



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y
CAFEÍNA EN GRANOS DE CAFÉ VERDE Y TOSTADO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MARÍA EUGENIA SALINAS VARGAS



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesora: Ernestina Cervera Flores
VOCAL	Profesora: Georgina Artemisa Duarte Lisci
SECRETARIO	Profesora: María del Pilar Cañizares Macías
1er. SUPLENTE	Profesora: Bertha Julieta Sandoval Guillén
2do. SUPLENTE	Profesora: Agueda Elena Ceniceros Gómez

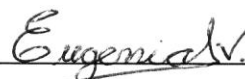
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105 – 106. Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Edificio B. Facultad de Química. UNAM.



Dra. María del Pilar Cañizares Macías

ASESORA



María Eugenia Salinas Vargas

SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por todas las cosas que me han brindado durante toda mi vida. Por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles y por ayudarme a superarlos ¡Mí! gracias!

A mi padre J. Buenaventura Salinas Ibañez[†] quien con su esfuerzo, dedicación y cariño siempre me apoyó en todas mis decisiones, gracias por el ejemplo recibido, por los consejos brindados y por haber estado a mi lado siempre; fuiste el mejor padre que Dios me pudo dar ¡Mí! gracias por todo! Y aunque la vida no nos permitió disfrutar de este triunfo juntos, te lo dedico con todo mi amor y cariño pues gracias a ti logré terminar este proyecto.

A mi madre Rosa Vargas Ayala, por su apoyo incondicional, por el ejemplo recibido, por los consejos brindados, por estar conmigo en mis buenos y malos momentos, por las noches de desvelo y por su infinita paciencia ¡Mí! gracias!

A mi hermano José Buenaventura Salinas Vargas, por su apoyo incondicional, por los consejos brindados, por estar conmigo en mis buenos y malos momentos y por aguantarme todo este tiempo ¡Mí! gracias!

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado sus maravillosas instalaciones durante toda mi formación, y por el orgullo de formar parte de ella.

A la Facultad de Química y a todos mis profesores (en especial a: María Teresa Herrera Barrera[†], Biserka Sveshtarova Pekarkova[†], José

Luis Medina Franco, Rosa Luz Cornejo Rojas, Rosalba Esquivel Cote, Rosa María Ramírez Gama, Martha Yolanda González Quezada, Martha Giles Gómez, Francisco Rojo Callejas, Zoila Nieto Villalobos, Aleida Mina Cetina, Rodolfo Fonseca Laríos, Hilda Elizabeth Calderón Villagomez , Juan Carlos Ramírez Orejel, y Laura Carmona Salazar), pues sin su ayuda no hubiera logrado cumplir esta meta.

Al Dr. Bob Johnson gracias por el apoyo brindado y por la beca otorgada cuando era director del programa de becas profesores-pro alumnos.

A todos los profesores que conforman las becas profesores-pro alumnos ¡mí! gracias! Por la beca brindada durante gran parte de mi formación profesional.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías, por brindarme todas las facilidades para la realización de este trabajo, por la confianza brindada para desarrollar este proyecto, por el tiempo que dedicó a revisar este trabajo, por su infinita paciencia, y por siempre estar dispuesta a escucharme y resolver todas mis dudas, de antemano le agradezco el apoyo brindado.

A la profesora Lucía Cornejo Barrera por brindarme todas las facilidades para la liofilización de algunas muestras de café.

Al profesor Bernardo Lucas Florentino y a la profesora Rosita Argote por las facilidades otorgadas en su laboratorio para la liofilización de algunas muestras de café.

A las profesoras Ernestina Cervera Flores y Georgina Artemisa Duarte Lisci por el tiempo que dedicaron en la revisión, corrección y mejora de este trabajo.

A mis profesores Juan González Velasco, Leticia Jacinto Vega y Lázaro Alfredo Aburto Fierro por despertar en mí el interés por la Química.

A mis amigas Adalith, Betty, Hortensia, Selene y Vanessa González con quienes inicié esta maravillosa etapa de mi vida y con quienes compartí muchas horas de estrés y alegría. ¡Gracias por el tiempo compartido y el apoyo brindado! y por aguantarme todo este tiempo en mis buenos y malos momentos.

A mis amigas Adriana Rodríguez, Aurora, Biani, Lucila, María del Refugio y Patricia Luna con quienes compartí momentos de estrés, incertidumbre, alegría y mis últimas materias en la H. Facultad de Química ¡Gracias por el tiempo compartido, el apoyo brindado y por haber formado grandes equipos de trabajo!

A mis amigas y amigos por el tiempo compartido, las horas de estrés vividas, el apoyo brindado y por estos años de amistad.

Abigail Roxana, Alicia Barbosa, Carolina Méndez, Deny Marín, Elizabeth, José Talamantes, Juan Carlos Ramírez, Lilita Castro, Mauri Betzabeth, Miguel Ángel, Roberto, Rosa Isela, Rosalba Hernández, Rosario, Salvador, Susana, Vanessa Figueroa, Verónica y Víctor.

A mis compañeras y compañero de laboratorio, por el tiempo compartido y por la ayudada brindada durante el desarrollo de este proyecto Adalith, Lidia, Lorena, Leslie y Piotr.

A todas las personas que a lo largo de mi vida han contribuido de alguna u otra manera en mi formación.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	9
I. ANTECEDENTES	10
1.1 El café	10
1.1.1 Generalidades	10
1.2 Café verde o crudo	12
1.2.1 Especies y variedades	12
1.2.2 Recolección	13
1.2.3 Procesamiento	13
1.2.4 Preparación seca	13
1.2.5 Preparación húmeda	13
1.3 Café tostado	14
1.3.1 Tecnología de tueste	14
1.3.2 Tostado por contacto	15
1.3.3 Tostado por contacto-convección	15
1.3.4 Almacenamiento y envasado	16
1.4 Café descafeinado	16
1.5 El mercado mundial del café	17
1.6 El café en México	18
1.7 Enfermedades del café	19
1.8 Composición química del café verde	20
1.9 Compuestos fenólicos	20
1.9.1 Polifenoles	21
1.10 Radicales libres	22
1.11 Ácidos clorogénicos (CGAs)	24
1.11.1 Ácidos clorogénicos (CGAs) del café verde	25
1.11.2 Propiedades físicas y químicas del CGA	29
1.11.3 Ácidos clorogénicos (CGAs) del café tostado	30

1.11.4 Actividad antioxidante de los CGAs	31
1.12 Determinación de CGAs	31
1.13 Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	33
1.13.1 Características esenciales del sistema FIA	34
1.13.2 Componentes de un sistema FIA	35
1.14 Descripción de los componentes del sistema FIA	37
1.14.1 Unidad de propulsión	37
1.14.2 Sistema de inyección	38
1.14.3 Zona de reacción	39
1.14.4 Zona de detección y sistema de detección (espectrofotómetro)	42
1.14.5 Diagrama	44
1.15 Determinación de compuestos fenólicos	45
1.16 Cafeína	45
1.16.1 Propiedades físicas y químicas	45
1.16.2 Alimentos y cafeína	46
1.16.3 Cafeína en café	46
1.16.4 Toxicidad	47
1.16.5 Usos de la cafeína	47
1.16.6 Determinación de cafeína	47
1.16.6.1 Espectrometría ultravioleta	51
1.17 Extracción líquido-sólido	53
1.18 C ₁₈	53
II. METODOLOGÍA	56
2.1 Materiales y reactivos	56
2.1.1 Instrumentación	56
2.1.2 Reactivos	56
2.1.3 Preparación de disoluciones	57
2.2 Muestras analizadas	59
2.2.1 Café en grano verde y tostado	59
2.2.2 Preparación de las muestras	59
2.3 Métodos de secado	60

2.3.1 Liofilización	60
2.3.2 Secado por estufa	60
2.4 Métodos de extracción	62
2.5 Determinación de polifenoles en granos de café verde y tostado	63
2.6 Determinación de cafeína en extractos clorofórmicos	64
2.7 Determinación de cafeína acoplado la extracción en línea con un Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	65
2.8 Precauciones con los reactivos	68
2.9 Validación de las metodologías	68
2.9.1 Límite de detección y cuantificación	68
2.9.2 Precisión	69
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
3.1 Espectro de absorción del ácido clorogénico (CGA)	70
3.2 Sistema de Análisis por Inyección en flujo (FIA)	70
3.3 Curva de calibración de ácido clorogénico (CGA)	71
3.4 Curva de calibración de cafeína en cloroformo	72
3.5 Curva de calibración de cafeína por Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	73
3.6 Validación de las metodologías	75
3.7 Evaluación del sistema FIA para determinar polifenoles	75
3.7.1 Repetibilidad y reproducibilidad	75
3.8 Evaluación del método para determinar cafeína en cloroformo	77
3.8.1 Repetibilidad y reproducibilidad	77
3.9 Evaluación del sistema FIA para determinar cafeína	78
3.9.1 Repetibilidad y reproducibilidad	78
3.10 Optimización de la extracción de polifenoles y cafeína	79
3.10.1 Extracción por agitación magnética	79
3.10.2 Volumen de extractante y cantidad de muestra	79
3.10.3 Métodos de extracción	80
3.10.4 Optimización del método de extracción para polifenoles	80
3.10.5 Optimización del método de extracción para cafeína	82

3.11 Análisis de las muestras	83
3.11.1 Cuantificación de polifenoles en café verde liofilizado y sin liofilizar	83
3.11.2 Cuantificación de polifenoles en café verde secado en estufa	85
3.11.3 Cuantificación de polifenoles en café tostado y en café verde secado en estufa	87
3.11.4 Evaluación del sistema FIA para determinar polifenoles	88
3.11.4.1 Repetibilidad y reproducibilidad	88
3.12 Cuantificación de cafeína por extracción con cloroformo	89
3.12.1 Extractos clorofórmicos	89
3.12.1.1 Café verde	89
3.12.1.2 Café verde secado en estufa	90
3.12.1.3 Café tostado en origen	92
3.13 Evaluación de la extracción de cafeína con cloroformo	93
3.13.1 Repetibilidad y reproducibilidad	93
3.14 Cuantificación de cafeína acoplado la retención y extracción a un sistema FIA	94
3.15 Comparación entre la extracción de cafeína con cloroformo y el método FIA para determinar cafeína	95
3.15.1 Recobro de cafeína en café planchuela tostado cubano	97
3.15.2 Repetibilidad y reproducibilidad de la extracción y cuantificación de cafeína por FIA	98
IV. CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXO I	110
ANEXO II	111
ANEXO III	120
ANEXO IV	123

ABREVIATURAS

CGA	Ácido clorogénico
CGAs	Ácidos clorogénicos
5-CQA	Ácido 5-O-cafeoilquínico
3-CQA	Ácido 3-cafeoilquínico
CQAs	Ácidos cafeoilquínicos
diCQAs	Ácidos dicafeoilquínicos
FQAs	Ácidos feruloilquínicos
pCoQAs	Ácidos p-cumaroilquínicos
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación peroxidasa
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RNS	Especies Reactivas del Nitrógeno
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
FIA	Análisis por Inyección en Flujo
CFA	Análisis de Flujo Continuo
mm	Milímetro
mg/L	Miligramos por litro
ppm	Partes por millón
C ₁₈	Octadecilo
ODS	Octadecilsilano
UV	Ultravioleta
HP-GF	Cromatografía de Alta Resolución por Filtración en Gel
GC-MS	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
TCA	Ácido Tricloroacético
LC-UV	Cromatografía Líquida con Detección Ultravioleta
LC-MS	Cromatografía Líquida – Espectrometría de Masas
HP-CE	Cromatografía de Alta Resolución por Electroforesis Capilar

MECC	Cromatografía Capilar Electrocinética
MgO	Óxido de magnesio
ng	Nanogramos
V	Volts
cd	Corriente directa
MeOH	Metanol
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
ANOVA	Análisis de varianza

INTRODUCCIÓN

El café es la bebida producida a partir de las semillas tostadas de las bayas de dos tipos principales de arbustos *Coffea arabica* (café arábico) y *Coffea canephora* (café robusto), pertenece a la familia de las rubiáceas.

El *Coffea arabica* (café arábico) es el que se ha cultivado desde la antigüedad, y junto con el *Coffea canephora* (café robusto) representa el 90 % de la producción mundial de café.

El *Coffea arabica* (café arábico) produce un café fino y aromático, necesita de un clima fresco. El cultivo de *arabica* está reservado a tierras de alta montaña.

Del *Coffea canephora* (café robusto) se obtiene una bebida rica en cafeína, de sabor fuerte y más ácido; esta especie es menos exigente en cuanto a condiciones de cultivo (altitud, temperatura, etc.).

Desde hace más de dos siglos y hasta nuestros días, el café se ha mantenido como una de las bebidas más populares del mundo, siendo éste fuente importante de polifenoles y cafeína.

Los polifenoles juegan un papel importante en la defensa de la planta contra insectos, microorganismos y herbívoros (depredadores en general). Los ácidos clorogénicos (CGAs) son una familia de ésteres, formada entre el ácido quínico y ciertos ácidos trans-cinámicos (los más comunes son el ácido cafeico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico). El ácido clorogénico (CGA) más común, más abundante en el café y más disponible comercialmente es el ácido 5-O-cafeoilquínico, también conocido como ácido 3-cafeoilquínico, y comúnmente llamado ácido clorogénico (CGA); es un éster formado entre el ácido quínico y el ácido cafeico.

En años recientes, el estudio de los polifenoles ha despertado gran interés debido a que algunos estudios han demostrado que ayudan a mantener la salud y a prevenir enfermedades crónicas o degenerativas tales como cáncer, diabetes tipo II, inflamación y enfermedades hepáticas. Las evidencias en desarrollo también indican el posible impacto positivo del café en enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo el Parkinson y el Alzheimer, por lo que se ha revalorado a las fuentes naturales que los contienen como el café. Es por ello que en este trabajo resultó importante determinar los polifenoles totales en los granos de café mexicano

verde y tostado de la variedad arábica. La determinación de polifenoles se realizó usando un Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) con el reactivo de Folin-Ciocalteau. Este método se basa en la reducción del reactivo de Folin obteniéndose un complejo de color azul que se lee a 760 nm.

Los sistemas FIA reducen el tiempo de análisis y originan resultados reproducibles. Protegen al analista del contacto directo con los reactivos al mismo tiempo que protege a los reactivos y muestras de los gases atmosféricos y de la humedad. Esta técnica ha sido muy utilizada en el campo de los alimentos.

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide del grupo de las xantinas (a la que también pertenecen la teofilina del té y la teobromina del chocolate). Estos alcaloides tienen efectos estimulantes sobre el cuerpo humano; estimulan el sistema nervioso central, tienen acción sobre la fibra muscular, especialmente el músculo cardíaco porque liberan calcio (Ca^{+2}) del retículo endoplásmico y aumentan la permeabilidad celular, con el consiguiente incremento de la contracción cardíaca.

En años recientes, la cafeína ha despertado mayor interés debido a la proliferación en el mercado de nuevos productos que la contienen, además de que se ha revalorado a las fuentes naturales que la contienen: como el café. Es por ello que resultó importante determinar cuantitativamente la cantidad de cafeína que tienen los granos de café verde y tostado. La determinación de cafeína se realizó por espectrometría UV y por el sistema FIA acoplado en línea la retención y la extracción; en ambos casos se midió la cafeína a 276 nm.

Para la extracción de polifenoles totales y cafeína se utilizaron disolventes polares. En este trabajo, inicialmente, se evaluaron dos métodos de extracción en café siendo el mejor cuando se utilizó como extractante metanol:agua (7:3) durante 10 minutos.

Se optimizaron algunos parámetros para aumentar la eficiencia de extracción y evitar interferencias.

OBJETIVOS**OBJETIVOS GENERALES:**

- Determinar el contenido de polifenoles totales y cafeína en café verde y tostado de la variedad arábica.
- Obtener un método rápido y eficiente que permita cuantificar polifenoles totales y cafeína en un mismo extracto de café.
- Determinar el contenido de cafeína acoplado la retención y la extracción a un Sistema de Análisis por inyección en Flujo (FIA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles y cafeína en café verde y tostado.
- Optimizar los parámetros de extracción: cantidad de muestra, extractante y tiempo de extracción, etc.
- Determinar las condiciones óptimas para cuantificar a los polifenoles en las muestras de café utilizando un sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA): volumen de inyección, caudal y longitud del reactor.
- Determinar las condiciones óptimas para cuantificar cafeína en las muestras de café utilizando un sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA): volumen de inyección, caudal, longitud de la mini-columna de C₁₈, tiempo de retención y de elución, etc.
- Elaborar las curvas de calibración para cuantificar polifenoles totales y cafeína.
- Determinar la precisión, el límite de detección e intervalo lineal de los métodos de cuantificación desarrollados.

I. ANTECEDENTES

1.1 EL CAFÉ



1.1.1 Generalidades

El nombre de café se deriva de la palabra árabe *Qahwah* que significa “estimulante”. De allí pasó a la pronunciación turca *kahveh* (Caua). El término se extendió gracias a este vocablo turco el cual sirvió de raíz (café en francés, español y portugués, coffee en inglés, caffè en italiano, Kave en húngaro, Kia Fey en Chino, etcétera).

Con el nombre de café (café en grano) se designan las semillas de las plantas del género *Coffea* desprovistas por completo de sus vainas y de sus tegumentos, en estado crudo (café crudo) o tostado (café tostado), enteras o molidas; también se llama café a la bebida preparada con estas semillas (Belitz *et al.*, 2004).

El café nace en África (Etiopía, Abisinia). Se difundió por Arabia y Constantinopla hasta Venecia, extendiéndose por Europa desde mediados del siglo XVII. Arabia y las zonas cercanas permanecieron como las únicas fuentes de abastecimiento para el café hasta 1658, cuando los holandeses introdujeron el *Coffea arabica* a Ceilán y a Java en 1699. Unos veinte años después de establecerse en Java, los embarques de *Coffea arabica*, vía París, a la Martinica y otros países, proporcionaron el núcleo para que el café arábigo se extendiera en casi todas las plantaciones actuales del Nuevo Mundo.

El café pertenece a la familia de las rubiáceas, en las que se incluyen más de 500 géneros y alrededor de 800 especies, de las cuales 66 pertenecen al género *Coffea* L., descrito por Linneo en 1753. De todas las especies, solamente se cultivan 10, y dos de ellas han sido descritas como las más importantes por corresponder a más del

90 % de la producción mundial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (*Robusta*). La denominación Robusta hace referencia a que esta especie es menos exigente en cuanto a condiciones de cultivo (altitud, temperatura, etc.) (Astiasarán *et al.*, 2000).

El café arábica se cultiva en América central, Sudamérica y en países africanos como Etiopía, Tanzania y Kenia; el resto de los países africanos y el Sureste asiático cultiva casi exclusivamente Robusta. Brasil es el mayor productor mundial de café arábica e Indonesia el mayor productor de café Robusta (Astiasarán *et al.*, 2000).

Según la especie, alcanza alturas de 3-12 m. Para facilitar la recolección, se suele dirigir su desarrollo de manera que adopte la forma de arbusto de 2-2.25 m. Tiene hojas correosas perennes y peciolo corto; sus flores son blancas, de olor parecido al jazmín y a partir de ellas se forman frutos en drupa semejantes a cerezas, de 1.5 cm de diámetro aproximado.

La superficie del fruto al principio es verde, se colorea luego de rojo o violeta al madurar y contiene en su pulpa dulce (mesocarpio) dos semillas que contactan por su cara lisa. Exhiben un surco, están envueltas por una membrana amarillenta, transparente y sólidamente adherida (tegumento) y luego recubiertas por una capa córnea o apergaminada que es el endocarpio, bien desarrollado. A veces (10–15 % de casos aproximadamente) sólo se encuentra en el fruto una semilla en forma de alubia redondeada, con aspecto de cilindro, que en el comercio recibe el nombre de café perlado o caracolillo (Belitz *et al.*, 2004).

En la figura 1 se muestra la estructura del fruto y grano de café.

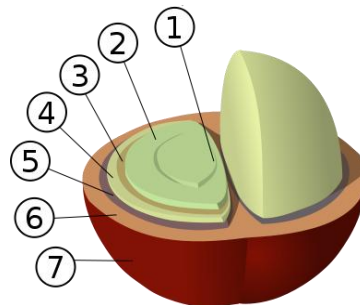


Figura 1. Estructura del fruto y grano de café: 1. Corte central, 2. Grano de café, 3. Piel plateada (tegumento), 4. Pergamino (endocarpio), 5. Capa de pectina, 6. Pulpa (mesocarpio), 7. Piel exterior (epicarpio).

El café se desarrolla en los territorios tropicales de mediana altitud (temperaturas medias anuales entre 15 y 25 °C, 600–1200 m sobre el nivel del mar y clima no

demasiado húmedo y umbroso). El arbusto inicia la floración de los 3-4 años, proporciona buenas cosechas pasado el sexto año y alcanza su producción máxima al cabo de 10-15 años. La maduración de los frutos tiene lugar 8-12 meses después de la floración.

1.2 Café Verde o Crudo

El café crudo es de color claro, generalmente entre verde amarillento, verde grisáceo o verde azulado.

1.2.1 Especies y Variedades

Existen principalmente, cuatro especies que se cultivan ampliamente y constituyen los cafés del comercio: café arábico (*Coffea arabica*), café robusta (*Coffea canephora*), café liberiano (*Coffea liberica*), y el café excelso (*Coffea excelsa*); además, existe una gran cantidad de otras especies llamadas económicas, que se plantan en escala local y normalmente no entran a los canales comerciales (Belitz *et al.*, 2004).

Las variedades más importantes de la especie *Coffea arabica* son la *typica*, *bourbon*, *maragogips* y *mocca*; de la *Coffea canephora*, las variedades *robusta*, *typica*, *Uganda* y *quillón*. Todas las variedades de *Coffea canephora* se presentan como de la variedad *robusta* en el mercado.

Importantes productores de café *arabica* lavado son: Kenia, Tanzania, Colombia, Salvador, Guatemala y México. *Arabica* sin lavar son el café suave (<<mild>>) de Santos y el fuerte de Río y de Bahía, todos éstos de Brasil. La mayoría de los *robusta* sin lavar son de Angola, Uganda, Costa de Marfil y Madagascar (Belitz *et al.*, 2004).

La clasificación del café crudo se realiza de acuerdo al tamaño, color, forma, consistencia y corte de los granos. Los granos con defectos se retiran cuidadosamente, porque alteran el sabor y perjudican el aspecto del café. Se trata sobre todo de semillas inmaduras, que durante el tostado se tornan pálidas; de granos excesivamente fermentados, cuyo deficiente sabor es promovido por ácido acético, acetoína, diacetilo, butanol e isobutanol que contienen las semillas congeladas y verdes; granos dañados por la lluvia o los insectos, así como granos resacos. Uno sólo de estos granos altera todo un extracto de café. Otros defectos en el café son

sobre todo los productos enmohecidos (insuficientemente desecados, granos secados demasiado pronto, desecados sobre hierba) y terrosos. Los cafés de zonas altas en general son más apreciados que los de tierras bajas.

