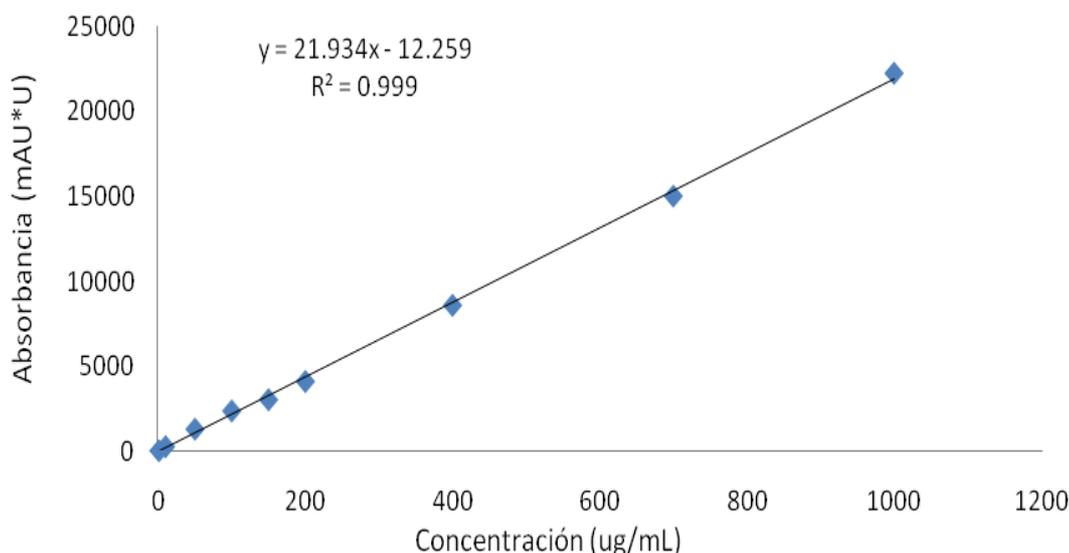


Figura 2. Curva estándar de trigonelina.

La curva estándar permitirá cuantificar trigonelina en el rango de 1 a 1000 µg/mL de agua. Por lo tanto, al analizar cualquier alimento que no sea café será necesario consultar bibliografía para tener una idea de la cantidad de trigonelina que éste posee para poder definir si está dentro de la curva estándar de calibración.

En el cuadro 6 se muestra la concentración obtenida en software ChemStation Agilent para las muestras de validación. Es importante conocer que, una solución de validación solo se reporta como trigonelina si se ajusta al tiempo de retención promedio de la curva estándar.

Cuadro 6. Concentración de trigonelina obtenida del modelo de regresión para las muestras de validación.

Concentración conocida (µg/mL)	Concentración obtenida del modelo (µg/mL)	(%) coeficiente de variación
25	24.325 ± 2.228	9.2
180	180.966 ± 11.38	6.3
800	796.876 ± 42.805	5.4

La prueba t (Anexo 1) determinó de que la probabilidad de que las diferencias entre la concentración de trigonelina del valor esperado de la curva estándar y el resultado

obtenido en la dilución de validación ocurran por casualidad es de ($P|t|>0.996$). Por lo tanto la curva estándar de calibración tiene un buen poder de predicción de cafeína en el rango detectable de estándar de dilución.

4.3 DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO CLOROGÉNICO

De la misma forma que para la cafeína y la trigonelina se determinó una curva estándar de ácido clorogénico. El cuadro 7 muestra que los coeficientes de variación de los tiempos de retención respecto a cada nivel de solución estándar fueron $<1.1\%$, por lo tanto se determinó que el HPLC Agilent 1100 fue preciso al identificar ácido clorogénico en cada cromatograma. Al determinar la curva estándar de ácido clorogénico se identificó que el tiempo de retención varió de un nivel a otro en segundos, es así que el tiempo promedio de retención del estándar fue 9.519 ± 0.11 min. Por lo tanto fue a este tiempo donde el ácido clorogénico fue identificado y cuantificado.