1.2.2 Recolección

En el hemisferio norte, la recolección se efectúa entre los meses de diciembre y febrero, mientras que al sur del ecuador se lleva a cabo en los meses de mayo y agosto. Los frutos se recolectan a mano y se amontonan en el suelo, posteriormente se elimina la pulpa.

1.2.3 Procesamiento

Los granos de café recién recogidos se procesan, ya sea mediante la preparación seca o mediante la preparación húmeda.

1.2.4 Preparación Seca

En la preparación seca, que es la practicada casi exclusivamente en Brasil, los frutos recién recolectados se llevan a terrazas de desecación, en las que se extienden y se dejan secar al sol hasta que las semillas se desprenden de la cáscara y hacen ruido dentro de ésta.

Con máquinas descascarilladoras (tornillos sinfín cónicos) se retiran tanto la pulpa desecada como el endocarpio y el tegumento. El café descascarillado y limpio se clasifica y se envasa en sacos de 60 kg. Frecuentemente, los frutos frescos se apilan en montones, en los que se dejan fermentar durante 3-4 días por autocalentamiento, tratándose después en la forma descrita anteriormente. En ambos casos se obtiene café sin lavar (Belitz *et al.*, 2004).

1.2.5 Preparación Húmeda

La preparación húmeda es más cara y moderna, es muy utilizada en América Central, Colombia y África.

En este método los frutos se llevan al despulpador, que, mediante un sistema de discos y rodillos graduables de superficie áspera, elimina la pulpa por compresión sin dañar las semillas. La pulpa sirve como abono. Las semillas obtenidas todavía contienen, además del endocarpio y el tegumento, una considerable cantidad de

pulpa. Se dejan fermentar de 12-48 horas en tinajas de fermentación por las que pasa una corriente de agua, con cuyo procedimiento se afloja y descompone a la pulpa residual bajo la acción de las enzimas pectinolíticas propias del café y, en ocasiones, con la participación de microorganismos, pudiendo eliminarse después fácilmente por lavado. Las semillas se pasan por tamices y se colocan en suelos de cemento, en los que se secan al sol; en ocasiones se utiliza aire caliente de 65-85 °C, aún se conserva al endocarpio (café con cáscara, café pergamino), por lo que, como en el tratamiento en seco, tienen que pasarse por máquinas descascarilladoras. Este método proporciona las clases de café lavado (<<milds>>).

Los granos más valiosos se pulen con frecuencia para la completa eliminación del tegumento y el abrillantado de la superficie (Belitz *et al.*, 2004).

1.3 Café Tostado

1.3.1 Tecnología de Tueste

Una vez desprovisto de todas sus envolturas, el café verde está listo para ser tostado. Es el proceso más importante que sufrirá el café y de él dependerán muchas de sus cualidades (Astiasarán *et al.*, 2000).

Los granos verdes se tuestan con calor de 180-230 °C durante 15-20 minutos (Kirk, 1996), produciéndose diversas transformaciones en los granos de café. Hay aumento de volumen (50-80 %), modificaciones estructurales y del color, disminución del peso (mermas por tostado, 13-20 %) y especialmente el aroma típico que no existe en los granos verdes o crudos (aroma y sabor <<a tostado>>). Simultáneamente disminuye el peso específico desde 1.126-1.272 hasta 0.570-0.694. Los granos crudos son correosos, duros y difícilmente fragmentables, pero con el tostado se hacen quebradizos y blandos (Belitz *et al.*, 2004).

En el proceso de tostado se distinguen cuatro fases principales: desecación, crecimiento, disgregación y tostado completo. Los primeros cambios se presentan a 50 °C en las capas tisulares; la proteína se coagula y el agua se evapora. Por encima de los 100 °C los granos se pardean debido a la descomposición térmica y la pirolisis de los compuestos orgánicos acompañada de destilación seca. Aproximadamente a los 150 °C aparecen productos gaseosos (vapor de agua, CO₂, CO), por lo que el

volumen del grano se duplica. De 180-250 °C se inicia la fase de descomposición, caracterizada por el estallido de los granos (rotura del surco de la semilla con ruidos de crepitación y formación de grietas), producción de humo azulado y aparición del aroma del café. Posteriormente, se alcanza un tostado completo con óptima caramelización, el contenido de agua desciende hasta 1.5-3.5 %.

El proceso de tostado depende básicamente de la naturaleza del café, de la temperatura, del tiempo y de la cinética de transferencia de calor. Se pueden definir cuatro grados de tueste: ligero, medio, oscuro y muy oscuro. Dependiendo del país consumidor, se tendrá en cuenta un tipo de tueste u otro. El grado de tueste se busca de acuerdo con el color del grano. Cuanto más claro sea el color, menor será el grado de tueste, y el sabor resultará más suave, más ácido, con menos cuerpo y menos amargo. Por el contrario, cuanto más oscuro sea, estará más tostado, tendrá más cuerpo y el sabor será más fuerte, más amargo y menos ácido (Astiasarán *et al.*, 2000).

El tostado del café se debe realizar con cuidado para lograr un tostado uniforme y una óptima producción del aroma, evitando con ello, un tostado excesivo y quemado del café.

1.3.2 Tostado por Contacto

La transmisión del calor en el tostado se realiza por contacto de los granos con las paredes del tostador o por el aire caliente o gases de combustión (convección). El tostado por contacto tiene poca importancia en la actualidad, debido a la desigual transmisión del calor y a los largos tiempos de tostado que son necesarios (20-40 min).

1.3.3 Tostado por Contacto-Convección

En el método de tostado por contacto-convección (tiempo de tostado: 6-15 min) se pretende aumentar la acción de convección. Se suele trabajar con tostadoras centrífugas (recipientes lisos rotatorios), de cilindro giratorio, de lecho turbulento (aproximadamente 90 % de convección). El funcionamiento se hace por cargas o también de forma continua. En los nuevos métodos de tostado rápido (2 a 5 min) se mejora la transmisión del calor.

La evaporación de agua que esto produce ocasiona un aumento de volumen de los granos mucho más rápido que el registrado en el sistema tradicional.

El tostado se controla extrayendo muestras o bien por procedimiento electrónico; el producto terminado se lleva con la mayor rapidez posible a tamices o canales de enfriamiento, con objeto de impedir que el café se tueste en exceso, se quemé o pierda el aroma.

1.3.4 Almacenamiento y Envasado

El café tostado se selecciona a mano en mesas especiales para ello, en donde se separan los granos defectuosos. En los grandes establecimientos tostadores se efectúa por procedimiento fotoeléctrico completamente automático. El café tostado comercial es una mezcla de cafés de diferente procedencia, los cuales se tuestan por separado. Con el nombre de <<moca>> se designan a las mezclas particularmente fuertes.

El café tostado de los envases comerciales ordinarios conserva su frescura de 8-10 semanas. El aroma de tostado disminuye al envejecer el café. El café molido envasado fuera del contacto del aire se conserva durante 6-8 meses, pierde sus mejores cualidades de 1-2 semanas una vez abierto el envase. El proceso de envejecimiento, sobre cuya naturaleza química todavía se sabe poco, se retrasa conservando el café tostado a temperatura lo más baja posible y fuera del contacto del oxígeno y vapor de agua (Belitz *et al.*, 2004).

1.4 Café Descafeinado

Para evitar los efectos fisiológicos de la cafeína, no tolerada por todas las personas, se han desarrollado métodos para sustraer al café la mayor parte de su cafeína. La primera técnica de aplicación industrial data en 1908 y fue creada por Roselius en Bremen (Belitz *et al.*, 2004).

Los cafés descafeinados se fabrican del siguiente modo: los granos verdes (no tostados) se ablandan primero con vapor de agua a presión. Los granos embebidos se someten a extracción, sin dejar de remover, para la separación selectiva de la cafeína con diversos disolventes (por ejemplo: diclorometano, ésteres del ácido acético, benceno, cloroformo y alcohol); a continuación se secan los granos descafeinados por

evaporación del disolvente. Los granos todavía húmedos se acaban de secar al vacío o con aire caliente. Los granos extraídos se tuestan luego, se mezclan, se trituran y se envasan de la misma manera que el café ordinario.

El producto resultante contiene de 0.07 a 0.30 % de cafeína frente a 1.2 % que suelen contener los cafés ordinarios (Hart *et al.*, 1991).

La cafeína obtenida a partir del café descafeinado, se emplea en las industrias farmacéuticas y de bebidas, en donde también se usa cafeína sintética, que se prepara mediante metilación de la xantina elaborada a partir de ácido úrico y formamida (Belitz *et al.*, 2004).

1.5 El Mercado Mundial del Café

El café es uno de los principales productos agrícolas que se comercializan en el mercado mundial, llegando a generar ingresos anuales superiores a los 15 millones de dólares para los países exportadores y dando ocupación directa e indirecta a poco más de 20 millones de personas dedicadas al cultivo, transformación, procesamiento y comercialización del producto en todo el mundo.

La producción mundial de café se integra por tres tipos básicos: los suaves, los arábicos – brasileños, y los robusta, el tercer tipo lo integran los menos cotizados en el mercado tanto por su calidad como por su precio.

Existen más de 80 países productores de café, 13 de ellos producen más del 80% del volumen mundial. Siete de esos países son americanos, tres asiáticos y tres africanos. Los dos productores más importantes (Brasil y Colombia) participaron con casi 36% de la producción mundial en el ciclo 1999 – 2000 y considerando a los dos siguientes productores en importancia (Indonesia y Vietnam), llegan a casi la mitad del producto cafetalero mundial. México ocupó el quinto lugar en la producción de café en el ciclo 1999 – 2000 con más de 6 millones 192 mil sacos, participando con el 5.7% de la producción mundial (Cámara de Diputados, 2001).

Brasil tiene gran influencia en el mercado mundial de café, los movimientos de la producción se explican fundamentalmente por las variaciones particulares de la producción cafetalera brasileña.

India, Costa de Marfil, Etiopía, Uganda y Guatemala ocupan del sexto al décimo lugar en la producción de este producto.

1.6 El Café en México

México produce cafés de excelentes calidades, ya que su topografía, altura, climas y suelos le permiten cultivar y producir variedades clasificadas dentro de las mejores del mundo.

El café se produce sobre una superficie de 761 mil hectáreas en doce estados de la República Mexicana, situados en la parte centro-sur del país. Estos estados son: Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz. El sistema de cultivo del café se hace bajo sombra. En la figura 2 se encuentran localizados los estados productores de café en México.



Figura 2. Estados productores de café en la República Mexicana.

En México, Chiapas es el primer productor de café con una participación de 34.8%, Veracruz con 25.2%, Oaxaca y Puebla con un 28%, por lo que 4 estados aportan el 88 % de la producción total nacional.

Las especies de arbusto del cafeto que se cultivan en el país son dos: la arábica, árabe o arábica y la robusta o *canephora*. Aproximadamente el 98% de los cafetos son variedades arábicas.

La variedad arábica se clasifica como un café “suave”. El café Typica predominaba en México hasta hace poco; sin embargo, actualmente se le está reemplazando por variedades de porte bajo y mayor producción como la Catimor y Catuai. Las

variedades Coatepec, Pluma Hidalgo, Jaltenango, Marago y Natural de Atoyac, entre otras, destacan por su calidad. Cada variedad posee diferencias de calidad, volumen producido, rendimiento, aroma, acidez, resistencia a las plagas y a las enfermedades, etc.

México es el primer productor de café orgánico, y uno de los primeros en cafés “Gourmet”.

El 83% de la producción nacional de café se exporta y únicamente el 17% restante se destina al mercado doméstico.

La producción del café involucra a más de 282 mil productores entre los cuales se encuentran en una mayoría minifundistas e indígenas, agrupados en organizaciones de carácter local y regional.

1.7 Enfermedades del Café

Una de las enfermedades más comunes es la roya del cafeto, que ingresó en el país en 1981, producida por el hongo *Hemileia vastratix*. Los ataques se producen en épocas de lluvias ligeras y en el corto periodo de buen tiempo. La espora de este hongo es muy resistente y puede transportarse por corrientes de aire o adherirse a cualquier objeto, teniendo una germinación, en condiciones ideales, de sólo tres horas.

La broca del grano es un diminuto escarabajo negro que penetra la cereza del cafeto y se aloja dentro de la semilla, dejándola inservible y con un aspecto negruzco. Esta plaga entró a Chiapas en 1979, y al igual que la roya, proviene de Centroamérica.

Otro factor que daña a los cafetales es el clima adverso. La falta de agua puede causar la muerte del cafeto, situación que se presenta en las zonas con tierra de poca profundidad. Un clima seco en el tiempo de floración del arbusto, provoca que las flores se marchiten sin lograr polinizarse, lo que mantiene vivo el arbusto pero sin ninguna producción para ese año. Puede darse el caso de que sí se fecunden las flores, pero la falta de agua produce granos excesivamente pequeños que disminuyen el rendimiento por tonelada del café cereza.

1.8 Composición Química del Café Verde

La composición química del café verde o crudo depende de su clase, origen, obtención e influencias climáticas (Belitz *et al.*, 2004). En la tabla 1 se muestra la composición química del café verde arábigo y del café verde robusta.

Componentes	<i>Coffea arabica</i> (Café arábigo) (% materia seca)	<i>Coffea canephora</i> (Café robusta) (% materia seca)
Cafeína	0.9 - 1.2	1.6 - 2.4
Minerales	3.0 - 4.2	4.0 - 4.5
Lípidos	12.0 - 18.0	9.0 - 13.0
Trigonelina	1.0 - 1.2	0.6 - 0.75
Proteínas	11.0 - 13.0	11.0 - 13.0
Ácidos alifáticos	1.5 - 2.0	1.5 - 2.0
Ácidos clorogénicos	5.5 - 8.0	7.0 - 10.0
Oligosacáridos	6.8 - 8.0	5.0 - 7.0
Polisacáridos	50.0 - 55.0	37.0 - 47.0

Tabla 1. Composición química del café verde para las dos especies botánicas principales (Petracco, 2005).

1.9 Compuestos Fenólicos

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza (Faller *et al.*, 2010). Todos ellos poseen una estructura química común: un anillo fenol (un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo).

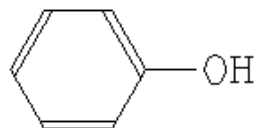


Figura 3. Estructura química del fenol.

1.9.1 Polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura química dos o más grupos fenólicos.

Los polifenoles (antioxidantes naturales) son compuestos químicos de tipo fenólico que juegan un papel importante en la defensa de la planta contra microorganismos, e insectos, ayudando a preservar su integridad continuamente amenazada por la exposición a factores ambientales (radiaciones ultravioleta y altas temperaturas).

Los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos, ésteres fenólicos (en el café) y flavonoides.

Los polifenoles están conformados por una gran familia de compuestos naturales ampliamente distribuidos en alimentos vegetales. Las fuentes de polifenoles incluyen frutas (frutos cítricos, manzanas, uvas, fresas, cerezas, peras, frambuesas y mangos), verduras (tomates, pimentones, cebollas, brócoli, lechuga, papas, jicama, zanahoria, espárrago y aceitunas), también están presentes en el aceite de oliva, centeno, avena, salvado de trigo, cebada, arroz, semillas de mostaza, té, vino, chocolate negro y café. (Amarowicz *et al.*, 2009).

Los niveles de estos compuestos pueden variar considerablemente dentro de la misma especie, e incluso entre sus variedades, debido a factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos. (Ferrer, 2008).

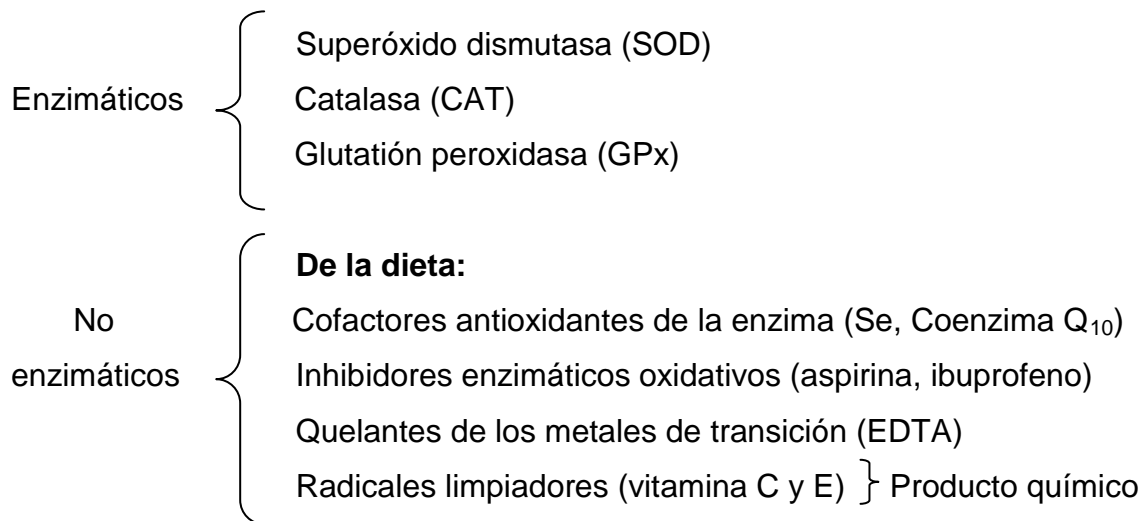
Antiguamente, algunos investigadores consideraban a los polifenoles como antinutrientes porque tenían la peculiaridad de precipitar macromoléculas como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, reduciendo la digestibilidad de algunos alimentos.

Sin embargo, en la década de los 90's aumentó el interés por los polifenoles debido a sus posibles efectos beneficiosos para la salud.

Los polifenoles son agentes antioxidantes que ayudan a combatir los radicales libres y nos ayudan a hacer frente al estrés oxidativo. Las vitaminas C, E y los carotenoides también presentan propiedades antioxidantes.

1.10 Radicales Libres

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en el último orbital, lo que los hace altamente reactivos pues tienden ya sea a donar ese electrón a alguna molécula vecina o bien a remover un electrón de otra molécula para que su último orbital quede completo. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente dañinos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Y están regulados por mecanismos biológicos enzimáticos y no enzimáticos (Huang et al., 2005). A continuación se presentan los dos mecanismos de regulación:



Los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos.

En mamífero son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo

frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello *et al.*, 2006).

El oxígeno es capaz de generar dos tipos de especies químicas reactivas, que son muy perjudiciales para los seres vivos. En la tabla 2 se muestran éstas especies.

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS)
Radical superóxido (O_2^-)* Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Radical hidroxilo (OH^*)	Óxido nítrico (NO^*) Trióxido de nitrógeno (N_2O_3) Peroxinitrito (NO_3^-) Nitrito (NO_2^-) Ácido peroxinitroso (HNO_3) Dióxido de nitrógeno (NO_2^*)
*(=Radical libre)	

Tabla 2. Radicales libres.

La ingesta de antioxidantes alimenticios potencia la protección contra dichos radicales libres. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción de los radicales libres, producidos principalmente por el paso del tiempo, la exposición a la radiación solar, infecciones, contaminación ambiental y estrés, pueden dañar nuestras células y generar mutaciones, facilitando el desarrollo de enfermedades degenerativas asociadas a la oxidación. Los antioxidantes pueden ser de gran ayuda

para mejorar la calidad de vida, ya que ayudan a retrasar el envejecimiento de las células y protegen de las mutaciones celulares.

El café es una fuente importante de antioxidantes dietéticos principalmente polifenoles conocidos también como ácidos clorogénicos (CGAs) (Nutri Pro, 2010).

1.11 Ácidos Clorogénicos (CGAs)

Los ácidos clorogénicos (CGAs) son una familia de ésteres, formada entre el ácido quínico y ciertos ácidos trans-cinámicos (los más comunes son el ácido cafeico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico) (Clifford, 2000; Clifford *et al.*, 2006). Cuyas estructuras químicas se muestran en la siguiente figura.

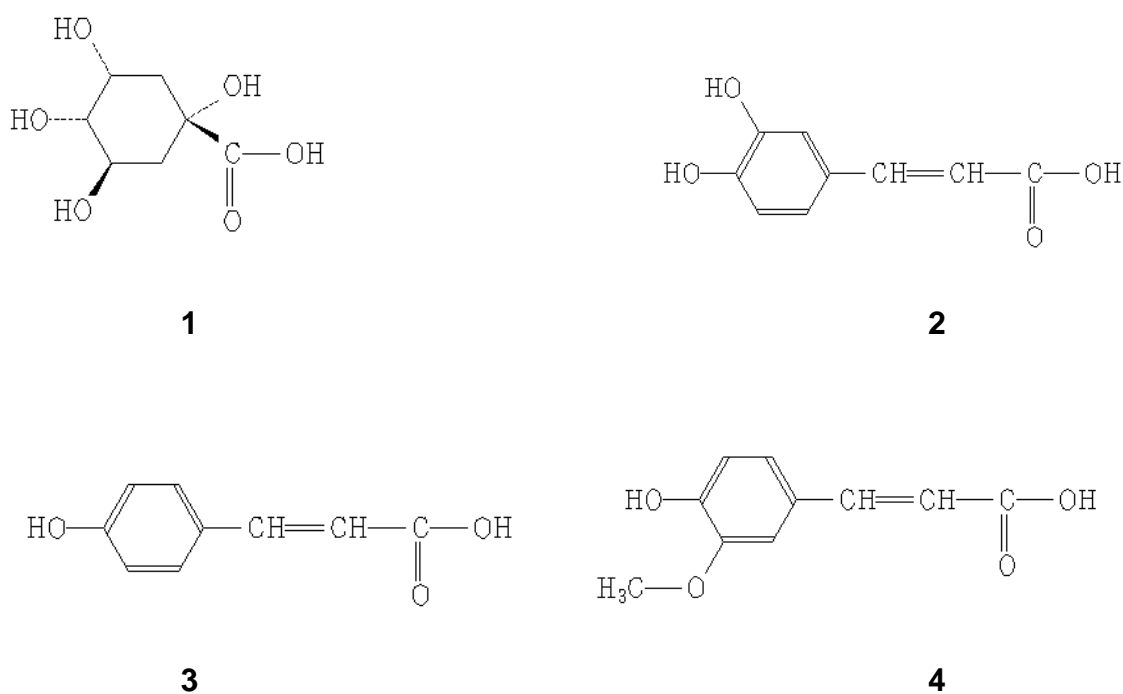


Figura 4. Estructuras químicas del 1) ácido quínico, y de los ácidos trans-cinámicos 2) ácido cafeico, 3) ácido p-cumárico y 4) ácido ferúlico.

En el sistema IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) el ácido (-)-quínico es definido como ácido 1L-1(OH)-3,4/5-tetrahidroxíciclohexanocarboxílico (Clifford *et al.*, 2006; Clifford *et al.*, 2006).

Los primeros estudios de los CGAs se realizaron en granos de café verde y los resultados obtenidos fueron divulgados por Robiquet y Boutron en 1837 (Clifford, 1999; Chin *et al.*, 1997).

Los CGAs se encuentran en las plantas como metabolitos secundarios y se asocian frecuentemente como protectores contra los ataques de insectos y microorganismos (Astiasarán *et al.*, 2000).