Cuadro 7. Tiempo de retención y (%) coeficiente de variación de ácido clorogénico.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min) ^a	Coefficiente de variación(%) ^b
1	9.316 ± 0.044	0.5
50	9.555 ± 0.107	1.1
100	9.677 ± 0.040	0.4
150	9.727 ± 0.032	0.3
500	9.343 ± 0.048	0.5

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de ácido clorogénico

^b (%) coeficiente de variación del tiempo promedio de retención de cada nivel de dilución estándar de ácido clorogénico.

En el cuadro 8 se muestran las áreas promedio de ácido clorogénico y % CV respecto a cada nivel de solución estándar. Las áreas promedio obtenidas fueron precisas ya que se obtuvieron % CV < 4.0 .

Cuadro 8. Áreas promedio y (%) coeficiente de variación de ácido clorogénico.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo ^a retención (min)	Área promedio ^b (mAU*s)	Coefficiente de variación (%)
1	9.316 ± 0.044	90.400 ± 1.967	2.2
50	9.555 ± 0.107	1675.153 ± 66.284	4.0
100	9.677 ± 0.040	3598.092 ± 50.168	1.4
150	9.727 ± 0.032	5449.069 ± 93.263	1.7
500	9.343 ± 0.048	19606.800 ± 263.320	1.3

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de ácido clorogénico.

^b Área promedio de tres lecturas por nivel de dilución estándar de ácido clorogénico.

Se muestra en la figura 3 la curva estándar para la cuantificación de ácido clorogénico que se obtuvo por regresión lineal. La variable dependiente muestra el área de ácido clorogénico reportada por cada cromatograma realizado. La variable independiente representa los μg de cafeína/mL de metanol.

Se obtuvo un coeficiente de determinación de de 0.9993, indicando una relación directa entre la concentración de ácido clorogénico/mL de metanol y su área de pico de ácido clorogénico registrado en el HPLC.

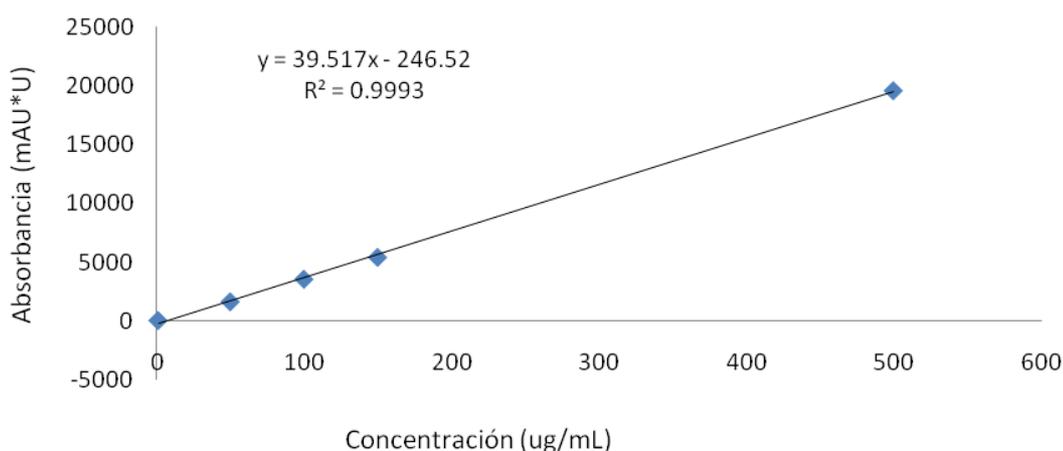


Figura 3. Curva estándar de ácido clorogénico.