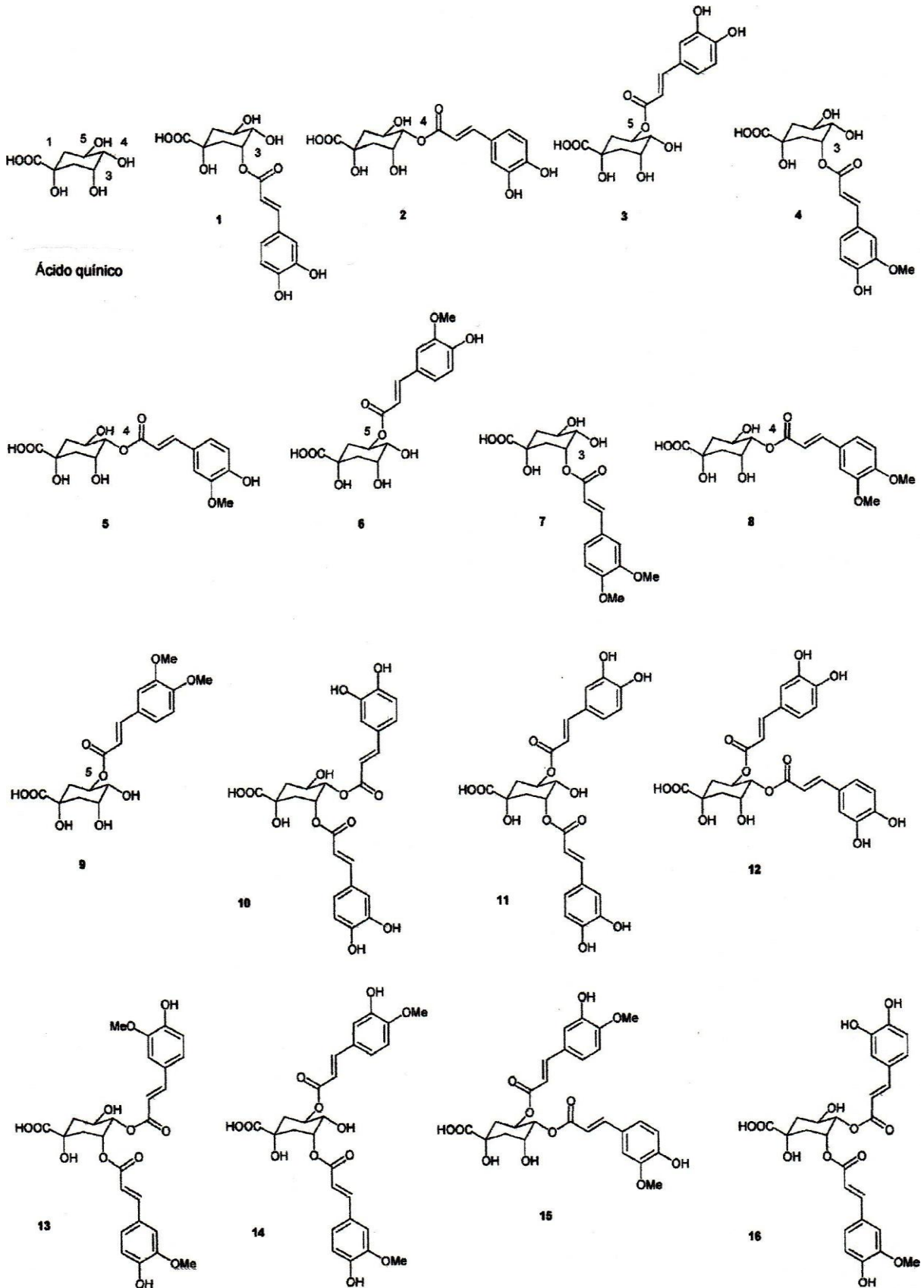
1.11.1 Ácidos Clorogénicos (CGAs) del Café Verde

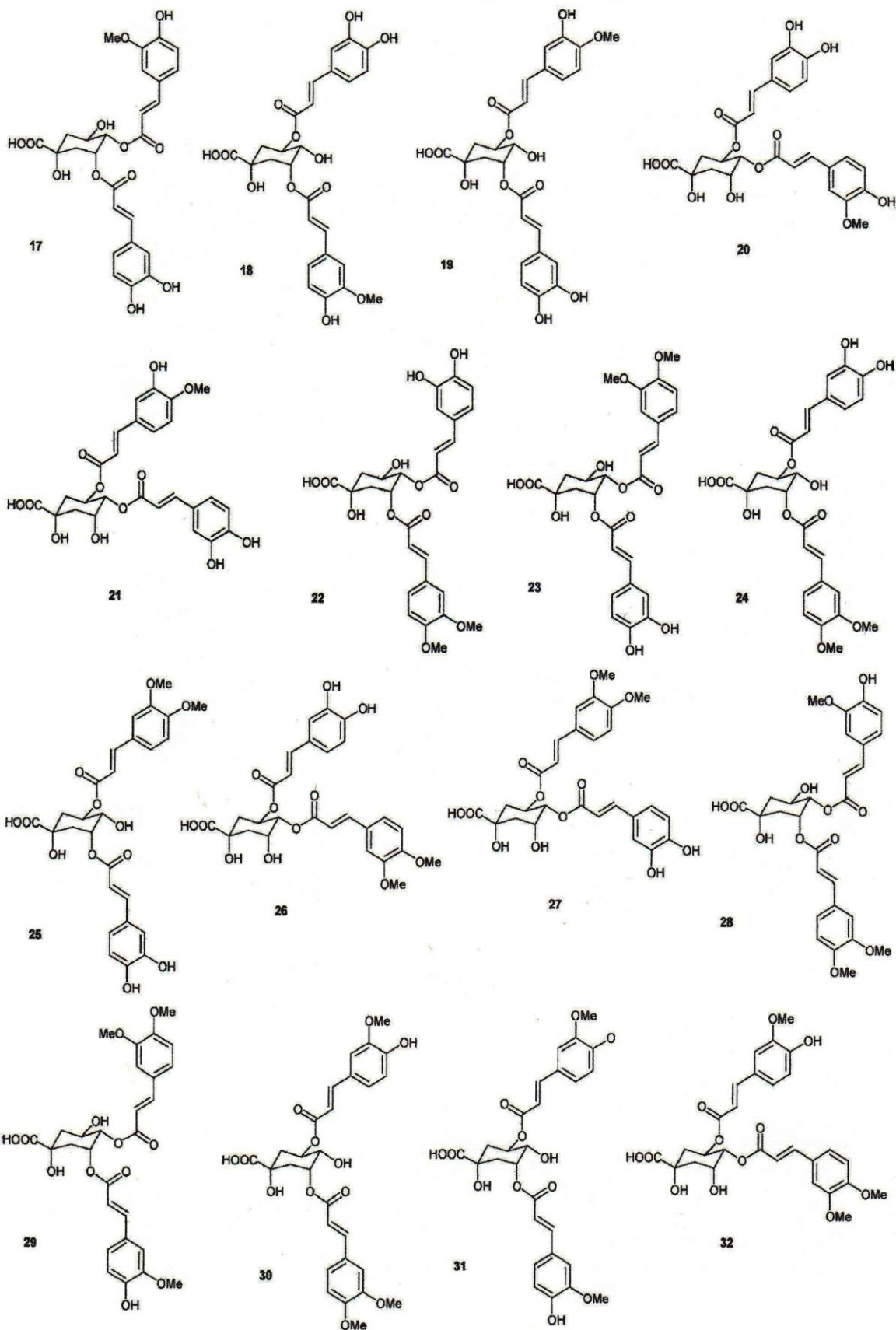
Los ácidos cuantitativamente más importantes del café son los ácidos clorogénicos (CGAs). Están presentes en gran cantidad en el grano de café verde, en forma de sales de potasio, en igual porcentaje que la cafeína 1:1; su contenido varía entre el 6 y 7 % en los cafés Arábica y es del 10 % en los Robusta, incrementándose en la maduración y decreciendo en la germinación (Astiasarán *et al.*, 2000). El contenido de estos ácidos es mucho mayor en el grano que en el resto de la planta.

La cantidad de CGAs varía con el grado de maduración, la especie y otros factores asociados a la calidad del café, tal como la altura y la presencia o ausencia de sombra e inclusive se les relaciona a la resistencia a algunas enfermedades (Solís *et al.*, 2005).

Los subgrupos principales de los CGAs son los ácidos cafeoilquínicos (ACQs), ácidos dicafeoilquínicos (diCQAs), ácidos feruloilquínicos (FQAs) y ácidos p-cumaroilquínicos (pCoQAs) (Farah, 2005).

Se han identificado alrededor de treinta CGAs en los granos de café verde Arábica y Robusta. Éstos se pueden subdividir en nueve clases, tres ácidos cafeoilquínicos, tres ácidos p-cumaroilquínicos, tres ácidos dimetoxicinamoilquínicos, tres ácidos feruloilquínicos, tres ácidos dicafeoilquínicos, tres ácidos diferuloilquínicos, seis ácidos cafeoil-feruloilquínicos, tres ácidos cafeoil-dimetoxicinamoilquínicos, y tres ácidos feruloil-dimetoxicinamoilquínicos (Clifford *et al.*, 2006). Cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 5.





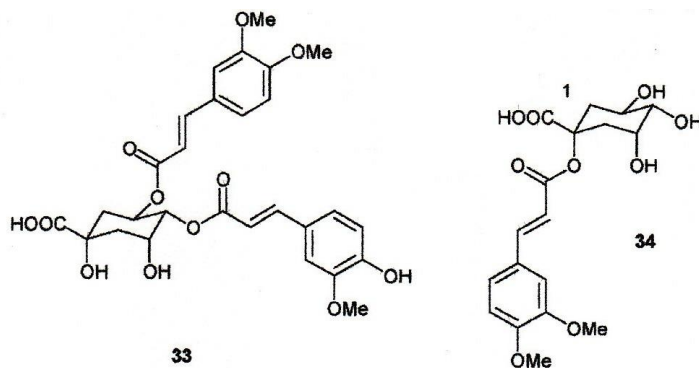


Figura 5. Estructuras químicas de los CGAs identificados en café verde Arábica y Robusta (Clifford *et al.*, 2006).

Notas de Figura 5					
Nombre y Abreviación	Número	R ₁	R ₃	R ₄	R ₅
Ácido 3-O-cafeoilquínico	1	H	C	H	H
Ácido 4-O-cafeoilquínico	2	H	H	C	H
Ácido 5-O-cafeoilquínico	3	H	H	H	C
Ácido 3-O-feruloilquínico	4	H	F	H	H
Ácido 4-O-feruloilquínico	5	H	H	F	H
Ácido 5-O-feruloilquínico	6	H	H	H	F
Ácido 3-O-dimetoxicinamoilquínico	7	H	D	H	H
Ácido 4-O-dimetoxicinamoilquínico	8	H	F	D	H
Ácido 5-O-dimetoxicinamoilquínico	9	H	F	H	D
Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	10	H	C	C	H
Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	11	H	C	H	C
Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico	12	H	H	C	C
Ácido 3,4-di-O-feruloilquínico	13	H	F	F	H
Ácido 3,5-di-O-feruloilquínico	14	H	F	C	F
Ácido 4,5-di-O-feruloilquínico	15	H	H	F	F
Ácido 3-O-feruloil, 4-O-cafeoilquínico	16	H	F	C	H
Ácido 3-O-cafeoil, 4-O-feruloilquínico	17	H	C	F	H
Ácido 3-O-feruloil, 5-O-cafeoilquínico	18	H	F	H	C
Ácido 3-O-cafeoil, 5-O-feruloilquínico	19	H	C	H	F
Ácido 4-O-feruloil, 5-O-cafeoilquínico	20	H	H	F	C
Ácido 4-O-cafeoil, 5-O-feruloilquínico	21	H	H	C	F
Ácido 3-O-dimetoxicanamoil, 4-O-cafeoilquínico	22	H	D	C	H
Ácido 3-O-cafeoil, 4-O-dimetoxicinamoilquínico	23	H	C	D	H
Ácido 3-O-dimetoxicinamoil, 5-O-cafeoilquínico	24	H	D	H	C
Ácido 3-O-cafeoil, 5-O-dimetoxicinamoilquínico	25	H	C	H	D
Ácido 4-O-dimetoxicinamoil, 5-O-cafeoilquínico	26	H	H	D	C

Ácido 4-O-cafeoil, 5-O-dimetoxicinamoilquínico	27	H	H	C	D
Ácido 3-O-dimetoxicinamoil, 4-O-feruloilquínico	28	H	D	F	H
Ácido 3-O-feruloil, 4-O-dimetoxicinamoilquínico	29	H	F	D	H
Ácido 3-O-dimetoxicinamoil, 5-O-feruloilquínico	30	H	D	H	F
Ácido 3-O-feruloil, 5-O-dimetoxicinamoilquínico	31	H	F	H	D
Ácido 4-O-dimetoxicinamoil, 5-O-feruloilquínico	32	H	H	D	F
Ácido 4-O-feruloil, 5-O-dimetoxicinamoilquínico	33	H	H	F	D
Ácido 1-O-feruloil, 5-O-dimetoxicinamoilquínico	34	D	H	H	H
C = cafeoil; D = dimetoxicinamoil; F = feruloil; H = hidrógeno					

Tabla 3. Nombres de los CGAs identificados en el grano de café verde Arábica y Robusta (Clifford *et al.*, 2006).

La relación entre el contenido de los ácidos 3, 4 y 5 cafeoilquínicos (monoclorogénicos) (que aumenta con la maduración) y los ácidos 5-feruloilquínicos 3,4, 3,5 y 4,5-dicafeoilquínicos (que permanece prácticamente constante), se ha propuesto como un indicador del estado de maduración del grano.

El ácido clorogénico (CGA) más común, más abundante en el café y más disponible comercialmente es el ácido 5-O-cafeoilquínico, también conocido como ácido 3-cafeoilquínico, es un éster formado entre el ácido quínico y el ácido cafeico (Clifford, 2000; Nogueira *et al.*, 2007). Su estructura se muestra en la siguiente figura.

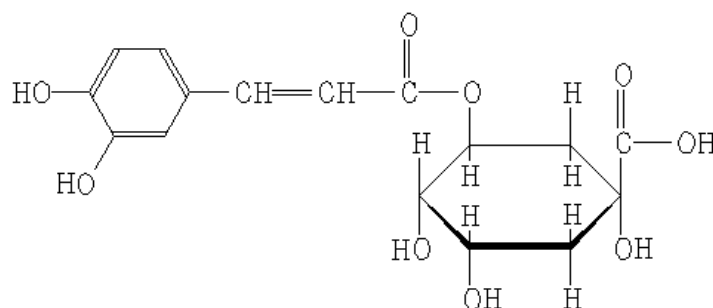


Figura 6. Estructura química del ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico).

1.11.2 Propiedades Físicas y Químicas del CGA

El CGA es conocido también como ácido 3-cafeoilquínico ó como ácido 3-(3,4-dihidroxicinamoil) quínico, su fórmula molecular es $C_{16}H_{18}O_9$, tiene un PM de 354.31

g/mol, un pKa de 2.66 a 27 °C, un punto de fusión de 207 - 209 °C y una absorción en UV de 300 - 330 nm. Físicamente son cristales de color crema, solubles en agua, alcohol, acetona y muy poco soluble en acetato de etilo (The Merck Index, 2001).

1.11.3 Ácidos Clorogénicos (CGAs) del Café Tostado

Los CGAs se degradan mucho durante el tueste. En el tostado normal se degradan en un 30 % aproximadamente y en el tostado intenso en un 70 % (Belitz *et al.*, 2004). La degradación de los CGAs contribuye a la formación de productos complejos y es un indicativo del grado de tueste (Astiasarán *et al.*, 2000).

Durante el tostado del café, se lleva a cabo la reacción de Maillard conocida también como “reacción de pardeamiento no enzimático” que se presenta entre las proteínas y los azúcares reductores al calentarse. Con la reacción de Maillard se forman nuevos compuestos llamados melanoidinas, las cuales le confieren al café el color, aroma y sabor característico.

En la tabla 4 se expresa la cantidad en que están presentes los diversos isómeros. Además hay en pequeña cantidad ácido cafeico y ácido ferúlico libres, así como ésteres de los ácidos ferúlicos y cumáricos con el ácido quínico.

Compuesto	Cantidad (%)
Ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico)	2.0
Ácido 4-O-cafeoilquínico (ácido criptoclorogénico)	0.2
Ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico)	1.0
Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico a)	0.01
Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico b)	0.09
Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico c)	0.01

Tabla 4. Ácidos clorogénicos del café tostado (Belitz *et al.*, 2004).

Tanto los CGAs como la trigonelina, se han asociado con la formación del <<flavor>> y la producción de aroma en el proceso de tueste del café.

Los CGAs tienen un sabor astringente, y su degradación en los cafés muy tostados proporciona tazas más suaves. Contribuye también a la sensación de cuerpo en la taza, y proporcionan un sabor residual persistente y metálico (Astiasarán *et al.*, 2000).

Es probable asimismo la participación del CGA en las reacciones de pardeamiento, ya que en hidrolizados alcalinos de melanoidinas se ha encontrado ácido cafeico (Belitz *et al.*, 2004).

1.11.4 Actividad Antioxidante de los CGAs

Los CGAs se relacionan con la prevención de enfermedades oxidativas, debido al grupo fenol que poseen en su estructura.

Algunos estudios realizados en los CGAs del café han revelado que tienen varias características farmacológicas, tales como actividad antioxidante, capacidad de aumentar la utilización de la glucosa hepática, actividad antihipertensiva e inhibición de la mutagenicidad de los compuestos carcinogénicos (Farah *et al.*, 2005).

Evidencias epidemiológicas han establecido que el consumo regular de café en dosis moderadas puede tener efectos beneficiosos para la salud, relacionados principalmente por la ingesta de polifenoles, lo cual reduce el riesgo de ciertas enfermedades crónicas o degenerativas tales como cáncer, diabetes tipo II, inflamación y enfermedades hepáticas. Las evidencias en desarrollo también indican el posible impacto positivo del café en enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo el Parkinson y el Alzheimer (Nutri Pro, 2010; Eau *et al.*, 2000 y Farah *et al.*, 2005).

1.12 Determinación de CGAs

El contenido de polifenoles o CGAs ha sido determinado por diferentes métodos entre ellos se encuentran:

- **Método Oficial 957.05 de la AOAC para determinar CGA en café tostado e instantáneo.**

A 1 g de café tostado molido se le añaden 400 mL de agua hirviendo y se calienta a ebullición durante 15 minutos. Se enfría a temperatura ambiente y se filtra.

El mismo tratamiento se emplea para café instantáneo utilizando 0.35 g de muestra.

Se transfiere una alícuota de 10 mL del filtrado a un matraz aforado de 100 mL y se afora a este volumen con agua. Se determina la absorbancia a 324 nm.

Se transfieren otros 100 mL del extracto a un matraz aforado de 200 mL, se añaden 2 mL de disolución saturada básica de acetato de plomo y se calienta a ebullición durante 5 minutos. Se enfría a temperatura ambiente y se introduce en un baño de hielo durante una hora. Se afora el matraz a este volumen. Se calienta a temperatura ambiente y se filtra, descartando los primeros 25-50 mL. Se determina la absorbancia inmediatamente a 324 nm.

Se calcula la cantidad de CGA de acuerdo a la curva de calibración realizada previamente para ello. Primeramente, se calcula la concentración aparente de CGA en la disolución, basándose en la absorbancia en ausencia de plomo. Posteriormente, se calcula la concentración aparente en el filtrado tras el tratamiento con plomo. Se resta de la última cifra 0.00045 mg/mL para corregir los efectos de la solubilidad del clorogenato con el plomo.

Para obtener la concentración corregida se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración corregida} = C_o - \left(C_1 - \frac{0.00045}{5} \right) \quad (1)$$

- **Cromatografía de Alta Resolución por Filtración en Gel (HPGF).**

Se utiliza para determinar CGA en café verde. Para obtener el extracto se pesan 0.5 g de café y se calientan a 80 °C durante 15 minutos. El extracto se filtra y clarifica utilizando los reactivos de Carrez. La mezcla se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se filtra. El filtrado se usa en el cromatógrafo.

Para determinar los isómeros de CGA por cromatografía de fase reversa se utiliza como fase móvil citrato de sodio 0.01 M, ajustando el pH a 2.5 con ácido clorhídrico y metanol al 40 % (v/v). En este caso el CGA total es expresado por la suma de áreas individuales de los isómeros con respecto al estándar de 5-CQA por HPLC.

La absorbancia máxima de CGA es a 325 nm. Este método también se utiliza para determinar cafeína, la cual tiene una absorbancia máxima a 272 nm. La detección

simultánea se dio a 280 nm con una respuesta adecuada para ambos compuestos (Trugo *et al.*, 1991).

- **Análisis por Inyección en Flujo (FIA) basado en las reacciones redox de Jerumanis y de Folin- Ciocalteau** (Celeste *et al.*, 1992).

1.13 Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Uno de los principales progresos de la Química Analítica durante las tres últimas décadas, ha sido la aparición en el mercado de sistemas automáticos de análisis, que proporcionan datos analíticos con la mínima intervención del operador. Inicialmente, estos sistemas se diseñaron para solucionar las necesidades de los laboratorios clínicos, en los que hay que determinar, de forma rutinaria, treinta muestras o más, con fines de diagnóstico. Hoy en día estos instrumentos se utilizan en áreas tan distintas como el control de procesos industriales o las determinaciones rutinarias de distintas sustancias en agua, suelos, productos farmacéuticos y en alimentos.

Los instrumentos de este tipo tienen tres ventajas importantes. En los laboratorios en donde diariamente realizan un elevado número de análisis de rutina, mediante la automatización se puede lograr un enorme ahorro en el tiempo de análisis y en el gasto de reactivos. La segunda ventaja es la velocidad de análisis, que es significativamente mayor que la de los dispositivos manuales. Y por último, se pueden realizar análisis durante periodos prolongados de tiempo, más reproducibles de los que obtendría un operador utilizando un instrumento manual.

Los sistemas analíticos automáticos son de dos tipos: analizadores discontinuos y analizadores de flujo continuo. En un instrumento discontinuo, cada una de las muestras se mantiene como una entidad independiente, colocándose en recipientes separados durante las distintas operaciones de análisis. Por el contrario, en los sistemas de flujo continuo la muestra se va transportando desde el punto de inyección o introducción, hasta el detector y de aquí al desecho: la muestra forma parte de la corriente en la que va fluyendo y en ella van transcurriendo las diferentes operaciones unitarias.

Los métodos de inyección en flujo, en su forma actual, fueron descritos por primera vez a mediados de los años setenta por Ruzicka y Hansen en Dinamarca y

Stewart y colaboradores en Estados Unidos (Ruzicka *et al.*, 1975; Valcárcel *et al.*, 1984).

Estos métodos son una consecuencia de los métodos de flujo segmentado, muy utilizados en los laboratorios clínicos entre los años sesenta y setenta, para la determinación rutinaria automática de distintas especies en sangre y orina, para diagnóstico médico. En estos sistemas las muestras eran transportadas a través del sistema hasta el detector por medio de una disolución acuosa, que contenía una serie de burbujas de aire próximas entre sí (Skoog *et al.*, 2001).

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) constituye una reciente e importante innovación metodológica en Química Analítica que se caracteriza por un fundamento simple, un manejo sencillo y una gran capacidad para lograr resultados que son sorprendentes dadas sus características: rapidez, exactitud, y precisión (Valcárcel *et al.*, 1984).

La inclusión del término <<inyección>> en el nombre de la técnica responde más a un aspecto histórico que actual, ya que en los primeros sistemas de Análisis por Inyección en Flujo se usaba una jeringa hipodérmica para inyectar la muestra en un flujo de reactivo. El uso de válvulas rotatorias, que se ha impuesto actualmente, hace que se trate más de una inserción que de una inyección propiamente dicha.

La abreviatura con que se designa esta técnica en español, FIA, corresponde a la versión anglosajona (Flow Injection Analysis), no usándose las que realmente corresponden en nuestro idioma, AIF.

Para determinar el contenido de polifenoles totales en café verde y tostado se eligió el sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

La determinación de cafeína se realizó por extracción con cloroformo y por el sistema FIA utilizando una mini-columna de C₁₈.

1.13.1 Características Esenciales del Sistema FIA

Los rasgos esenciales del Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) son los siguientes:

1. El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos de Análisis en Flujo Continuo (CFA).

2. La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.
3. Se realiza un transporte del <<trozo>> inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso fisicoquímico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.) adicional al transporte.
4. La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
5. Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.
6. En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogenización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de media a tiempo fijo.
7. El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

La metodología FIA ocurre en cuatro pasos clave:

- a) Flujo no segmentado
- b) Inyección directa
- c) Dispersión parcial controlada
- d) Tiempo de operación reproducible

1.13.2 Componentes de un Sistema FIA

Los componentes esenciales para el montaje de un equipo FIA son los siguientes:

- a) Una *unidad de propulsión*, que establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de

simple portador. Puede ser una bomba peristáltica, un sistema de presión gaseosa, o bien la simple fuerza de la gravedad.

- b) Un *sistema de inyección*, que permita insertar o introducir en el flujo un volumen exactamente medido de la muestra con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el mismo.
- c) Una *zona de tubo o reactor*, donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional. Puede ser un tubo recto, en forma de serpentín, relleno o no de bolitas inertes, o bien tener una cámara de mezcla, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente (redox, cambio iónico, enzima inmovilizada, etc.).
- d) Una *celda de flujo*, incorporada a un instrumento de medida (colorímetro, fotómetro, fluorímetro, potenciómetro, etc.). que transduce la señal continua a un registrador y/o microprocesador.

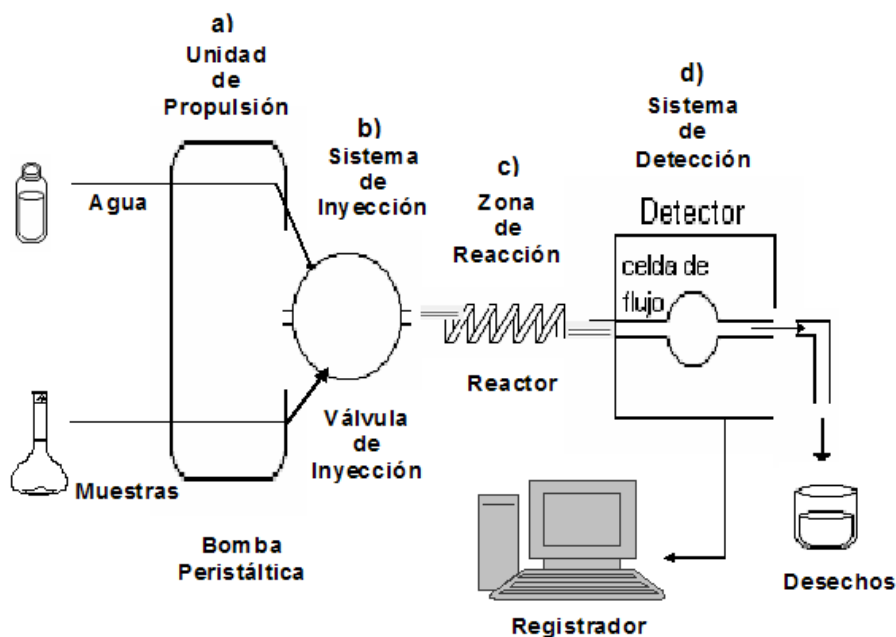


Figura 7. Esquema general de un sistema FIA.

El flujo que sale del sistema de detección se desecha. A veces pasa de nuevo por la bomba peristáltica para conseguir mayor constancia en el caudal.

Para que el sistema FIA tenga categoría de automático es preciso incorporar un sistema de muestreo que consiste en un muestreador típico, un sistema de aspiración

de muestra (normalmente el uso de la misma bomba peristáltica) y un sistema de inyección controlado eléctricamente y que funcione coordinadamente con el muestreador. Un microprocesador con una interfase activa permite con facilidad programar esta operación (Ruzicka *et al.*, 2000).

1.14 Descripción de los Componentes del Sistema FIA

1.14.1 Unidad de Propulsión

La unidad de propulsión tiene como misión establecer un flujo de caudal lo más constante posible, ausente de impulsos y perfectamente reproducible. Esto se puede conseguir por la acción de la gravedad, mediante un sistema de presión gaseosa o con una bomba peristáltica.

Generalmente se utiliza una bomba peristáltica que consta de un tambor con una serie de rodillos que comprimen los tubos flexibles, en el interior de los cuales circularán el portador y los reactivos.

El número de canales (tubos) en los que pueden impulsarse fluidos varía generalmente entre 1 y 16, siendo el más común el de cuatro canales.

Los tubos de bombas se fabrican en distintos materiales, cada uno de los cuales posee unas características que lo hacen adecuado para la impulsión de un determinado fluido. El ataque de estos tubos por diversas disoluciones puede hacer inadecuado su uso. Los tubos de PVC, solvaflex, tygon y goma de silicona no resultan convenientes para disoluciones muy ácidas o para disolventes orgánicos puros; mientras que el tipo acidflex es especialmente inadecuado para la impulsión de cetonas.

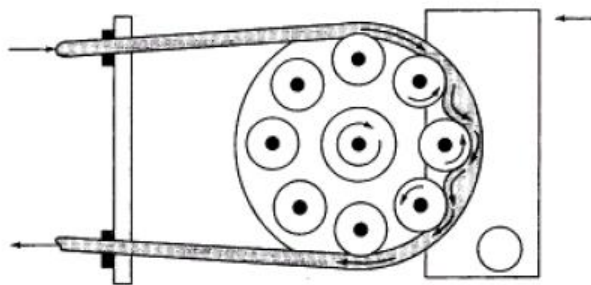


Figura 8. Representación de un canal de una bomba peristáltica.

En el Análisis por Inyección en Flujo la disolución circula a través del sistema por medio de una bomba peristáltica, este dispositivo comprime, mediante unos rodillos, un

fluido (gas o líquido) que se encuentra en el interior de un tubo de plástico. En la figura 8 se ilustra el funcionamiento de una bomba peristáltica. En este caso, unas abrazaderas comprimen continuamente el tubo contra los rodillos, para lograr una corriente permanente de fluido a través del tubo. Las bombas modernas suelen tener de 8 a 10 rodillos, dispuestos en configuración circular para que, en todo momento, la mitad de ellos presione sobre el tubo. Este diseño produce un flujo relativamente libre de impulsos. El caudal se controla mediante el diámetro interno del tubo y la velocidad del rotor. Las bombas peristálticas habituales los rodillos son lo suficientemente largos como para poder manipular varios tubos a la vez.

1.14.2 Sistema de Inyección

El sistema de inyección tiene como misión adicionar una cantidad de muestra perfectamente definida en el portador.

Los primeros sistemas de inyección descritos por Ruzicka y Hansen se basaban en el uso de una jeringa sin aguja, pero su uso ocasionaba un cambio transitorio en el flujo, que producía un pico agudo e irreproducible. Por este motivo se tuvo que cambiar el sistema de inyección.

Actualmente se utilizan válvulas de inyección rotatorias; la más común es la válvula hexagonal. Tiene seis orificios, tres de entrada y tres de salida que pueden estar en dos posiciones:

- De carga o llenado
- De inyección

Con este sistema se consigue una buena reproducibilidad de los volúmenes suministrados, amplio rango de variación de los volúmenes del bucle, rapidez y facilidad de manejo manual y una gran capacidad de automatización de la inyección.

En la figura 9 se muestra el mecanismo de acción de la válvula de inyección en sus dos posiciones de carga o llenado y de inyección.



Figura 9. Mecanismo de acción de la válvula de inyección en sus dos posiciones de llenado e inyección.

De acuerdo a la figura 9 la válvula hexagonal consta de seis orificios, tres de entrada y tres de salida, pudiendo adquirir dos posiciones: en la posición de llenado la muestra entra en la válvula por el canal 6 llenando el bucle (canales 1 y 4) y saliendo continuamente por el canal de desecho 5; en tanto la corriente portadora entra en la válvula por el canal 2 saliendo hacia el reactor por el canal 3. En la posición de vaciado (inyección) el canal 2 de entrada en la válvula comunica internamente con el canal 1 arrastrando el bolo de muestra a través de los canales 4 y 3 hacia el reactor mientras la muestra entra a la válvula por el canal 6 saliendo por el canal 5 hacia los desechos (Valcárcel *et al.*, 1984).

Los volúmenes que se inyectan de muestra en los procedimientos de inyección en flujo abarcan desde 5 a 200 μL , siendo los más usuales en la mayoría de las aplicaciones los de 10 a 30 μL . En un análisis bien hecho, es vital que la disolución de la muestra se inyecte rápidamente, de golpe o como un bolo de líquido; además, las inyecciones no deben alterar el flujo de la corriente portadora. Cuando la válvula de inyección está en la posición indicada, los reactivos fluyen por una derivación, mientras que la muestra fluye a través de la válvula. Cuando se gira la válvula 90 grados, la muestra entra en la corriente y forma una zona perfectamente definida.

1.14.3 Zona de Reacción

Puede ser diferente dependiendo de la cinética de la reacción. Si la cinética es rápida se utilizan reactores de corta longitud o reactores de tubo liso. Si la cinética es

lenta se pueden utilizar tubos con cámara de mezcla o un serpentín de una determinada longitud. Esta zona de reacción también se le conoce como “reactor”.

El transporte de muestras en los sistemas FIA se produce en régimen laminar, lo que origina un perfil parabólico de velocidades al circular las partículas interiores del fluido más rápidas que las exteriores. Rápidamente el transporte se debe a la difusión axial - producida por un gradiente de concentración horizontal - y a difusión radial- producida por la diferencia de concentración entre puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo -. El que predomine un transporte u otro depende del tiempo que la muestra tarde en llegar desde el sistema de inyección a la zona de reacción. Con esto lo que se busca es que el transporte sea una mezcla de ambos tipos de difusión, para eso necesitamos controlar el caudal y la longitud del reactor. En FIA se suele trabajar con caudales de entre 0.5 y 3 mL/min y con reactores de entre 50 y 200 cm.

Los reactores son unidades dentro del sistema de transporte que actúan sobre el tiempo de residencia y perfil del bolo de muestra, de forma que a su paso por la unidad de detección este posea las características adecuadas para la medida o la detección de la respuesta. Pueden responder a diferentes tipos en función de las necesidades de cada sistema como se muestra en la figura 10.

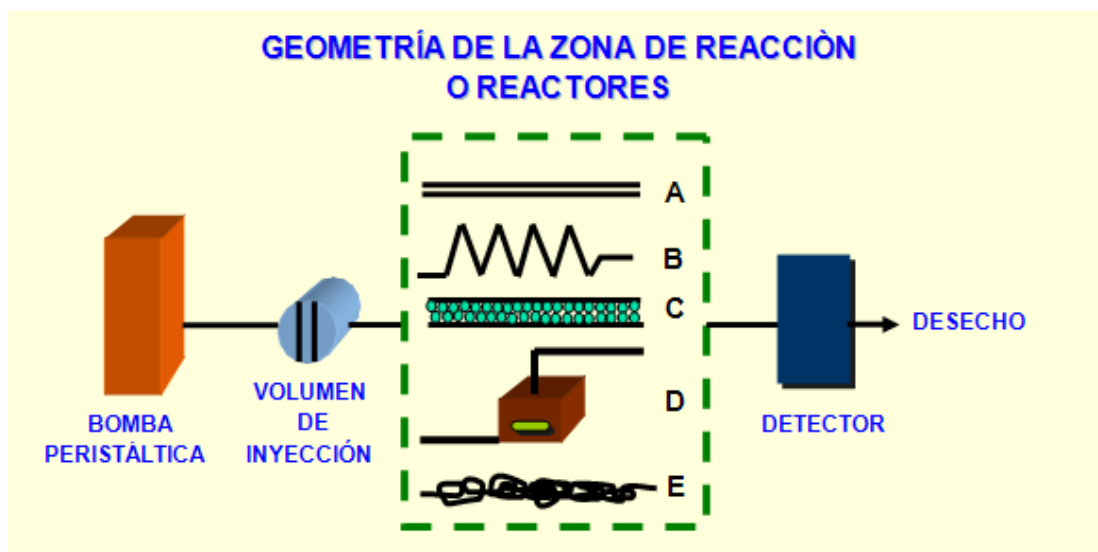


Figura 10. Tipos de reactores empleados en el sistema FIA. A) Tubo recto abierto, B) Tubo enrollado, C) Reactor SBSR (Single - Bead String Reactor), D) Cámara de mezclado y E) Reactor entretejido.

Tubo recto abierto: Reciben este nombre los reactores constituidos por un tubo recto de diámetro y longitud variable, que se encuentra situado entre el sistema de inyección y el de detección.

Tubo enrollado o serpentín (figura11): Estos reactores reciben este nombre, ya que se encuentran enrollados helicoidalmente en torno a un cilindro rígido (varilla de vidrio o plástico) de diámetro variable. La longitud de este tubo está en función del tiempo de residencia requerido para la mezcla más adecuada del portador o reactivo y la muestra. El diámetro del serpentín modifica la dispersión de la muestra. Este tipo de reactores es el más común y es el que más se utiliza tanto en la industria como en la investigación.



Figura 11. Reactor tipo serpentín.

Reactor SBSR o Single - Bead String Reactor cuyo nombre en español sería: Reactor de Bolitas en Cadena Simple; consiste en un tubo de longitud variable relleno de bolitas o de un polímero químicamente inerte, cuyo diámetro es de un 60 a un 80 % del diámetro del tubo, de forma que en cualquier sección del mismo existe una única bolita. El volumen no ocupado por el relleno es grande, por lo que el flujo no encuentra mucha resistencia a su paso. El uso de este reactor presenta una serie de ventajas, como son: el aumento del tiempo de residencia (benéfico cuando la reacción es muy lenta), disminución ostensible de la dispersión (incremento de la señal, utilizando menos muestra o concentraciones muy bajas de ésta) y aislamiento de la línea base en relación con los tubos abiertos, probablemente debido a que las bolitas actúan como supresoras de impulsos. El tiempo de retorno a la línea base permanece razonablemente constante para diferentes longitudes del reactor.

Cámara de Mezclado: Se utiliza cuando se precisa un mayor grado de mezcla (punto de confluencia o minicámara sin agitación) o una total homogeneización de muestra y reactivo (minicámara con agitación). Generalmente se requiere un mayor grado de

mezcla cuando se utiliza un sistema eléctrico de detección y cuando las diferencias de viscosidad, densidad específica, temperatura, contenido en detergentes, etc. entre el portador y la muestra son muy grandes. También se emplean para llevar a cabo las denominadas valoraciones FIA (Valcárcel *et al.*, 1984).

Reactor entretrejido: Este permite presentar un camino especialmente desorientado, lo cual promueve la dispersión radial.

1.14.4 Zona de Detección y Sistema de Detección (Espectrofotómetro)

El sistema de detección para FIA debe poseer las siguientes características: volumen pequeño, bajo nivel de ruido, señal independiente del caudal, respuesta rápida y lineal en un amplio margen de concentraciones y alta sensibilidad. En la práctica se utilizó un espectrofotómetro UV- Visible y una celda de flujo. La señal analítica que se obtiene en un sistema FIA se denomina fiagrama y es una representación de la señal medida frente al tiempo (pico).

En las figuras 12 y 13 se muestran dos ejemplos de celdas de flujo utilizadas en FIA.



Figura 12. Celda de Peek (Zona de detección).



Figura 13. Celda de flujo.

En la figura 14 se muestra el equipo utilizado para la elaboración de este proyecto en el laboratorio 105-106 de la Facultad de Química de la UNAM en el edificio B de la Unidad de Posgrado.



Figura 14. Equipo comercial laboratorio 105-106. Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Edificio B. Facultad de Química UNAM.

1.14.5 Fiagrama

La respuesta de la unidad de detección de un sistema FIA es una señal transitoria, típica de muchas técnicas analíticas. Es la representación gráfica de la señal (absorbancia, intensidad de fluorescencia, potencial, etc.) en función del tiempo.

La representación esquemática de los registros FIA son denominados fiagramas.

Las características esenciales de un fiagrama son:

- La altura del pico, h , que se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada que se determina.
- El tiempo de residencia, t , es el tiempo transcurrido desde la inyección, hasta que se alcanza la máxima señal.
- El tiempo de retorno, t' , que es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea base.
- El tiempo durante el cual aparece la señal, Δt , que se define como el periodo en el cual la señal sale y vuelve de nuevo a la línea base (<<baseline-baseline time>>), y que es una manera de definir la dispersión o dilución del analito.

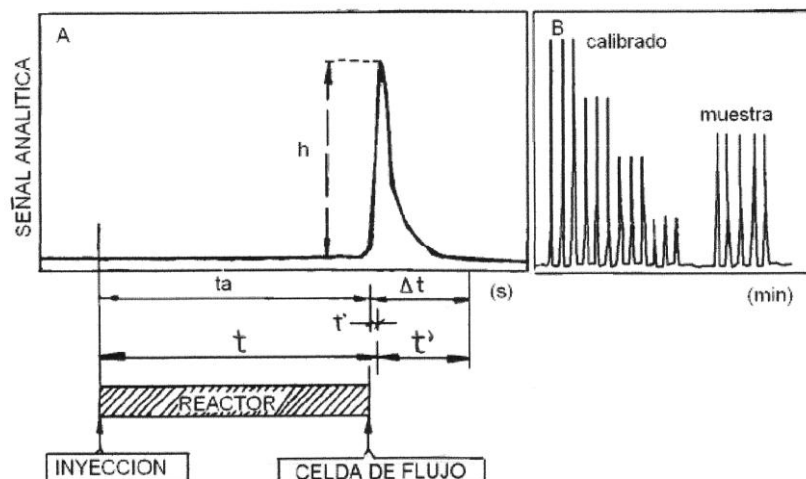


Figura 15. Representación gráfica de la señal en el sistema FIA. A) Características de una señal analítica para cada inyección de estándar o muestra en el sistema. B) Ejemplo de un fiagrama donde se inyectaron cuatro estándares por triplicado y una muestra desconocida por quintuplicado (Valcárcel *et al.*, 1984).

1.15 Determinación de Compuestos Fenólicos

La determinación de polifenoles totales en café verde y tostado se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu.

La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu ocurre en medio básico por los grupos fenólicos de los CGAs o polifenoles.

El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de ácido fosfo-túngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y de ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de color amarillo, que se reduce por oxidación de los fenoles del café, originando óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el café, y posee una absorción máxima a 760 nm (Celeste, 1992).

1.16 Cafeína

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina ó 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona ó 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina ó metilteobromina) es un alcaloide de la familia de las metilxantinas a la que también pertenecen la teofilina del té y la teobromina del cacao (López, 2003). Su peso molecular es de 194.20 g/mol y su constante de acidez (pKa) es de 10.4 a 40 °C. Su estructura química se muestra en la figura 16.

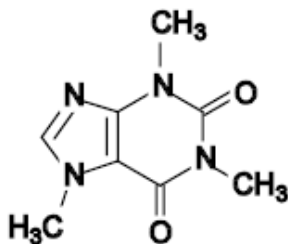


Figura 16. Estructura química de la cafeína.

1.16.1 Propiedades Físicas y Químicas

La cafeína en solución es incolora e inodora y con sabor amargo. Es un polvo blanco, soluble en agua y disolventes orgánicos (alcohol, acetona, cloroformo, éter y benceno) (The Merck Index, 2001).

La cafeína fue descubierta en 1819 por el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge y descrita en 1821 por Pelletier y Robiquet.

La cafeína tiene una densidad de 1.23 g / cm^3 , un punto de fusión de $227 \text{ }^\circ\text{C}$ y un punto de ebullición de $178 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.16.2 Alimentos y Cafeína

La cafeína se consume ampliamente y se encuentra principalmente en los frutos de la planta de café, en la planta de té, en la *yerba maté* y en las bayas de guaraná. En pequeñas cantidades se puede encontrar en el cacao y en la nuez de kola. En general, la cafeína se encuentra en las semillas, hojas, y frutos de más de 60 plantas, en las que actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertas clases de insectos cuando se alimentan de éstas.

La cafeína esta presente en el fruto del cafeto en concentraciones de 1.1 - 1.8 % en los granos de café verde y en los granos de café tostado de 0.9 - 1.8 % (Kirk *et al.*, 1996).

1.16.3 Cafeína en Café

La cafeína es el componente más importante, en cuanto a las propiedades fisiológicas del café, porque confiere en 10 % al característico sabor amargo y contribuye también a la sensación de cuerpo y fuerza del café.

La cafeína forma en parte un complejo π -molecular hidrófobo con el ácido clorogénico en la proporción molar 1:1. En el café para beber se encuentra en esta forma alrededor del 1 % de la cafeína y el 6 % del ácido clorogénico (Belitz *et al.*, 2004).

El contenido de cafeína es superior en los cafés Robusta; estos cafés contienen el doble de cafeína que los cafés Arábicas (Astiasarán *et al.*, 2000).

Además de la cafeína, el café también contiene otras xantinas: 2,3-metilxantina, paraxantina, teobromina y teofilina, y otras purinas en trazas que aparecen sobre todo en cafés Robusta, particularmente en granos inmaduros (Astiasarán *et al.*, 2000).

La cafeína es una sustancia química termoestable, sólo sufre una pequeña pérdida por sublimación ($178 \text{ }^\circ\text{C}$). Se ha observado que el porcentaje de cafeína se incrementa ligeramente durante el tueste, pero esto puede explicarse por la disminución de peso en el grano de café debido a las pérdidas orgánicas (Astiasarán *et al.*, 2000).

1.16.4 Toxicidad

La cafeína es un estimulante del sistema nervioso central, tiene acción sobre la fibra muscular, especialmente el músculo cardíaco porque liberan calcio (Ca^{+2}) del retículo endoplásmico y aumenta la permeabilidad celular, con el incremento de la contracción cardíaca, aumenta la capacidad respiratoria y retrasa la fatiga.