La curva estándar permitirá cuantificar ácido clorogénico en el rango de 1 a 500 μg de ácido clorogénico/mL de metanol. Por lo tanto, al analizar cualquier alimento que no sea café será necesario consultar bibliografía para tener una idea de la cantidad de ácido clorogénico que éste posea para poder definir si está dentro de la curva de calibración.

En el cuadro 9 se muestra la concentración obtenida en software ChemStation Agilent para las muestras de validación. Es importante conocer que, una solución de validación solo se reporta como trigonelina si se ajusta al tiempo de retención promedio de la curva estándar.

Cuadro 9. Concentración de ácido clorogénico obtenida del modelo de regresión para las muestras de validación.

Concentración conocida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración obtenida del modelo ($\mu\text{g/mL}$)	(%) coeficiente de variación
30	34.562 ± 0.463	1.3
80	77.486 ± 1.900	2.4
250	250.604 ± 8.105	3.2

La prueba t (Anexo 1) determinó de que la probabilidad de que las diferencias entre la concentración de trigonelina del valor esperado de la curva estándar y el resultado obtenido en la dilución de validación ocurran por casualidad fue ($P|t|>0.996$). Por lo tanto la curva estándar de calibración tiene un buen poder de predicción de cafeína en el rango detectable de estándar de dilución.

4.4 Análisis de muestras de café

Para comprobar la efectividad de los métodos cromatográficos y de extracción se analizaron muestras de café provenientes de Marcala, Honduras; proveídas por el proyecto Valor Agregado. En los cromatogramas de los Anexos 2 y 3 se observó que los picos correspondientes a los compuestos de interés se encontraron libres de interferencia, por lo que se concluye que los métodos de extracción y cromatográficos fueron eficientes en separar los compuestos.

El cuadro 10 muestra los valores obtenidos de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico en las muestras de café y los encontrados en la literatura.

Cuadro 10. Concentraciones de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico en café de Marcala vs. concentraciones de la literatura.

Análisis de muestras de café (g/Kg)					
<i>LAAZ</i>			<i>Literatura</i>		
cafeína (g/kg)	trigonelina (g/Kg)	ácido clorogénico (% M.S.)	cafeína (g/Kg)	trigonelina (g/Kg)	ácido clorogénico (% M.S.)
5.44	4.3	0.48	15.487	7.063	3

5. CONCLUSIONES

Las curvas estándar de calibración estimaron de manera exacta y precisa cafeína, trigonelina y ácido clorogénico en las diluciones de validación en el rango entre 1 a /1000 μg de muestra.

Los valores detectados por el HPLC fueron iguales a los proyectados por la curva de calibración.

6. RECOMENDACIONES

Usar estándar líquidos en lugar de cristalinos, ya que elimina el proceso de pesado y reduce el error humano.

Realizar el proceso de extracción de cafeína en otros alimentos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Avelino, J; Barboza, B; Araya, J.C; Fonseca, C; Davrieux, F; Guyot, B; Cilas, C. 2005. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture* no. 85: 1869-1876.

Cassal, S; Oliveira, B; Ferreira, A. 1998. Development of an HPLC/Diodode-Array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *Journal of Liquid Chromatographie & Related Technologie* 21 (20) 3287-3195.

Clifford, M.N. 1975. The composition of green and roasted coffee beans. *Proc. Biochem* 10, (3) 22-23, (5) 13-16.

IHCAFÉ. 2008. El café. Consultado el 18 de Mayo de 2008. Disponible en: http://www.cafedehonduras.org/ihcafe/administrador/aa_archivos/documentos/generalidades_cafe.pdf

Helmenstine, A.M. 2001. Caffeine chemistry. What is caffeine and how does it work. Consultado el 25 de Agosto de 2008. Disponible en: <http://chemistry.about.com/od/moleculescompounds/a/caffeine.htm>

Ky, C.L; Louarn, J; Dussert, S; Guyot, B; Hamon, S; Noirot, M. 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. C. canephora P. accessions. *Food Chemistry* (75) 223–230.