El consumo de cafeína se puede asociar con los siguientes síntomas: nerviosismo, ansiedad, desasociado, insomnio, trastornos gastrointestinales, temblores, taquicardia y agitación psicomotora (Dillenburg, 2010). También provoca diuresis y aumento de la secreción gástrica. Una concentración de 0.5 g de cafeína causa excitación del sistema nervioso central, insomnio y taquicardia (Badui *et al.*, 1996). La DL_{50} de la cafeína se ha estimado en 200 mg / kg de peso corporal para un hombre adulto, lo que la coloca como una sustancia moderadamente tóxica (Danache, 1990).

La dosis tóxica varía de persona a persona, dependiendo principalmente del nivel de tolerancia individual. Parece ser que el estrés, el nerviosismo, la tensión y el temor afectan notablemente la sensibilidad a la cafeína.

1.16.5 Usos de la Cafeína

La cafeína se encuentra en muchos alimentos y bebidas, incluyendo el café, el té, los refrescos (principalmente las bebidas de “cola”) y algunos productos del chocolate (López *et al.*, 2003 y Dillenburg, 2010). Otros usos están relacionados al tratamiento terapéutico de apnea infantil (suspensión de la respiración), estimulante bronquial y cardíaco, tratamiento del acné, así como en el tratamiento de la migraña. También se le encuentra en productos farmacéuticos de patente como: analgésicos, diuréticos, control de peso y estimulantes.

1.16.6 Determinación de Cafeína

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas analíticas para la determinación de cafeína. Algunas de éstas son (Dillenburg, 2010; Wei *et al.*, 2005):

- **Espectrometría con detección ultravioleta (NMX-F-552-SCFI-2009).**

Para determinar cafeína en café se coloca una porción de muestra, en un medio amoniacal, con sucesiva purificación con dietiléter en dos columnas cromatográficas;

la primera en medio alcalino (NaOH) y la segunda en medio ácido (H₂SO₄), seguido del arrastre de la cafeína con cloroformo.

La cafeína extraída en la solución clorofórmica se debe medir a una longitud de onda cercana a 276 nm.

- **Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS).**

Para poder determinar cafeína en café por este método a la muestra se le adiciona agua a 80 °C y se mantiene en agitación por 5 min. Para realizar la extracción de cafeína se deposita una gota de extracto filtrado en un vial y se toma 1 µL de disolvente orgánico (cloroformo, diclorometano, tolueno o n-octano) con una microjeringa. Después de 5 minutos de extracción se toma la gota de fase orgánica. El disolvente extraído se inyecta directamente en el GC-MS para el análisis de cafeína.

Este método se utiliza también para determinar cafeína en refrescos de cola, refrescos en general, té, barras de chocolate y chocolate con leche (Shrivastava *et al.*, 2007).

- **Cromatografía de Intercambio Iónico.**

La extracción se realiza con agua a 80 °C por 60 min. Para la determinación se utiliza una columna de separación con carga aniónica Dionex IonPack AS4A-SC con medio hidrofóbico y como eluyente hidróxido de potasio (KOH). Se mide a 274 nm.

Este método también se utiliza para determinar cafeína en refrescos de cola, té, bebidas para deportistas y preparaciones farmacéuticas incluyendo inyecciones y tabletas (Chen *et al.*, 1998).

- **Cromatografía Líquida con Detección Ultravioleta (LC-UV).**

Este método se utiliza para determinar cafeína, teobromina, teofilina, paraxantina y nicotina en leche materna.

La separación de los compuestos por cromatografía líquida se alcanza con una columna de LC-18-DB usando una solución de metanol:buffer (octano sulfato de sodio 5 Mm, ácido cítrico 10 mM, ajustando el pH a 5.8 con trietanolamina) en una proporción 20:80 como fase móvil. El potencial del procedimiento descrito fue demostrado con el uso de muestras contaminadas con los analitos de interés.

El método podría ser aplicado para determinar alcaloides, en otras matrices, tales como líquidos biológicos (Aresta *et al.*, 2004).

- **Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masas (LC-MS).**

Este método se utiliza para determinar cafeína, trigonelina, ácido nicotínico y sacarosa en café verde y tostado y en café instantáneo.

Las separaciones cromatográficas se hacen usando una columna de HPLC Spherisorb S5 ODS2 Microbore (150 x 2.0 mm, 5 μ m, Waters, Milford, MA, USA). La fase móvil consiste en una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.3 % (eluyente A) y metanol (eluyente B) a un flujo de 0.2 mL/min.

La ionización electrospray se opera en el modo negativo de 0.0 a 2.2 min para generar la aducción del ácido fórmico de la sacarosa ($M+HCOO^-$) y en el modo positivo a partir de 2.2 a 6.0 min para generar los iones cafeína, trigonelina y ácido nicotínico ($M+H^+$). El espectrómetro de masas es operado en un sólo monitoreo del ion (SIM) para detectar cafeína, trigonelina, ácido nicotínico y los iones pseudomoleculares de la sacarosa. La identificación de los compuestos de interés se realiza por la comparación de los tiempos de retención y del peso molecular de cada estándar utilizado (Perrone *et al.*, 2008).

- **Cromatografía de Alta Resolución por Filtración en Gel (HPGF).**

Este método se utiliza para determinar ácido clorogénico total, trigonelina y cafeína en café verde, tanto en investigación fundamental como para el control de calidad en la industria. Los extractos se obtuvieron usando agua a 80 °C.

Para las determinaciones, se utiliza una columna cromatográfica de TSK G-300 SW HPGF (300 x 8 mm) y un protector de columna (Supelco, USA). La fase móvil es agua bidestilada a un flujo de 0.5 mL/min. La absorbancia máxima del CGA se alcanza a 325 nm. La absorbancia máxima para la cafeína y trigonelina se alcanza a 272 nm. Aunque diversos grupos de isómeros de CGA se encuentran en el café todos vienen juntos en un sólo pico en el método de cromatografía con impregnación en gel. (De Maria *et al.*, 1995).

- **Cromatografía de Alta Resolución por Electroforesis Capilar (HPCE).**

Este método se utiliza para determinar metilxantinas en *yerba maté*, café, cocoa y refrescos de cola. Los extractos se obtienen con agua a 75 °C.

La separación se realiza por Cromatografía Capilar Electrocinética Micellar (MECC), en esta separación SDS-MECC la mejor resolución se obtiene usando 15 kV en un tubo capilar de sílica de 45 cm (40 cm de tubo útiles), SDS 50 mM, buffer de boratos pH 8.5 y detección UV a 200 nm. La migración de metilxantinas en MECC se ha descrito en base al equilibrio ácido-base que ocurre en la fase acuosa.

El sistema HPCE-MECC ha sido convenientemente probado para la cuantificación rápida y exacta de cafeína y teobromina como parte del control de calidad de metilxantinas que contienen alimentos y bebidas (Pomilio *et al.*, 2005).

- **Titulación Amperométrica.**

Este método es utilizado para determinar adenina, cafeína, teofilina y teobromina en refrescos de cola, té, café y cacao.

Para separar los compuestos se emplea una columna de fase sólida de octadecilo Baker-10 SPE. Al pasar la muestra por la columna de fase sólida, se eliminan algunos componentes de la matriz que pudieran intervenir en la determinación de cafeína y teobromina.

Para determinar cafeína en café se pesa 1 g de café y 0.25 g de óxido de magnesio (MgO). El café y el MgO se juntan en un matraz, se agregan 60 mL de agua destilada caliente (80-90 °C) y se mantienen en agitación a esta temperatura durante 45 minutos. La solución se filtra, el filtrado se recoge con 20 mL de disolución buffer de fosfatos (pH 3.5).

La determinación de cafeína y teobromina se obtiene a un potencial de +1.5 V. Para la determinación simultánea de los cuatro alcaloides el potencial óptimo seleccionado fue +1.4 V.

En comparación con la detección UV la sensibilidad de la detección amperométrica es de 2 - 5 veces más alta (Meyer *et al.*, 1996).

- **Análisis Voltamétrico.**

En este método utilizan electrodos de diamante para realizar la oxidación química de la xantina y de sus derivados naturales N-metil (teofilina, teobromina y cafeína).

Los electrodos de diamante presentan un comportamiento excelente, porque se obtuvieron picos bien definidos y reproducibles en la oxidación y determinación de estos compuestos.

Se mide la corriente máxima de oxidación de los estándares, la cual se utiliza para medir la oxidación de los analitos de interés en muestras reales.

Para determinar cafeína en café se pesan 408 mg de café instantáneo y son disueltos en 10 mL de agua. Se miden de 0.1-0.2 mL de extracto los cuales se diluyen con 25 mL de electrólito de soporte (perclorato de sodio (NaClO_4)) 0.1 M pH 1.8.

Este método se utiliza para determinar cafeína en café y en refresco de cola, aunque también sirve para determinar xantina, teofilina y teobromina (Spătaru *et al.*, 2002).

1.16.6.1 Espectrometría Ultravioleta

La espectrometría es el conjunto de procedimientos que utilizan la luz para medir concentraciones químicas.

La radiación ultravioleta se encuentra entre la luz visible y los rayos X del espectro electromagnético esto se muestra más claramente en la figura 17.

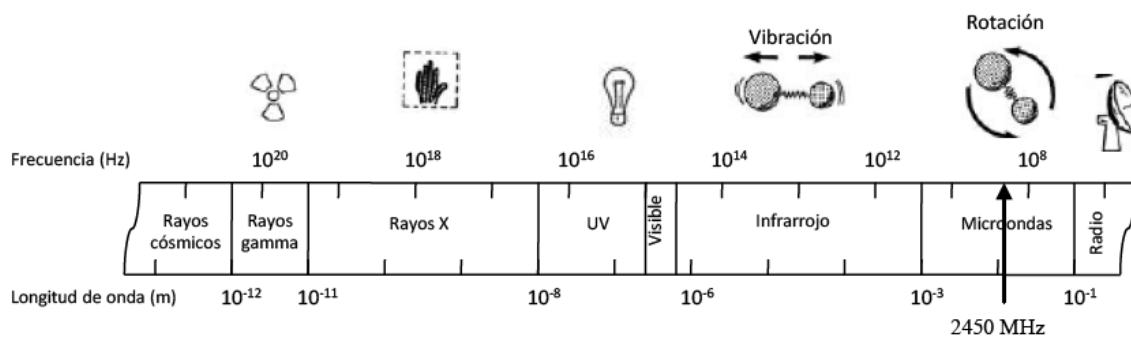


Figura 17. Espectro electromagnético (Scott, 1993).

La luz ultravioleta (UV) tiene longitudes de onda entre los 15 y 400 nm. Esta espectrometría utiliza principalmente radiaciones de entre 80 a 400 nm y de 200 – 400 nm (UV cercano). Se rige por la ley de Lambert-Beer.

La ley de Lambert-Beer o simplemente ley de Beer permite cuantificar la concentración de una muestra por UV, también puede ser expresado por medio de la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon c l \quad (2)$$

La absorbancia es adimensional, pero algunos escriben “unidades de absorbancia” después de la absorbancia. La concentración de la muestra c , normalmente viene dada en unidades de Molaridad (mol/L). El paso óptico l , normalmente se expresa en centímetros. La cantidad ϵ se llama absorptividad molar (o coeficiente de extinción en libros antiguos) y tiene como unidades M^{-1} , cm^{-1} , y así el producto $\epsilon c l$ es adimensional. La absorptividad molar es la característica de una sustancia que nos dice cuánta luz absorbe a una longitud de onda determinada (Harris, 2001).

Cuando una molécula absorbe un fotón, su energía aumenta. Se dice que la molécula ha pasado a un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, su energía disminuye. El estado de mínima energía de una molécula se llama estado fundamental. Las radiaciones UV y Visible hacen que los electrones pasen a orbitales de mayor energía.

Los espectrofotómetros utilizados para UV y Visible constan de una fuente de luz, un selector de longitud de onda (monocromador), un compartimento de muestra y un detector.

Las fuentes de luz que se utilizan son lámparas de descarga de hidrógeno o deuterio que operan a bajas presiones (aproximadamente 0.2 - 5 torr) y voltajes reducidos (40 V de cd) y son utilizadas para trabajar en la región UV.

Las mediciones por encima de 350 nm se suelen llevar a cabo con lámparas de filamentos incandescentes que producen emisiones continuas en estos intervalos. En estas lámparas, el filamento de alambre, por lo general de tungsteno, se calienta hasta la incandescencia por medio de una corriente eléctrica. El filamento está cerrado en un bulbo de vidrio herméticamente sellado que se llena con un gas inerte o un vacío. Los filamentos suelen estar en forma de espiral para incrementar la emisividad, la eficacia y la luminancia media. Las lámparas incandescentes son unidades resistentes y de bajo costo, suficientemente brillantes para casi todos los trabajos de absorción en la región UV-Visible.

Las lámparas de tungsteno-halógeno son un tipo especial en las que se añade yodo al gas normal de llenado del bulbo. El propio bulbo se fabrica con cuarzo para

resistir las altas temperaturas de operación 3500 K. El yodo se combina químicamente con el tungsteno sublimado en las paredes del bulbo. El gas WI_2 resultante emigra de regreso al filamento caliente, donde se descompone y se deposita en el tungsteno. El ciclo se repite en forma continua, lo cual produce una autolimpieza del bulbo. Estas lámparas mantienen el 90 % de su luminosidad durante su vida práctica (Willard *et al.*, 1992).

1.17 Extracción Líquido-Sólido

Este tipo de extracción es más conocida como extracción en fase sólida. Se utilizan pequeñas columnas o discos de teflón que contienen un material sólido adsorbente que se fabrica con diferentes polaridades. La muestra que contiene el o los analitos disueltos se pasan a través de estos sistemas y los compuestos de interés se retienen en el adsorbente por afinidad de polaridades. Los demás componentes de la mezcla salen del sistema. De esta manera se lleva a cabo la separación. Para recolectar el o los analitos retenidos en el adsorbente, simplemente se pasa un disolvente en el cual estos compuestos tengan una gran solubilidad.

Actualmente existen adsorbentes de muy diferentes polaridades para todo tipo de analitos y tienen aplicaciones generales y específicas. Este tipo de extracción tiene grandes ventajas como son: el poco gasto de disolventes, corto tiempo de operación y altos porcentajes de recuperación del analito. La extracción en fase sólida ha ido desplazando a la extracción líquido-líquido en muchos de los métodos analíticos oficiales (Cañizares *et al.*, 2009).

1.18 C_{18}

El C_{18} es la fase estacionaria más utilizada en cromatografía de fase reversa. La cromatografía de fase reversa fue desarrollada en 1950 y fue ideada para la separación de pequeñas moléculas orgánicas. Más tarde, con la aparición de nuevos soportes para la fase estacionaria y nuevos detectores, se convirtió en una herramienta indispensable para la separación de biomoléculas como proteínas, péptidos y oligonucleótidos.

Para determinar el contenido de cafeína por FIA en las diferentes muestras de café analizadas se trabajó con una columna de octadecilo (C_{18}) la cual se designa

frecuentemente como ODS, abreviatura de octadecilsilano (Harris, 2001). Es una columna no polar de fase reversa que consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Se prepara con sílica rígida, formada por partículas mecánicamente resistentes y uniformes, con diámetros de 3, 5 y 10 μm . La superficie de la sílica esta constituida por grupos silanol (SiOH) químicamente reactivos que abarcan una superficie cercana a los 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (Figura 18).

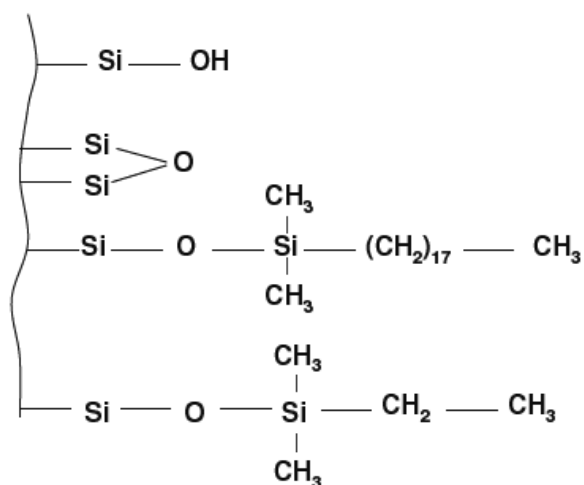


Figura 18. Grupos silanol libres y grupos silanol derivatizados.

La sílica presenta las ventajas de resistir la aplicación de altas presiones sin contraerse, y de no expandirse al contacto con los disolventes. Pero tiene la desventaja de ser químicamente inestable; a un pH menor de 3 los ligandos unidos a la sílica pueden ser removidos y a un pH mayor de 7.5, la sílica se solubiliza.

El acoplamiento de los ligandos a la sílica generalmente se efectúa usando reactivos de tipo clorotrialkilsilanos (Figura 19). En esta reacción, no todos los grupos silanol reaccionan ya que las cadenas alquilo generan un impedimento estérico que previene la derivatización completa de todos los grupos disponibles. El recubrimiento de la superficie por *sililación* se limita a 4 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$. Los grupos silanol residuales imparten una polaridad indeseable a la superficie, y son responsables del efecto de retención de modo mixto. Para reducir este efecto, los grupos silanol residuales se hacen reaccionar con compuestos cloroalquilsilanos más pequeños como el

clorotrimetil y clorotrietilsilano. A este proceso se le conoce como “end-capping” o bloqueo.

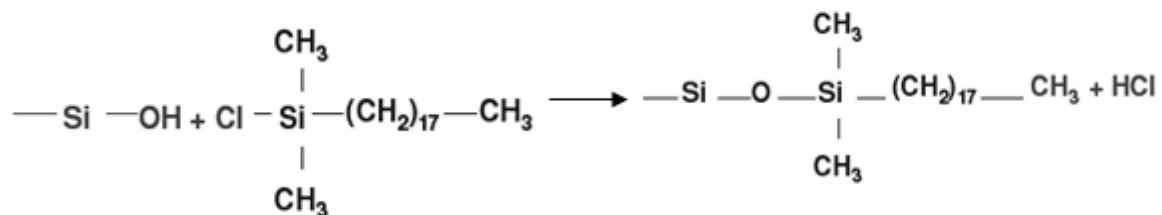


Figura 19. Alquilación de los grupos silanol.

Por lo general, el grupo alquilo del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C₈ (n-octilo) o una cadena C₁₈ (n-octadecilo).

Puede considerarse que la cromatografía de fase reversa es un proceso de partición en donde los solutos están distribuidos entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Los solutos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema más lentamente que los solutos polares.

Los disolventes más utilizados para trabajar con esta fase son: metanol y agua, acetonitrilo y agua o tetrahidrofurano y agua. Esta columna se utiliza también para separar compuestos no polares como compuestos aromáticos y polinucleares (naftaleno, antraceno y fenantreno). Es la fase estacionaria más utilizada en HPLC.

II. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

2.1.1 Instrumentación

Se utilizó un espectrofotómetro Varian modelo Cary 3 UV-VIS (Sydney, Australia) equipado con una celda de cuarzo de 1 cm. Para construir las configuraciones de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) se usó: una bomba peristáltica Gilson Miniplus-3 (Villiers-le Bel, Francia) de un cabezal y 4 canales, una válvula de inyección Rheodyne 5041 (Rohnert Park, California, Estados Unidos), una válvula de selección Rheodyne (Rohnert Park, California, Estados Unidos), una válvula de selección automática marca Scivex V-2500, tubos para bomba resistentes al paso de disolventes, conectores en forma de T de PTFE y tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.

Para preparar las disoluciones, el agua destilada se sonicó en un baño de ultrasonido marca Branson 2510.

Los granos de café se molieron en un molino marca Proctor Silex.

Para pesar las muestras y reactivos se utilizó una balanza marca Explore E12140 Ohaus con una precisión de 0.1 mg. También se utilizó un congelador Carrier, una liofilizadora marca Labconco modelo free zone 4.5, una estufa marca Rios-Rocha modelo H-41, una parrilla de calentamiento con agitador magnético marca Cimerac (Barnstead/Thermolyne), una centrífuga marca Hettich EBA-20, un pH metro marca Oakton, material de vidrio (equipo Millipore, matraces volumétricos, matraces Erlenmeyer, vasos de precipitados, embudos de separación, embudos de filtración rápida, probetas, pipetas volumétricas, botellas color ámbar y transparentes), tubos para centrifuga, botellas de plástico, pizeta, propipeta, espátula, soporte universal, arillo de metal, un tamiz número 40, un desecador Pyrex, un cronómetro marca Taylor, una barra magnética de 2 cm de largo, membranas de nylon de 0.45 μm , un reactor de 200 cm y un termómetro Fisherbrand de -10 °C a 160 °C.

2.1.2 Reactivos

El estándar de ácido clorogénico con un 95 % de pureza y el estándar de cafeína empleados fueron de la marca Sigma-Aldrich. Se utilizaron también los siguientes reactivos: reactivo de Folin-Ciocalteau (Merck), hidróxido de sodio (J.T. Baker),

metanol (J.T. Baker), acetato de zinc (Comercial técnico y J. T. Baker), hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado (Sigma), ácido acético glacial (Baker), cloroformo grado HPLC (J.T. Baker), acetato de sodio anhidro (Aplicaciones tecnológicas), tetraborato de sodio decahidratado (Sigma-Aldrich), C₁₈ (Whatman SPE- ODS-5), alcohol etílico absoluto (J. T. Baker), albúmina de suero de bovino (Sigma) con 96 – 99 % de pureza, D-glucosa anhidra (J.T. Baker) y agua destilada.

2.1.3 Preparación de Disoluciones

Se preparó una disolución madre de ácido clorogénico de 500 mg/L. A partir de esta disolución se prepararon disoluciones estándar. Para realizar la curva de calibración en un intervalo de concentración de 15 mg/L – 200 mg/L; se tomó la alícuota apropiada de la disolución madre y se aforó con agua destilada. También se prepararon dos disoluciones madre de cafeína; la primera consistió en una disolución madre de cafeína en cloroformo a 500 mg/L. A partir de esta disolución se prepararon las disoluciones estándar en un intervalo de concentración de 1 mg/L – 25 mg/L; se tomó la alícuota apropiada de la disolución madre y se aforó con cloroformo. La preparación de cada disolución se realizó lo más rápido posible para evitar que el cloroformo se volatilizará. La segunda consistió en preparar una disolución madre de cafeína en agua destilada a 2000 mg/L. A partir de esta disolución se prepararon las disoluciones estándar en un intervalo de concentraciones de 400 mg/L – 1600 mg/L para su determinación por FIA; se tomó la alícuota apropiada de la disolución madre y se aforó con una disolución buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5.

Para preparar el buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5 se utilizó como par ácido/base al ácido acético glacial y al acetato de sodio, se prepararon 250 mL de esta disolución buffer; para ello se disolvieron 2.05 g aproximadamente de acetato de sodio (CH₃COONa) en aproximadamente 240 mL de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 1.4 mL de ácido acético glacial (CH₃OOH) y mezclaron perfectamente. Posteriormente, se vaciaron en un matraz volumétrico de 250 mL, se ajustó el pH y se aforó a 250 mL. El pH quedó en 5.54.

Los cálculos que se hicieron para preparar el buffer se muestran a continuación:

* CH_3COONa :

$$250 \text{ mL} \times \left(\frac{0.1 \text{ mol } CH_3COOH}{1000 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{82.022 \text{ g}}{1 \text{ mol } CH_3COOH} \right) = 2.0505 \text{ g } CH_3COONa$$

* CH_3COOH :

$$250 \text{ mL} \times \left(\frac{0.1 \text{ mol } CH_3COOH}{1000 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{60.05 \text{ g}}{1 \text{ mol } CH_3COOH} \right) = 1.5012 \text{ g } CH_3COOH$$

$$1.5012 \text{ g } CH_3COOH \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{1.05 \text{ g}} \right) = 1.4285 \text{ mL } CH_3COOH$$

Se hizo una mini-columna de C_{18} de 0.3 mm de diámetro por 1.7 cm largo, para ello; se rompió un cartucho de C_{18} y se depositó en un vial al cual se le adicionó alcohol etílico. Se homogenizó el vial para que todo el C_{18} quedará suspendido en el alcohol etílico para posteriormente llenar la mini-columna con ayuda de una pipeta Pasteur.

Para preparar el buffer de boratos 0.05 M pH 10 se disolvieron 4.77 g aproximadamente de tetraborato de sodio decahidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) en aproximadamente 240 mL de agua destilada. El pH se ajustó con NaOH 0.1 M y se aforó a 250 mL. El pH quedó en 10.12.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó al 10 %, para ello se tomaron 10 mL de este reactivo con una pipeta volumétrica, los cuales se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevaron a la marca de aforó con agua destilada. La disolución se almacenó en un frasco de vidrio de color ámbar para protegerla de la luz.

El hidróxido de sodio se preparó a una concentración 0.1 M y 0.5 M, para ello se pesaron 0.40 g y 2 g de este reactivo, cada uno de ellos se disolvió perfectamente y se aforó a 100 mL con agua destilada.

El reactivo de Carrez consta de dos reactivos y se prepararon de la siguiente manera:

Reactivo Carrez I: Se preparó disolviendo 21.9 g de acetato de zinc en 50 ml de agua, se adicionaron 3 mL de ácido acético glacial y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Reactivo Carrez II: Se pesó 10.6 g de hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado, los cuales se disolvieron perfectamente y se aforaron a 100 mL con agua destilada (Long *et al.*, 1997).

Para preparar la disolución de metanol:agua (7:3) se midieron 70 mL de metanol en una probeta de 100 mL y se vertieron en un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente se adicionaron 30 mL de agua destilada al mismo matraz y se mezclaron perfectamente.

Para preparar la disolución de metanol:agua al 25 % se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero en este caso se utilizaron 25 mL de metanol y 75 mL de agua destilada.

2.2 MUESTRAS ANALIZADAS

2.2.1 Café en Grano Verde y Tostado

Todas las muestras de café fueron de la variedad arábica tipo planchuela provenientes del estado de Chiapas, México. Se obtuvieron en forma de granos. Los tipos de café que se analizaron fueron: planchuela verde, planchuela verde descafeinado, planchuela tostado claro, planchuela tostado mediano, planchuela tostado descafeinado, planchuela tostado italiano, planchuela tostado descafeinado italiano, planchuela tostado con azúcar, planchuela tostado cubano, caracolillo verde y caracolillo tostado.

2.2.2 Preparación de las Muestras

Los granos de café verde y tostado se mantuvieron en refrigeración a 2 °C para evitar su descomposición. Cada muestra se sacó del refrigerador y se molió en un molino para café, hasta obtener una mezcla homogénea. Las muestras de café tostado se molieron en un tiempo menor a tres minutos. En el caso de las muestras de café verde fue necesario repetir varios periodos de tres minutos hasta obtener muestras homogéneas de café molido. Como no se logró obtener una homogeneidad completa en las muestras de café verde se trabajó con éstas muestras y con muestras

que se tamizaron a través de un tamiz No. 40. Una vez molido el café, se depositó en frascos de vidrio y plástico, para un mejor manejo y conservación. Cuando el café no se utilizaba se mantuvo en refrigeración a 2 °C.

Del café molido se tomó 1 g para realizar las extracciones, utilizando como referencia los trabajos de Ramalakshmi *et al.*, 2008 y Sun *et al.*, 2009.

2.3 MÉTODOS DE SECADO

2.3.1 Liofilización

De los cafés verdes, se molieron 40 g de cada uno para su liofilización. El café molido se depositó en frascos de vidrio con tapa y se mantuvo en refrigeración a 2 °C. Posteriormente, el café molido se sacó del refrigerador, se depositó en los vasos liofilizadores y se etiquetó.

Los vasos liofilizadores se taparon con papel aluminio y se sometieron a congelación durante 10 horas a -50 °C.

Antes de terminar el tiempo de congelación, la liofilizadora se prendió una hora y media antes de su uso, para que durante este tiempo se calibrará y alcanzará la temperatura y presión adecuada para la liofilización de las muestras. Los vasos liofilizadores se sacaron del congelador, rápidamente se les quitó la tapa de papel aluminio y se les puso su tapa. Se conectaron a la liofilizadora y se checó que ésta funcionará correctamente. Los vasos liofilizadores con la muestras se dejaron secando 8 horas a -41 °C con una presión de vacío de 0.045 mbar para eliminar la humedad de las muestras. Transcurrido el tiempo de liofilización, la liofilizadora se apagó y poco a poco se le sacó el aire para eliminar la presión que ésta tenía. Posteriormente, se sacaron los vasos liofilizadores con las muestras. Cada muestra se transfirió rápidamente a un frasco de vidrio con tapa, este se cerró perfectamente para evitar que la muestra se rehidratará. Los frascos de vidrio con las muestras liofilizadas se mantuvieron en refrigeración a 2 °C cuando éstas no se utilizaban.

2.3.2 Secado por Estufa

Se aplicó a los cafés verdes, por lo que la pérdida de humedad de las muestras de café se hizo de acuerdo a las Normas Mexicanas, NMX-F-551-SCFI-2008 y NMX-F-552-SCFI-2009. El primer paso fue pesar un vaso de precipitados con tapa de papel

aluminio. Posteriormente, el vaso de precipitados descubierto y la tapa de aluminio se secaron en la estufa a $130\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas ± 15 min. Una vez transcurrido este tiempo el vaso de precipitados se tapó con la tapa de papel aluminio y se dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador, cuando esto ocurrió se pesó en una balanza analítica. Este procedimiento se repitió hasta que el recipiente llegó a peso constante.

A continuación, se pesaron 5 g de la muestra en el vaso de precipitados seco y se tapó. El vaso tapado con la muestra se pesó y se colocó en la estufa en donde se le retiró la tapa. La muestra se secó a $130\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 6 horas ± 15 minutos. Al finalizar este periodo, al vaso de precipitados se le colocó la tapa y se puso en el desecador. Se dejó enfriar durante 1 hora y, posteriormente se volvió a pesar. Con los datos obtenidos se calculó el contenido de humedad (P_1) en los granos de café de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad } (P_1) = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m_0} \quad (3)$$

En donde:

m_0 = masa inicial de la muestra en gramos.

m_1 = masa de la muestra después del primer secado, en gramos.

Después de determinar la masa, el vaso de precipitados tapado se colocó nuevamente en el desecador, durante 15 horas.

Nuevamente se repitió el procedimiento de secado en la muestra, a $130\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas ± 15 minutos. Cuando terminó este periodo de tiempo, se tapó el vaso, se colocó en el desecador durante 1 hora y se pesó nuevamente. Con los datos obtenidos, se calculó el contenido de humedad (P_2) de acuerdo a la ecuación 3. En donde se sustituye P_1 por P_2 y m_1 por m_2 (masa de la muestra después del segundo secado, en gramos). La diferencia entre P_1 y P_2 debe ser inferior a 1.0 g por 100 g de muestra. Si no es así, es preciso repetir la determinación.

La humedad (P) del producto, expresada en porcentaje en masa, es igual a la pérdida de masa observada después del primer secado más la mitad de la pérdida de masa complementaria observada después del segundo secado. En la ecuación 4 se muestra la fórmula para hacer el cálculo.

$$P = P_1 + \frac{(P_1 - P_2)}{2} \quad (4)$$

Para determinar el contenido de humedad en las muestras, por este método, cada determinación se realizó por triplicado y de ahí se obtuvo el promedio.

2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En este trabajo, inicialmente se compararon dos métodos para la extracción de polifenoles y cafeína presentes en los granos de café. El primer método consistió en realizar la extracción con metanol:agua (7:3) a 70 °C agitando durante 10 minutos. En el segundo método se realizó la extracción con agua a 80 °C agitando durante 5 minutos.

Se realizaron tres extracciones por cada método, tanto para el café verde como para el tostado. A continuación se presenta en que consistió cada método de extracción.

Método 1: Se calentó un baño de agua a 70 °C en una parrilla de calentamiento. Se preparó una disolución de metanol:agua (7:3), se midieron 20 mL de esta disolución, y se calentaron en el baño de agua. Cuando la disolución de metanol:agua alcanzó la temperatura de 70 °C, se agregó 1 gramo de café (verde o tostado) y se agitó durante 10 minutos, manteniendo el control de la temperatura. El tiempo de agitación se controló con un cronómetro (Ramalakshmi *et al.*, 2008).

Método 2: El método de extracción fue similar al método 1, pero en este se utilizó agua a 80 °C como extractante y se mantuvo en agitación durante 5 minutos (Sun *et al.*, 2009).

Una vez transcurrido el tiempo de extracción para ambos métodos, los extractos se filtraron utilizando papel filtro de filtración rápida para eliminar los residuos de café. Los matraces que contenía los extractos se enjuagaron perfectamente para evitar

pérdidas. El extracto filtrado se aforó a 25 mL en un matraz volumétrico. Se tomó una alícuota de 10 mL de extracto y se vertieron en un vaso de precipitados de 50 mL. A este extracto se le adicionó 1 mL del reactivo de Carrez I y 1 mL del reactivo de Carrez II. Al adicionar los dos reactivos de Carrez, se forma un precipitado, por lo que se volvió a filtrar después de 5 minutos de haber adicionado los dos reactivos de Carrez. La disolución filtrada se aforó a 10 mL. A partir de esta disolución se tomó una alícuota de 1 mL y se aforó a 25 mL para cuantificar polifenoles por FIA, y otra alícuota de 8 mL para extraer a la cafeína con cloroformo y medirla por UV.

La cafeína también se determinó por FIA utilizando una mini-columna de C₁₈: el extracto, después de haber sido tratado con los reactivos de Carrez y filtrado, se hizo pasar por el sistema FIA a través de la columna para retener a la cafeína y posteriormente eluirla con una disolución de metanol:agua al 25 %.

2.5 Determinación de Polifenoles en Granos de Café Verde y Tostado

Para la determinación de polifenoles se utilizó una configuración de Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

Para la cuantificación de polifenoles todos los reactivos se sonicaron en un baño de ultrasonido por aproximadamente 10 minutos antes de utilizarlos. Esto se hizo para evitar la presencia de burbujas cuando se trabajaba con el sistema FIA. El reactivo de Folin-Ciocalteu se protegió de la luz almacenándolo en un frasco ámbar.

Para construir el sistema FIA se utilizó una bomba peristáltica de cuatro canales. A través del primer canal se hizo pasar la muestra a un caudal de 0.4 mL/min. Por el segundo canal se hizo pasar el portador (agua destilada) a un caudal de 0.8 mL/min. Tanto el reactivo de Folin-Ciocalteu y el hidróxido de sodio 0.5 M se bombearon a un caudal de 1 mL/min. En la figura 20 se muestra la configuración FIA utilizada.

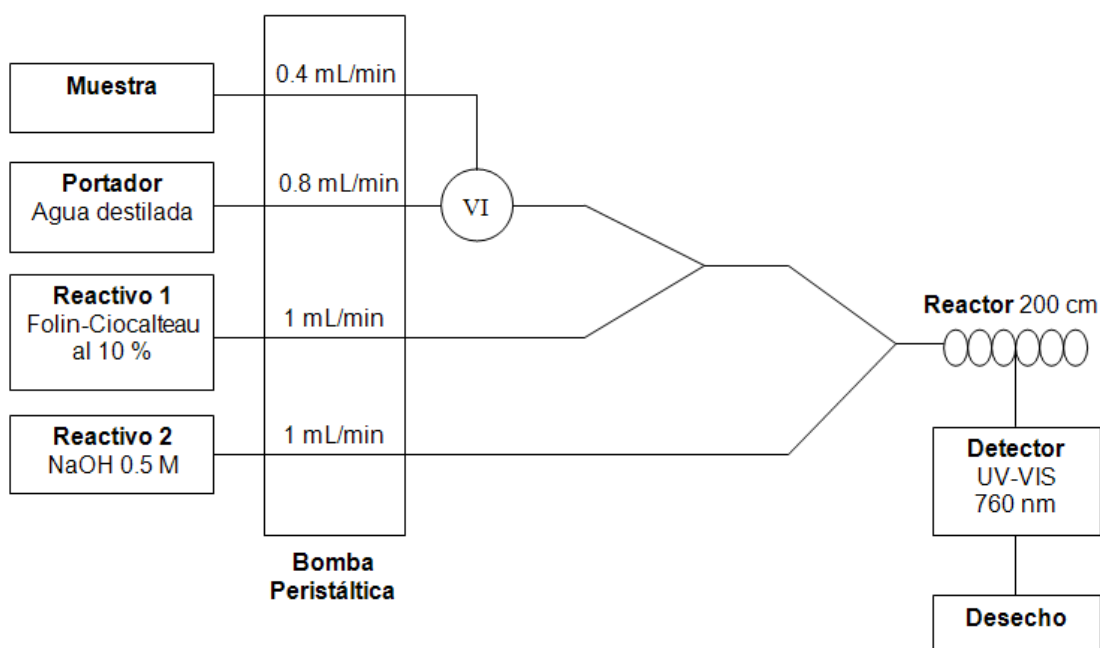


Figura 20. Configuración FIA utilizada para la determinación de polifenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En primer lugar se llenó el bucle de inyección de 150 μL con el estándar o muestra y se inyectó en el portador (agua destilada). La muestra y el portador confluyeron con el reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 % y con la disolución de NaOH 0.5 M. Posteriormente se llevó a cabo la reacción a lo largo del reactor de 200 cm. El producto de la reacción pasó por el sistema de detección espectrofotométrico y se midió el cambio de absorbancia a 760 nm, en una señal transitoria. Cada muestra se inyectó tres veces y se hizo un promedio.

El proceso completo de salida de la señal transitoria y de regreso a la línea base tomó menos de 1.30 minutos. Por medio de la válvula de inyección, el bucle de inyección se llena cuando la señal de la muestra anterior llega a su máximo en el diagrama y la siguiente muestra se inyecta en el momento que la señal llega a la línea base.

2.6 Determinación de Cafeína en Extractos Clorofórmicos

Para cuantificar la cantidad de cafeína presente en los granos de café se tomaron 8 mL del filtrado final y se vertieron en un embudo de separación. Se adicionaron tres

porciones de cloroformo (10 mL + 5 mL + 5 mL) y se agitaron durante un minuto con cada porción. Se separó la fase orgánica de la fase acuosa. La fase orgánica contiene a la cafeína y la fase acuosa se desecha. Los extractos recuperados de la fase orgánica se depositaron en un matraz de 125 mL. Si se observa fase acuosa en el extracto o turbiedad, los extractos se centrifugan 4 minutos a 4000 rpm. Una vez, bien separada la fase orgánica de la fase acuosa, la parte orgánica se aforó a 25 mL en un matraz volumétrico, de esta disolución se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL en un matraz volumétrico. Esta disolución se leyó a 276 nm. Cada determinación se realizó tres veces y se hizo un promedio.

2.7 Determinación de Cafeína Acoplado la Extracción en Línea con un Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Al igual que en la determinación de polifenoles por el sistema FIA todos los reactivos se sonicaron en un baño de ultrasonido por aproximadamente 10 minutos antes de utilizarlos.

Para construir el sistema FIA se utilizó una bomba peristáltica de cuatro canales; en donde sólo se utilizaron dos canales. A través del primer canal se hizo pasar la muestra a un caudal de 0.4 mL/min. Por el segundo canal se hizo pasar el portador (agua destilada) a un caudal de 0.8 mL/min. También se utilizó una válvula de inyección y dos válvulas de selección. La válvula de selección 1 fue manual y se ocuparon las cavidades 1 y 2, la válvula de selección 2 fue automática y se ocuparon las cavidades 2 y 3.

En la figura 21 se puede observar la configuración FIA general utilizada para la determinación de cafeína y en la figura 22 se muestran los pasos de retención y elución de cafeína.

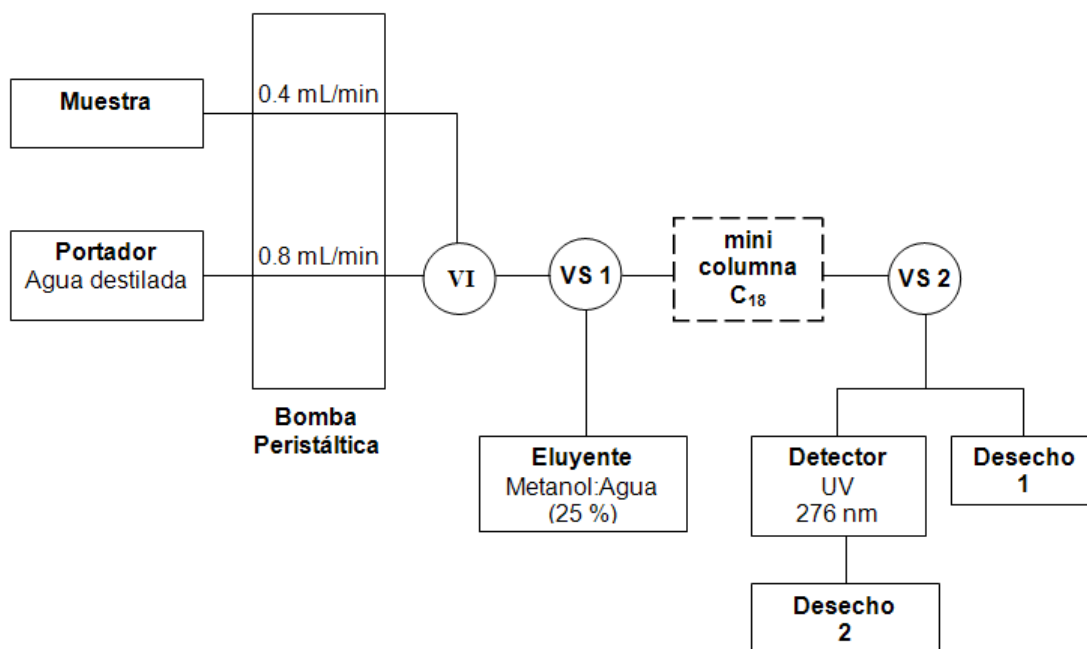
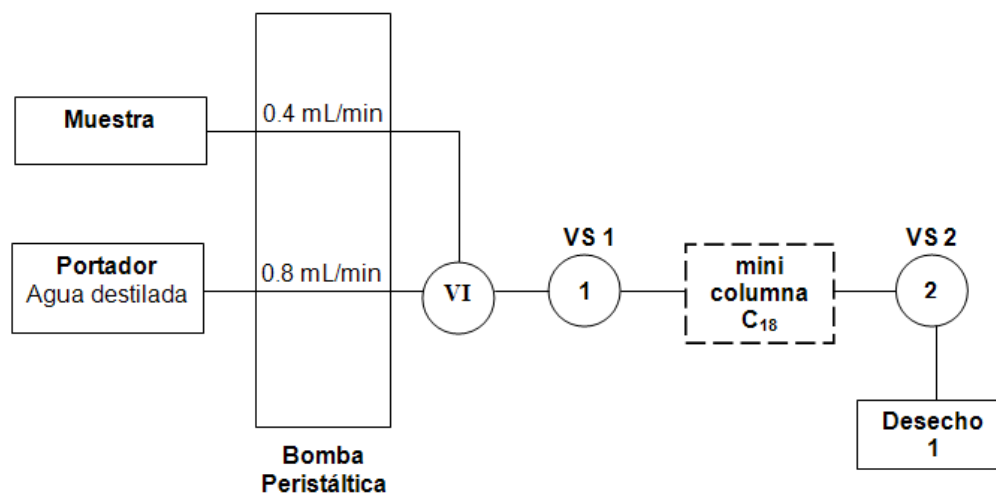
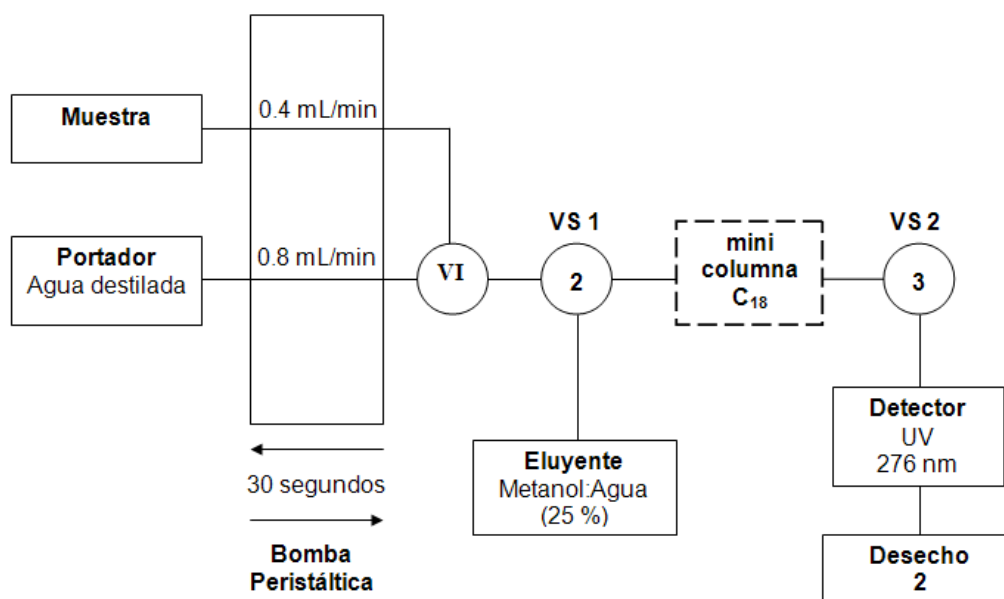


Figura 21. Configuración FIA general para la determinación de cafeína utilizando una mini-columna de C₁₈. **VI:** Válvula de inyección; **VS 1:** Válvula de selección 1 y **VS 2:** Válvula de selección 2.



(A)



(B)

Figura 22. Funcionamiento del sistema FIA para determinar cafeína.

A) Inyección del estándar o muestra; **B)** Elución del estándar o muestra.

VI: Válvula de inyección; **VS 1:** Válvula de selección 1 y **VS 2:** Válvula de selección 2.

Inyección: En primer lugar se llenó el bucle de inyección de 200 μ L con el estándar o muestra y se inyectó en el portador (agua destilada), el cual pasó por la mini-columna de C₁₈ durante 1.30 min. La muestra y el portador confluyeron hacia la

válvula de selección 1 (VS 1). Ésta válvula se conectó al centro de la válvula de selección 2 (VS 2); entre estas dos conexiones se colocó la mini-columna de C₁₈, la cual tuvo una longitud de 1.7 cm y un diámetro de 0.3 mm. Al pasar el estándar o muestra por la mini-columna de C₁₈, la cafeína quedó retenida en la mini-columna, por lo que el resto de la muestra junto con el portador fluyeron hacia el desecho.