Ky, C; Noirot; M; Hamon, S. 1997. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*coffea* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (45) 785-790.

Nollet, L.M.L. 2000. *Food Analysis by HPLC*. Ed. L. M. L. Nollet. 2 ed. Estados Unidos. Marcel Dekker Inc. 1049 p.

Nutritiondata.com. 2008. Tea, brewed, prepared with distilled water [black tea]. Consultado el 23 de Octubre de 2009. Disponible en: www.nutritiondata.com

O'Leary, D. 2000. *Chromatography*. Consultado el 18 de Mayo de 2008. Disponible en: <http://www.ucc.ie/academic/chem/dolchem/html/dict/000c2.html>

Vaast, P; Bertrand, B; Perriot, J; Guyot, B; Génard, M. 2004. Mapping coffee quality in Nicaragua. Proceedings of ASIC conference. Bangalore, India.

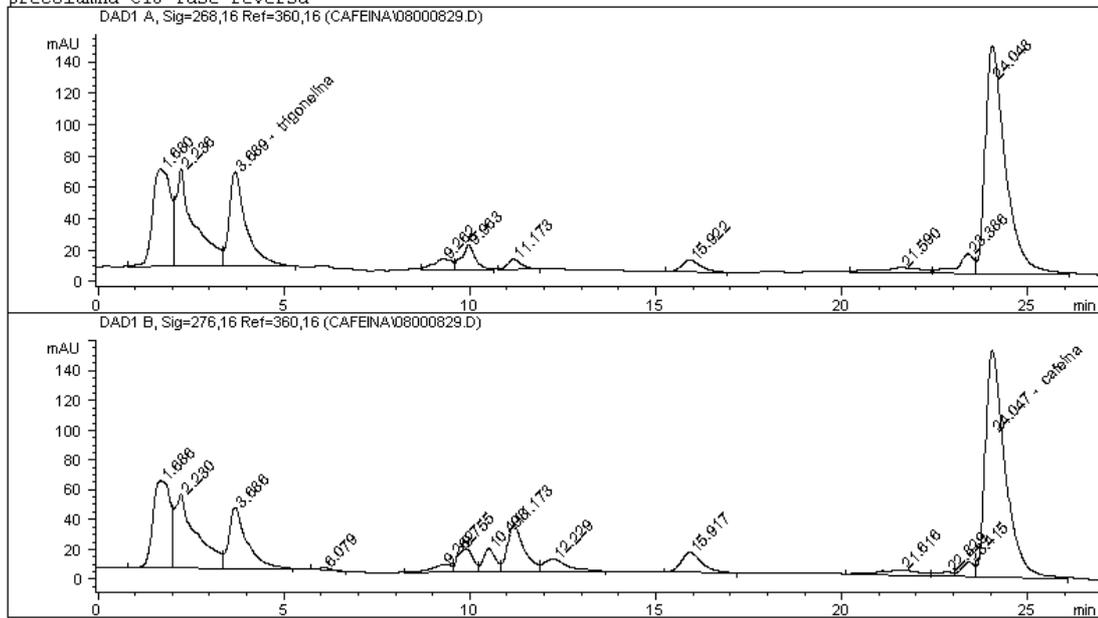
8. ANEXOS

Anexo 1. Prueba t de concentraciones reales y proyectadas de cafeína y ácido clorogénico

Compuesto	DF	Valor t	Pr > t
Cafeína	16	0.04	0.967
Trigonelina	16	0.01	0.996
Ácido Clorogénico	16	-0.02	0.985

Anexo 2. Cromatograma con método para análisis de cafeína y trigonelina de muestras de café pergamino seco de Marcala, Honduras

Método para análisis de trigonelina y cafeína, columna Zorbax ODS 5u 4.6 x 250 mm
precolumna C18 fase reversa



Anexo 3. Cromatograma con método para análisis de ácido clorogénico de muestras de café pergamino seco de Marcala, Honduras