Elución: Se aspiró el eluyente (metanol:agua 25 %), cambiando la posición de la válvula de selección 1 (VS 1) a la posición 2 durante 30 segundos, al mismo tiempo que el sentido de la bomba peristáltica. Pasando los 30 segundos se cambió nuevamente el sentido de la bomba peristáltica para que el metanol pase a través de la mini-columna de C₁₈ y eluyera a la cafeína que quedó retenida en la mini-columna. De manera inmediata, se cambió la posición de la válvula de selección 2 (VS 2) a la posición 3 para que la cafeína eluida pasara por el sistema de detección y se midiera su cambio de absorbancia a 276 nm, en una señal transitoria. Cada muestra se inyectó tres veces y se hizo un promedio.

Para cuantificar la cantidad de cafeína presente en los granos de café se tomaron 10 mL del extracto, se les adicionaron los reactivos de Carrez, se filtraron y se aforaron a 10 mL. Esta disolución se inyectó en el sistema FIA y se cuantificó cafeína de acuerdo al procedimiento descrito.

2.8 Precauciones con los Reactivos

Todas las disoluciones que se utilizaron en alguna de las configuraciones FIA mostradas en el presente trabajo fueron previamente sonicadas en un baño de ultrasonido durante 15 minutos antes de utilizarlas. Esto se hizo para evitar la presencia de burbujas, cuando se trabaja con el sistema FIA.

Los reactivos que se prepararon para realizar las determinaciones, se guardaron en refrigeración a una temperatura de 2 °C hasta su uso.

2.9 VALIDACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS

2.9.1 Límite de Detección y Cuantificación

Después de hacer las curvas de calibración, tanto para ácido clorogénico, como para cafeína, se realizó la regresión lineal de las curvas donde se obtuvo la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

La regresión de la recta calculada se utilizó para estimar la concentración de las muestras problema por interpolación, y también para estimar el límite de detección (LD), el límite de cuantificación (LC) y la desviación estándar relativa (DER) del procedimiento analítico. También se calcularon los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen.

Los valores obtenidos de límite de detección (LD) para cada curva de calibración determinan el punto a partir del cual se puede realizar una medición con la certeza de que no se está midiendo el blanco (Miller *et al.*, 2002).

2.9.2 Precisión

En este trabajo se calculó la precisión para cada método utilizado, expresada como la repetibilidad de siete disoluciones de concentración conocida de cada uno de los analitos en estudio y preparadas el mismo día. La precisión se expresa como la desviación estándar relativa (DER), donde s es la desviación estándar de las concentraciones de las siete mediciones y \bar{x} es la media aritmética de esas mediciones. Cada una de las siete disoluciones se midió por triplicado a la longitud de onda correspondiente para obtener el valor de absorbancia. Para obtener la concentración de cada disolución se utilizó el promedio de las tres mediciones y la curva de calibración correspondiente.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La configuración FIA para la determinación de polifenoles en los granos de café se basó en trabajos previamente publicados para la determinación de polifenoles totales en vinos (Celeste *et al.*, 1992). Este método se acopló para determinar los polifenoles presentes en los granos de café.

Los polifenoles presentes en los granos de café se cuantificaron como ácidos clorogénicos, debido a que éstos compuestos se encuentran de forma abundante en el café. El más común y disponible comercialmente es el ácido 5-O-cafeoilquínico también conocido como ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA) y comúnmente llamado ácido clorogénico (CGA) (Belitz *et al.*, 2004; Clifford, 2000). Por lo que la curva patrón se hizo con este compuesto.

3.1 Espectro de Absorción del Ácido Clorogénico (CGA)

El primer paso fue conocer el espectro de absorción del CGA, por lo que se realizó un barrido de absorción de 200 nm a 400 nm. El espectro de absorción se obtuvo con una disolución de 5 ppm de CGA con un máximo de absorción a 330 nm (anexo I). Debido a que en los extractos de café hay muchos compuestos que absorben a longitudes cercanas a 330 nm, para la cuantificación de polifenoles totales (expresados como ácido clorogénico) se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu.

3.2 Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

El sistema FIA consistió en determinar a los polifenoles totales en las muestras de café utilizando el método de Folin-Ciocalteu. Para ello, primeramente se realizó la curva de calibración de CGA utilizando la configuración FIA de la figura 20. Se construyeron dos curvas de calibración con disoluciones de CGA en agua probando dos volúmenes de inyección: 100 μ L y 150 μ L.

Se inyectaron disoluciones con concentraciones de 15 mg/L a 200 mg/L de ACG. Con el primer volumen (100 μ L) se observaron señales de diferente tamaño, pero con picos no bien definidos. Con el segundo volumen (150 μ L) se observaron señales de diferente tamaño y con picos bien definidos. Por lo que se decidió utilizar este volumen para hacer la curva de calibración de CGA.

3.3 Curva de Calibración de Ácido Clorogénico (CGA)

El intervalo lineal encontrado fue de 15 mg/L a 200 mg/L para ácido clorogénico. En la figura 23 se muestra uno de los diagramas obtenidos.

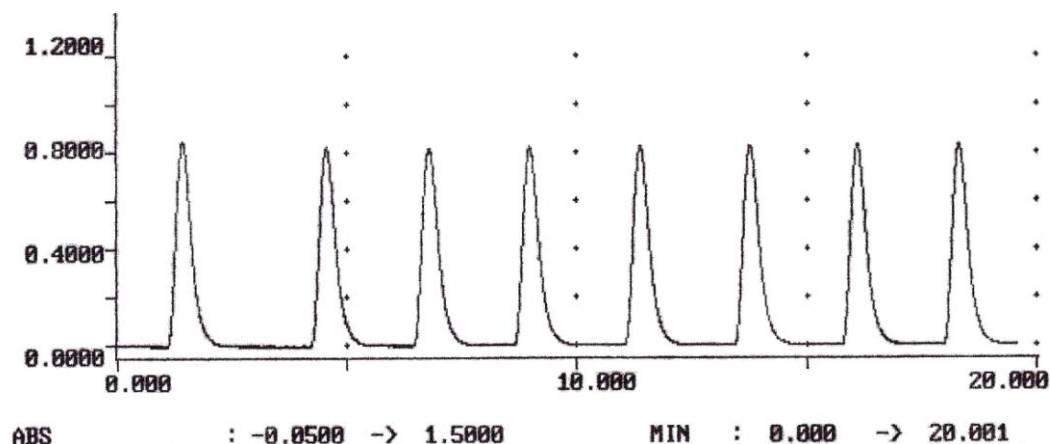


Figura 23. Diagrama de ácido clorogénico, concentración 120 mg/L.

De la curva de calibración se realizó la regresión lineal donde se obtuvo la siguiente ecuación: $A = 0.0069 (\pm 0.0004) [\text{polifenoles mg/L}] + 0.0372 (\pm 0.0434)$. El coeficiente de regresión fue de $R^2 = 0.9984$, con un límite de detección y cuantificación de 11.71 mg/L y 39.04 mg/L y una desviación estándar relativa (DER) de 1.24 %. Los cálculos y las fórmulas para determinar la ordenada al origen, el límite de detección (LD), el límite de cuantificación (LC) y la desviación estándar relativa (DER) se muestran en los anexos II y III. La curva de calibración de ácido clorogénico obtenida puede observarse en la figura 24.

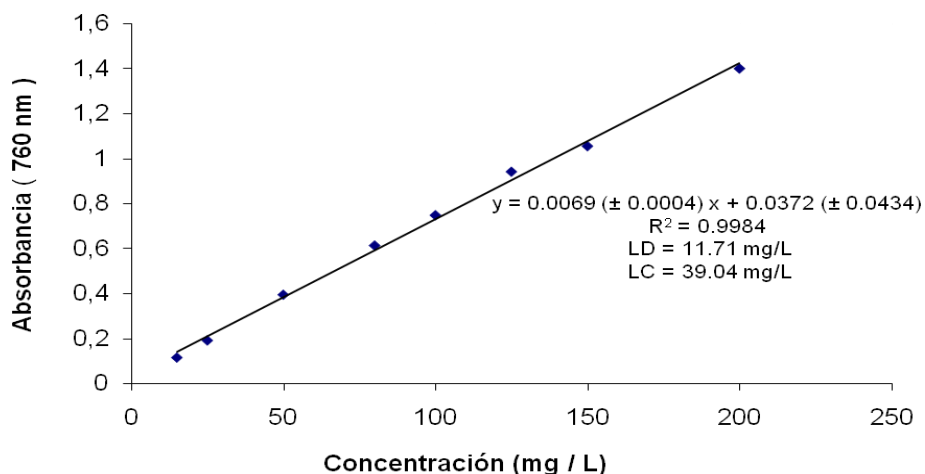


Figura 24. Curva de calibración de ácido clorogénico.

Una de las ventajas del sistema FIA es que entre el tiempo de inyección y el tiempo en que tarda en salir la señal y en regresar a la línea base, se necesitan menos de 1.30 minutos. Por cada estándar o muestra se realizaron tres inyecciones y el resultado que se reporta es el promedio de las tres inyecciones, el tiempo de análisis de un estándar o extracto por triplicado es tan sólo de 4.5 minutos.

3.4 Curva de Calibración de Cafeína en Cloroformo

El segundo paso fue conocer el espectro de absorción de cafeína en cloroformo, por lo que se realizó un barrido de absorción de 200 nm a 400 nm. El espectro de absorción se obtuvo con una disolución de 6 ppm de cafeína en cloroformo. Su máximo de absorción fue a 276 nm (anexo IV).

Posteriormente se realizó la curva de calibración de cafeína en cloroformo en un intervalo de concentraciones de 1 mg/L a 25 mg/L. Al preparar las disoluciones para realizar la curva patrón de cafeína, éstas se pesaron a la concentración requerida utilizando la densidad del cloroformo (1.48 g/mL) para conocer los gramos de disolución madre que se necesitaban para obtener la concentración requerida. En la figura 25 se muestra la curva de calibración de cafeína que se utilizó en este trabajo.

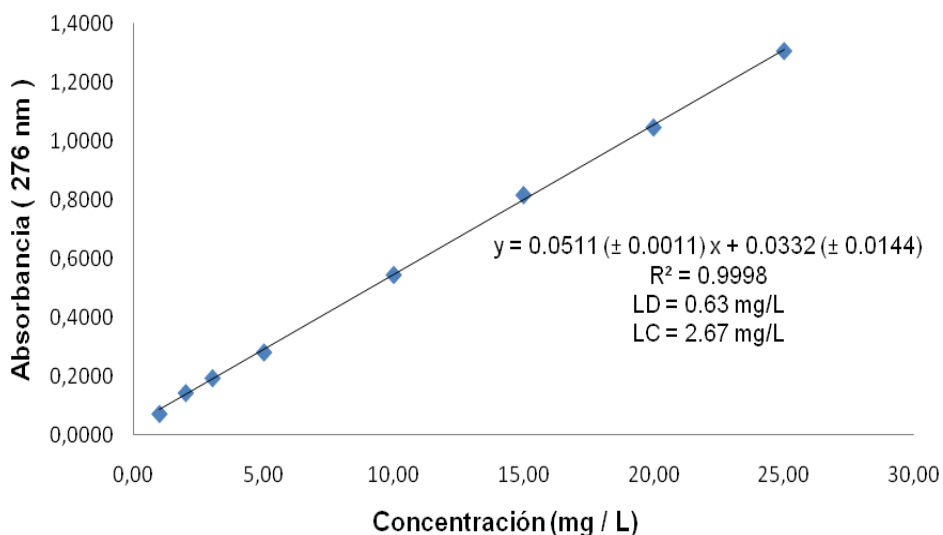


Figura 25. Curva de calibración de cafeína en cloroformo.

De esta curva de calibración se realizó la regresión lineal donde se obtuvo la siguiente ecuación: $A = 0.0511 (\pm 0.0011) [\text{cafeína mg/L}] + 0.0332 (\pm 0.0144)$. El

coeficiente de regresión fue de $R^2 = 0.9998$, con un límite de detección y de cuantificación de 0.63 mg/L y 2.67 mg/L y una desviación estándar relativa de 0.61 %.

Por cada estándar o muestra se realizaron tres mediciones y el resultado que se reporta es el promedio de las tres mediciones.

3.5 Curva de Calibración de Cafeína por Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

La cafeína también se determinó por medio de un sistema FIA, para ello se utilizó una mini-columna de C_{18} . Primero se evaluó una mini-columna de 2.5 cm de longitud y un diámetro de 0.3 cm, pero fue demasiado larga y hubo problemas de sobrepresión, por lo que se decidió probar una mini-columna de 2 cm de longitud y del mismo diámetro, este problema se siguió presentando por lo que se redujo aún más el tamaño a 1.7 cm de longitud y con el mismo diámetro siendo éste adecuado para el sistema FIA.

Para poder retener a la cafeína en la mini-columna de C_{18} se probó un tiempo de retención de 40 segundos y un tiempo de elución de 20 segundos, se observaron señales muy pequeñas y poco definidas; a pesar de tratarse de disoluciones con concentraciones diferentes. Se decidió probar un tiempo de retención de 1 minuto y un tiempo de elución de 30 segundos, se observaron aún señales pequeñas de similares tamaños, por lo que se probó un tiempo de retención de 1.30 minutos y un tiempo de elución de 30 segundos, se observaron señales de diferentes tamaños. Como eluyente se utilizó una disolución buffer de tetraborato de sodio decahidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) 0.05 M pH 10, con esta disolución no se observaron picos bien definidos por lo que se decidió cambiar el eluyente por una disolución de MeOH al 25 %, con esta disolución se observaron picos bien definidos por lo que se decidió utilizar esta disolución como eluyente.

El estándar o muestra desde sus inicios se hizo pasar a un caudal de 0.4 mL/min y el portador se hizo pasar a un caudal de 0.8 mL/min, obteniendo con estos caudales resultados reproducibles, por lo que se utilizaron para todas las determinaciones.

Las condiciones óptimas utilizadas fueron una mini-columna de C_{18} de 1.7 cm de longitud y un diámetro de 0.3 cm, un tiempo de retención de 1.30 minutos, un tiempo de elución de 30 segundos; como eluyente se utilizó una disolución de metanol:agua

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

al 25 %. La muestra se hizo pasar a un caudal de 0.4 mL/min y el portador se hizo pasar a un caudal de 0.8 mL/min.

Para realizar la curva de calibración se probaron tres volúmenes de inyección (50 μ L, 150 μ L y 200 μ L). Se inyectaron disoluciones con concentraciones de 50 mg/L a 2000 mg/L. Con el primer volumen (50 μ L) se observaron señales muy pequeñas y de similares tamaños; a pesar de tratarse de disoluciones con concentraciones diferentes. Con el segundo volumen (150 μ L) se observaron señales medianas, pero de similares tamaños. Con el tercer volumen (200 μ L) se observaron señales de diferentes tamaños con picos bien definidos. Por lo que se decidió utilizar este volumen para realizar la curva de calibración con el sistema FIA mostrado en la figura 21.

El intervalo lineal encontrado fue de 400 mg/L a 1600 mg/L para cafeína con el sistema FIA y se midió a 276 nm.

En la figura 26 se muestra la curva de calibración obtenida.

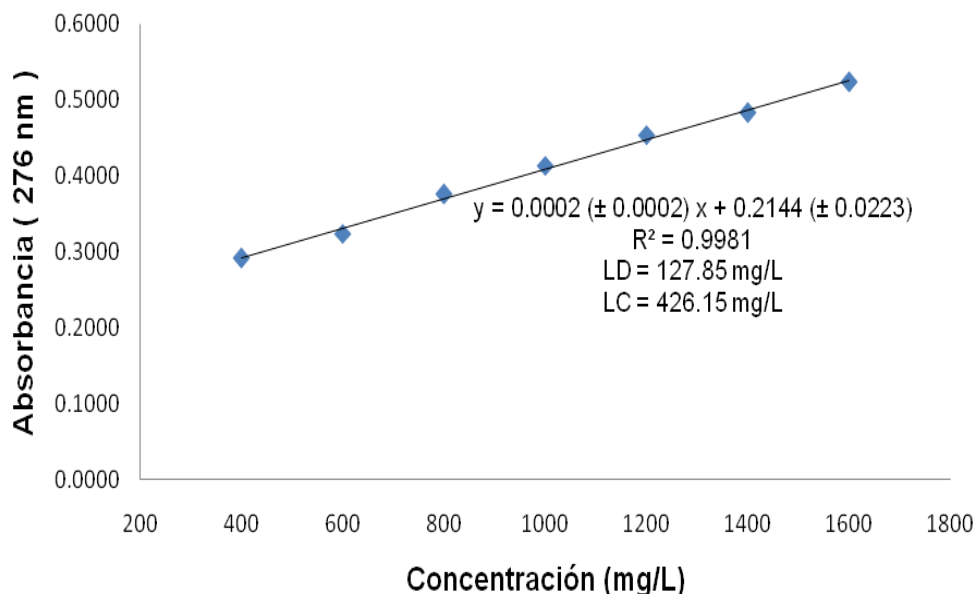


Figura 26. Curva de calibración de cafeína elaborada con el sistema FIA.

De ésta curva de calibración se realizó la regresión lineal donde se obtuvo la siguiente ecuación: $A = 0.0002 (\pm 0.0002) [\text{cafeína mg/L}] + 0.2144 (\pm 0.0223)$. El coeficiente de regresión fue de $R^2 = 0.9981$, con un límite de detección y de

cuantificación de 127.85 mg/L y 426.15 mg/L y una desviación estándar relativa de 0.72 %.

Una de las ventajas del sistema FIA para determinar cafeína, es la eliminación del cloroformo, pues no se necesita extraer la cafeína con cloroformo para poder cuantificarla a través de este sistema.

Se podría ver como desventaja el tiempo en que tarda en salir la señal y en regresar a la línea base, pues se necesitan alrededor de 7 minutos por cada estándar o muestra que se mida a través del sistema FIA; pero al medir a la cafeína a través de este sistema no sólo se está ahorrando extractante, sino tiempo en realizar las extracciones, por lo que esto compensa el tiempo en que se tarda en realizar una medición ya que se acopla en línea la retención, la extracción y la detección. Se realizaron tres inyecciones y el resultado que se reporta es el promedio de las tres inyecciones, el tiempo de análisis de un estándar o muestra por triplicado es de 21 minutos.

La concentración de polifenoles y cafeína en los extractos de café se determinaron por medio de las tres curvas de calibración que fueron evaluadas.

3.6 VALIDACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS

3.7 Evaluación del Sistema FIA para Determinar Polifenoles

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Esta evaluación requiere contar con un estándar de preferencia certificado, o bien realizar el análisis repetido de una muestra, por el mismo analista con el mismo instrumento en un lapso corto de tiempo.

3.7.1 Repetibilidad y Reproducibilidad

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad lo más conveniente es utilizar estándares o muestras que se encuentren en la parte media de la curva de calibración; esto se cumplió con un estándar de ácido clorogénico a una concentración de 120 mg/L. Para ello, se prepararon dos disoluciones diariamente de este estándar y se inyectaron por triplicado durante cinco días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Día	Replica 1 mg/L	Replica 2 mg/L
1	116.28	117.99
2	118.89	119.58
3	119.87	119.51
4	118.79	119.91
5	119.84	118.56
Promedio	118.73	119.11

Tabla 5. Repetibilidad y reproducibilidad de ácido clorogénico.

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), en la tabla 6 se muestran la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl) y los cuadrados medios (CM) entre días y dentro de días.

Fuente	SC	gl	CM
Entre días	8.28326	4	2.070815
Dentro de días	3.2113	5	0.64226
Total	11.49456	9	---

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA).

La variación entre días o repetibilidad (S_r^2) se determinó tomando en cuenta que S_r^2 igual a la media de cuadrados dentro de días. Esto puede verse más claro en la ecuación 5:

$$S_r = \sqrt{CM_{\text{dentro de días}}} \quad (5)$$

Para calcular la reproducibilidad dentro del laboratorio (S_{WR}^2), se determinó de acuerdo a las ecuaciones 6 y 7, donde n_j es el número de replicas por día.

$$S_{\text{entre días}}^2 = (CM_{\text{entre días}} - CM_{\text{dentro de días}}) / n_j \quad (6)$$

$$S^2_{WR} = S^2_r + S^2_{\text{entre días}} \quad (7)$$

S^2_r es la media de cuadrados dentro de días (Miller *et al.*, 2002).

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron del 0.67 % y 0.71 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el sistema FIA propuesto es preciso para la determinación de polifenoles.

3.8 Evaluación del Método para Determinar Cafeína en Cloroformo

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Para ello, también se realizó el análisis repetido de un estándar, por el mismo analista con el mismo instrumento en un lapso corto de tiempo.

3.8.1 Repetibilidad y Reproducibilidad

Se utilizó un estándar que se encontrará en la parte media de la curva de calibración, este fue un estándar de cafeína en cloroformo a una concentración de 13.01 mg/L. Para ello, también se prepararon dos disoluciones diariamente de este estándar y se realizaron tres mediciones durante cinco días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Día	Replica 1 mg/L	Replica 2 mg/L
1	13.05	13.08
2	12.90	13.05
3	12.96	12.98
4	12.86	12.91
5	12.96	13.03
Promedio	12.95	13.01

Tabla 7. Repetibilidad y reproducibilidad de cafeína en cloroformo.

Posteriormente, también se realizó el análisis de varianza (ANOVA), en la tabla 8 se muestran los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Fuente	SC	gl	CM
Entre días	0.032645305	4	0.008161326
Dentro de días	0.01539688	5	0.003079376
Total	0.048042145	9	---

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA).

También se determinó la variación entre días o repetibilidad y la reproducibilidad de acuerdo a las ecuaciones 5, 6 y 7.

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron del 0.43 % y 0.58 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el método para determinar cafeína en cloroformo tiene buena precisión.

3.9 Evaluación del Sistema FIA para Determinar Cafeína

Del mismo modo, que en los dos métodos anteriores se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio para este método.

3.9.1 Repetibilidad y Reproducibilidad

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad de este método también se utilizó un estándar que se encontrará en la parte media de la curva de calibración, este fue un estándar de cafeína a una concentración de 1100 mg/L. Para ello, también se prepararon dos disoluciones diariamente de este estándar y se inyectaron por triplicado durante cinco días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

Día	Replica 1 mg/L	Replica 2 mg/L
1	1100.43	1096.82
2	1084.97	1094.24
3	1092.18	1102.49
4	1093.14	1080.84
5	1094.24	1102.60
Promedio	1092.99	1095.40

Tabla 9. Repetibilidad y reproducibilidad de cafeína por FIA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Posteriormente, también se realizó el análisis de varianza (ANOVA), en la tabla 10 se muestran los resultados.

Fuente	SC	gl	CM
Entre días	240.6452854	4	60.16132134
Dentro de días	213.2289429	5	42.64578859
Total	453.8742283	9	---

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA).

También se determinó la variación entre días o repetibilidad y la reproducibilidad de acuerdo a las ecuaciones 5, 6 y 7.

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron del 0.60 % y 0.65 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el sistema FIA propuesto es adecuado para la determinación de cafeína, con una buena precisión.

3.10 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y CAFEÍNA

3.10.1 Extracción por Agitación Magnética

En primer lugar se probó la extracción por maceración para los dos métodos: método 1: metanol:agua (7:3) a 70 °C por 10 minutos; método 2: agua a 80 °C por 5 minutos. Sin embargo se observó que se obtenía menor cantidad de polifenoles y de cafeína, que cuando se utilizaba la agitación magnética, por ello se prefirió utilizar la agitación magnética la cual generó resultados mucho más reproducibles para ambos métodos de extracción.

3.10.2 Volumen de Extractante y Cantidad de Muestra

Desde los primeros experimentos se utilizó 1 g de muestra y 15 mL de extractante. Al llevar a cabo las diferentes extracciones se observó que se obtenían resultados reproducibles. Sin embargo, para una mejor extracción el volumen óptimo fue de 20 mL.

3.10.3 Métodos de Extracción

Para realizar la extracción de polifenoles y cafeína en los granos de café verde y tostado se decidió utilizar métodos que se han reportado previamente (Ramalakshmi *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009).

Método de extracción 1: Metanol:agua (7:3) a 70 °C con agitación durante 10 minutos.

Método de extracción 2: Agua a 80 °C con agitación durante 5 minutos.

Se realizaron tres extracciones por cada método, tanto para el café verde como para el tostado. Desde los primeros experimentos se obtuvo mayor cantidad de polifenoles y de cafeína con el método 1, por lo que se decidió utilizar este método para realizar todas las extracciones de las muestras de café.

3.10.4 Optimización del Método de Extracción para Polifenoles

Tanto en el método 1 como en el método 2, se observó que después de realizar el último paso de las extracciones, los extractos presentaban demasiada turbidez, principalmente las de café verde, por lo que se decidió filtrar a través de una membrana de nylon de 0.45 μm en un filtro Millipore. El café tostado se filtró rápidamente a través de la membrana de nylon, pero el café verde tardó alrededor de 30 minutos para terminar de filtrarse. Aún así se seguía presentando el mismo problema de turbidez en los extractos, por lo que se optó por buscar un reactivo que eliminará la turbidez del extracto y que no interfiriera con los polifenoles y con la cafeína. Se encontró, en investigaciones anteriores que para quitar la turbidez en los extractos de café se utilizan los reactivos de Carrez. Los reactivos de Carrez precipitan a los polisacáridos, a las proteínas solubles y a otros compuestos coloidales que se encuentran presentes en el café (Long *et al.*, 1997).

Al utilizar los reactivos de Carrez en los extractos de café verde y tostado se observó que ya no presentaban turbidez, por lo que se decidió emplear estos reactivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El pH de los extractos de café se encontró entre 4 y 5.5 antes y después de utilizar los reactivos de Carrez. Por lo que el pH de las muestras de café no cambió al utilizar los reactivos de Carrez.

Para conocer si el pH afectaba en la determinación de polifenoles se realizaron tres extracciones en café planchuela verde sin liofilizar a diferente pH (6, 8 y 12) y al pH de este extracto el cual fue de (4.95). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Muestra	pH	mg polifenoles/g café
Café Planchuela Verde (Sin Liofilizar)	4.95	35.46 ± 2.34
	6.00	34.16 ± 2.77
	8.00	34.20 ± 2.16
	12.00	33.15 ± 1.18

Tabla 11. Contenido de polifenoles en café planchuela verde sin liofilizar a diferente pH.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 11 se obtuvo mayor contenido de polifenoles al pH del extracto (4.95) que a pH 6, 8 y 12; por lo que se decidió realizar la cuantificación de polifenoles al pH de cada extracto.

La cuantificación de polifenoles totales en café verde y tostado se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu.

La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu ocurre en medio básico por los grupos fenólicos de los CGAs o polifenoles.

El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos del café da lugar a un complejo de color azul intenso. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el café, y posee una absorción máxima a 760 nm (Celeste *et al.*, 1992).

Para cuantificar proteínas algunos autores también utilizan el reactivo de Folin-Ciocalteu, por lo que se evaluó esta interferencia. El método de Lowry para cuantificar proteínas utiliza iones Cu^{2+} en medio alcalino. Los iones Cu^{2+} se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos.

Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro y provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de tirosina. La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu también ocurre en medio básico por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina en donde el cobre actúa como catalizador (Lowry *et al.*, 1951). Para conocer si el reactivo de Folin-Ciocalteu reaccionaba con las proteínas en medio alcalino y sin Cu^{2+} , se prepararon disoluciones estándar de albúmina de suero de bovino a una concentración de 5, 50, 100 y 250 ppm y se inyectaron en la configuración FIA mostrada en la figura 20. Al leerse dichas disoluciones a través del sistema FIA, se observó que la disolución de 5 ppm no presentó señal y las disoluciones de 50, 100 y 250 ppm sí presentaron señal en una proporción 6 veces más pequeñas que las obtenidas con ácido clorogénico a las mismas concentraciones. Como la albúmina de suero de bovino se puede cuantificar por este método, aunque es mucho menos sensible, se consideró que las proteínas del café interfieren en la determinación por lo que fue necesario quitarlas del extracto a través de los reactivos de Carrez, para que éstas no sean cuantificadas junto con los polifenoles. El café tiene 1.5 % de proteínas hidrosolubles (Belitz *et al.*, 2004).

También se probó si el reactivo de Folin-Ciocalteu reaccionaba con D-glucosa en medio alcalino. Al leerlo a través del sistema FIA, no se obtuvo señal por lo que los polisacáridos solubles e insolubles no son cuantificados por este método.

Cuando se determinó la cantidad de polifenoles en los extractos se obtuvo mayor cantidad de éstos cuando no se utilizaron los reactivos Carrez que cuando se utilizaron. Esto se debe, a que cuando no se utilizaron estos reactivos, se cuantificó no sólo a los polifenoles del café si no también a otros compuestos (proteínas solubles y compuestos coloidales) que se encuentran en el café. Al utilizar los reactivos de Carrez se obtuvo una mejor reproducibilidad.

3.10.5 Optimización del Método de Extracción para Cafeína

Para conocer si el pH afectaba en la determinación de cafeína con cloroformo se realizaron tres extracciones de cafeína en café planchuela verde sin liofilizar a diferente pH (6, 8 y 12) y al pH de este extracto el cual fue de 4.95. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Muestra	pH	mg cafeína/g café
Café Planchuela Verde (Sin Liofilizar)	4.95	4.49 ± 0.21
	6.00	4.25 ± 0.66
	8.00	4.30 ± 0.80
	12.00	3.60 ± 0.78

Tabla 12. Contenido de cafeína en café planchuela verde sin liofilizar a diferente pH.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 12 se obtuvo mayor contenido de cafeína a pH de 4.95 que a pH 6, 8 y 12; por lo que se decidió realizar las extracciones de cafeína al pH de cada extracto.

Para determinar cafeína por el sistema FIA se trabajó sin cambiar el pH de los extractos en las diferentes muestras de café que se analizaron.

3.11 ANÁLISIS DE MUESTRAS

3.11.1 Cuantificación de Polifenoles en Café Verde Liofilizado y sin Liofilizar

Al moler las muestras de café verde en el molino para café, éstas no quedaron del todo homogéneas por lo que se decidió realizar tres extracciones de una misma muestra de café (café planchuela verde) y otras tres extracciones con el mismo café pero tamizado a través de una malla número 40 para obtener un tamaño de partícula más homogéneo. Al realizar la cuantificación de polifenoles por el sistema FIA no se observó diferencia entre el contenido de polifenoles encontrado con el café sin tamizar y el café tamizado.

Se decidió realizar las extracciones con café verde tamizado para tener un tamaño de partícula más homogéneo y parecido al del café tostado, el cual quedó molido homogéneamente.

Para determinar el contenido de polifenoles en café verde, se liofilizaron 40 g de cada tipo de café verde que se utilizó en este trabajo (planchuela verde, planchuela verde descafeinado y caracolillo). El objetivo de liofilizar las muestras de café fue para eliminar el agua libre de éste y evitar que el café se tostara durante el secado.

Los alimentos de pequeño tamaño se congelarán más rápidamente, dando lugar a cristales de hielo muy pequeños que dañan menos su estructura (Fellows, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La liofilización es una operación unitaria que consiste en la eliminación del agua de un producto por sublimación del agua libre desde la fase sólida. Normalmente este proceso de secado da un producto deshidratado de mayor calidad debido a las bajas temperaturas utilizadas. Estas bajas temperaturas impiden el desarrollo de reacciones de deterioro provocadas por temperaturas elevadas. Por otra parte la estructura rígida del alimento congelado previene daños mecánicos como el encogimiento durante el proceso de secado. El producto final mantiene un buen gusto, aroma, retención de nutrientes, y excelentes propiedades de rehidratación. Sin embargo, el proceso es caro comparado con otros tipos de secado, por una parte por el equipo necesario y por otra por el elevado consumo de energía (Ibarz *et al.*, 2000).

También se determinó el contenido de polifenoles en café verde sin liofilizar, esto se hizo con el objetivo de comparar si el proceso de liofilización afectaba a los polifenoles presentes en el café.

En la figura 27 se muestra el contenido de polifenoles en café verde liofilizado y sin liofilizar.

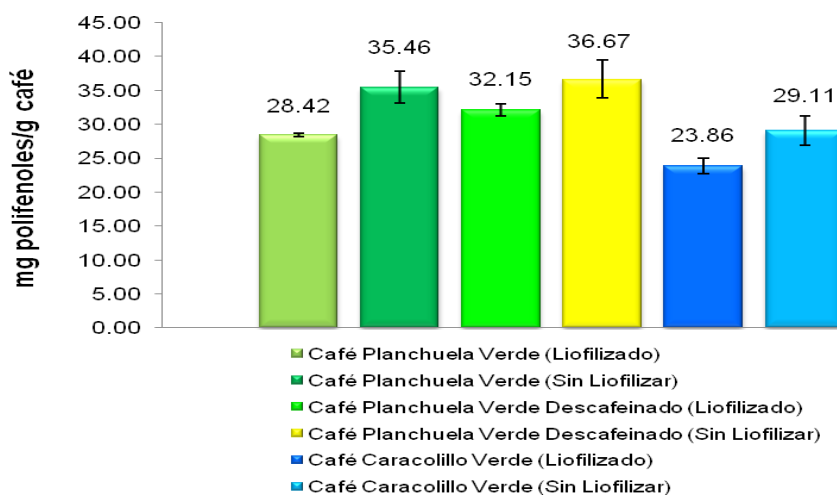


Figura 27. Contenido de polifenoles en café verde liofilizado y sin liofilizar.

El café verde sin liofilizar tuvo mayor cantidad de polifenoles que el café liofilizado; la disminución de compuestos fenólicos pudo darse porque durante el proceso de liofilización algunos de estos compuestos se congelaron junto con el agua libre del café y al ser ésta extraída de las muestras no sólo se perdió al agua libre si no también a algunos fenoles, además de que también se afectó la estabilidad de estos

compuestos durante el proceso de liofilización. Por lo que al realizar su determinación se obtuvo una menor cantidad de estos compuestos en las muestras de café verde liofilizado.

3.11.2 Cuantificación de Polifenoles en Café Verde Secado en Estufa

En primer lugar, se realizó el secado del café verde (planchuela verde, planchuela verde descafeinado y caracolillo) de acuerdo las especificaciones de las Normas Mexicanas, NMX-F-551-SCFI-2008 y NMX-F-552-SCFI-2009 con el objetivo de determinar la humedad de estas muestras y conocer su contenido de polifenoles. En la tabla 13 se muestra la humedad promedio de las determinaciones.

Muestra	Secado (% Humedad)
Café Planchuela Verde	9.00 ± 0.14
Café Planchuela Verde Descafeinado	7.85 ± 0.84
Café Caracolillo Verde	8.15 ± 0.05

Tabla 13. Contenido de humedad en las muestras de café analizadas.

Después de realizar la determinación de humedad en las muestras, se determinó el contenido de polifenoles en el café verde secado en estufa y se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 28.

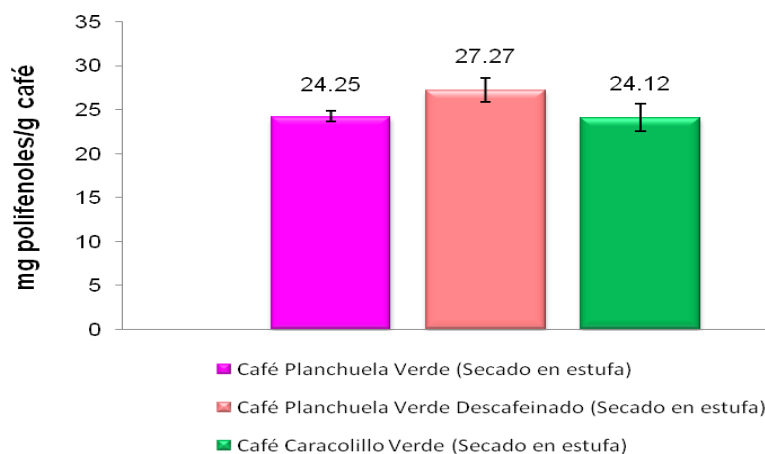


Figura 28. Contenido de polifenoles en café verde secado en estufa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al determinar el contenido de polifenoles en el café verde secado en estufa se encontró que la cantidad de fenoles disminuyó por lo que la temperatura de secado afectó la estabilidad de estos compuestos.

Al comparar el contenido de polifenoles en el café verde cuando se sometió al proceso de liofilización y secado en estufa se obtuvo que la cantidad de polifenoles disminuyó en mayor proporción cuando se secó en estufa que cuando se liofilizó, esto fue más visible en el café planchuela verde y planchuela verde descafeinado; en el caso del café caracolillo verde la cantidad obtenida es la misma estadísticamente esto puede verse más claramente en la tabla 14.

Método	Café Planchuela Verde	Café Planchuela Verde Descafeinado	Café Caracolillo Verde
Liofilización (mg polifenoles / g café)	28.42 ± 0.27	32.15 ± 0.92	23.86 ± 1.14
Sin Liofilizar (mg polifenoles / g café)	35.46 ± 2.34	36.67 ± 2.76	29.11 ± 2.13
Secado en Estufa (mg polifenoles / g café)	24.25 ± 0.60	27.27 ± 1.37	24.12 ± 1.58

Tabla 14. Contenido de polifenoles en café verde liofilizado, sin liofilizar y secado en estufa.

En las muestras de café verde analizado se obtuvo mayor cantidad de polifenoles cuando las muestras no se sometieron a ningún proceso de secado.

Cuando las muestras se liofilizaron se obtuvo una menor proporción de polifenoles en todas las muestras de café. Pero cuando se secaron en estufa, este método afectó más la estabilidad de los polifenoles, por lo que algunos de ellos se descompusieron y se perdieron durante este proceso, por lo que disminuyó aún más la cantidad de estos compuestos en el café planchuela verde y el café planchuela verde descafeinado.

En el café caracolillo verde se obtuvo casi la misma cantidad de polifenoles cuando se liofilizó la muestra que cuando se secó en estufa. Por lo que no se vió tan afectada la estabilidad de estos compuestos con los dos métodos de secado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con los resultados obtenidos en el análisis de estas muestras de café se puede concluir que es mejor no someter a ningún proceso de secado al café verde al que se le quiera cuantificar polifenoles, debido a que la humedad de la muestra no interfiere en la determinación.

3.11.3 Cuantificación de Polifenoles en Café Tostado y en Café Verde Secado en Estufa

También se determinó el contenido de polifenoles en diferentes variedades de café tostado en origen y se compararon con los resultados obtenidos en café verde secado en estufa. En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos.

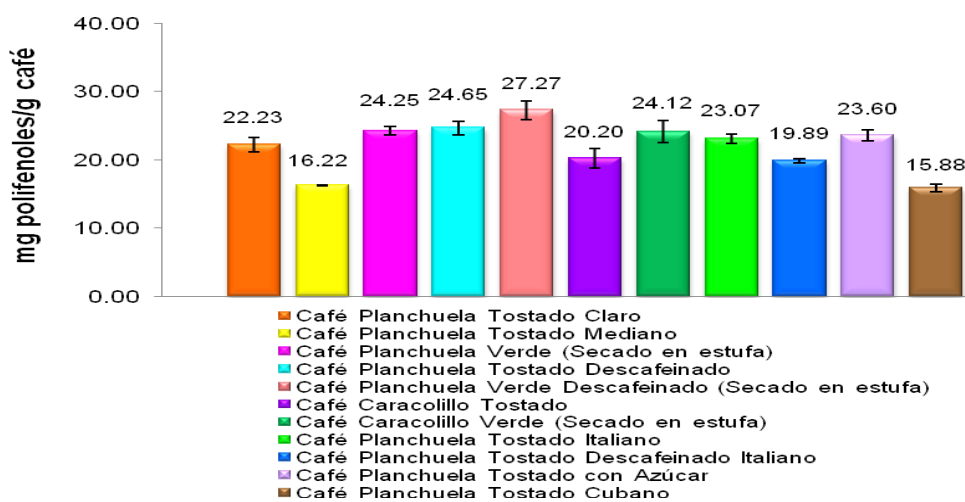


Figura 29. Contenido de polifenoles en café tostado. Se incluyó también a los cafés verdes secados en estufa porque se tostaron durante el secado.

El café planchuela verde descafeinado secado en estufa fue el café que tuvo la mayor cantidad de polifenoles con 27.27 ± 1.37 mg polifenoles/g café seguido del café planchuela tostado descafeinado con 24.65 ± 1.03 mg polifenoles/g café.

El café planchuela verde secado en estufa tuvo 24.25 ± 0.60 mg polifenoles/g café y el café caracolillo verde secado en estufa tuvo 24.12 ± 1.58 mg polifenoles/g café, por lo que no existe una gran diferencia entre el contenido de polifenoles entre estas dos variedades de café.

El café caracolillo verde secado en estufa tuvo 24.25 ± 0.60 mg polifenoles/g café y el café caracolillo tostado tuvo 20.20 ± 1.40 mg polifenoles/g café. Se observó que el café caracolillo tostado tenía un color más oscuro que el café caracolillo secado en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

estufa, por lo que la temperatura de tostado daña a los polifenoles provocando con ello la disminución de éstos en el café que está más tostado.

El café planchuela tostado con azúcar, planchuela tostado italiano y planchuela tostado claro tuvieron una cantidad de polifenoles muy próxima entre ellos, con un rango de 23.60 ± 0.80 mg polifenoles/g café a 22.23 ± 1.06 mg polifenoles/ g café.

El café planchuela tostado descafeinado italiano (19.89 ± 0.33 mg polifenoles/g café), planchuela tostado mediano (16.22 ± 0.07 mg polifenoles/g café) y planchuela tostado cubano (15.88 ± 0.51 mg polifenoles/g café) son lo cafés que tuvieron menos polifenoles.

3.11.4 Evaluación del Sistema FIA para Determinar Polifenoles

Para determinar la precisión del proceso completo (extracción + detección) se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Esta evaluación se realizó con una muestra de café. Para ello, se utilizó al café planchuela tostado cubano, por ser la muestra de café que se tenía en mayor cantidad y porque no sólo sirvió para realizar estas determinaciones sino también para análisis posteriores.

3.11.4.1 Repetibilidad y Reproducibilidad

Para ello se realizaron dos extracciones de café planchuela tostado cubano y se inyectaron por triplicado durante cinco días.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de polifenoles durante los cinco días de análisis.

Día	Replica 1 mg polifenoles/g café	Replica 2 mg polifenoles/g café
1	16.75	16.44
2	16.37	16.22
3	16.88	16.86
4	16.26	16.61
5	16.50	17.01
Promedio	16.55	16.63

Tabla 15. Resultados obtenidos para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA); en la tabla 17 se muestran la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl) y los cuadrados medios (CM) entre días y dentro de días.

Fuente	SC	gl	CM
Entre días	0.4334	4	0.10835
Dentro de días	0.2508	5	0.05016
Total	0.6842	9	---

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA).

También se determinó la variación entre días o repetibilidad y la reproducibilidad de acuerdo a las ecuaciones 5, 6 y 7.

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron del 1.35 % y 1.70 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el método de extracción y el sistema FIA propuesto tiene buena precisión. Sin embargo, es importante mantener controlada la temperatura (70 °C) durante el tiempo de extracción (10 minutos) y que ésta no aumente para que los polifenoles no se descompongan y así obtener una mejor repetibilidad y reproducibilidad.

3.12 Cuantificación de Cafeína por Extracción con Cloroformo

3.12.1 Extractos clorofórmicos

3.12.1.1 Café Verde

Las tres extracciones realizadas para café molido, sin tamizar y tamizado que se utilizaron para determinar polifenoles fueron también utilizadas para determinar cafeína después de la extracción con cloroformo.

No se observó diferencia entre el contenido de cafeína en el café sin tamizar y el café tamizado por lo que las extracciones de cafeína podían hacerse de ambas formas. Se decidió realizar las extracciones con café tamizado para un mejor manejo de las muestras y para tener un tamaño de partícula más homogéneo y parecido al del café tostado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación de cafeína también se hizo en café verde liofilizado y sin liofilizar. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.

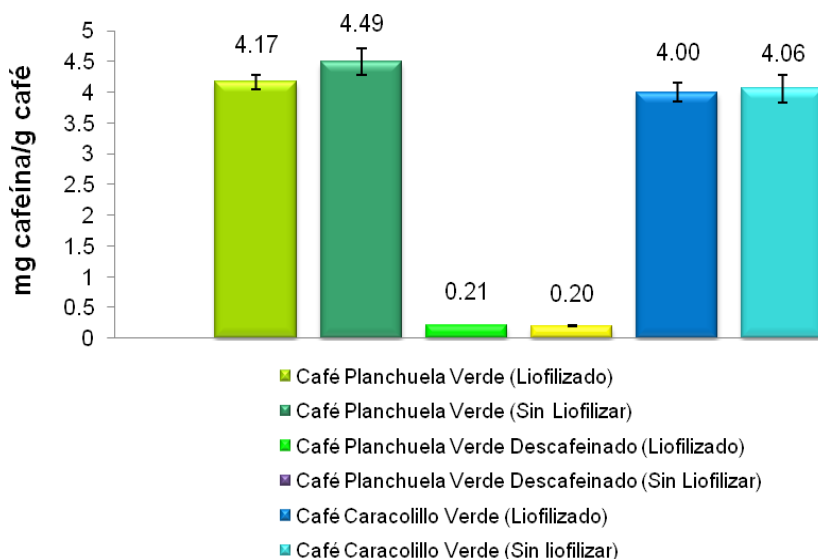


Figura 30. Contenido de cafeína en café verde.

Después de realizar la determinación de cafeína en las diferentes variedades de café verde se observa que no existe una diferencia significativa entre el contenido de cafeína en el café verde liofilizado y sin liofilizar.

3.12.1.2 Café Verde Secado en Estufa

Después de secar al café verde (planchuela verde, planchuela verde descafeinado y caracolillo) de acuerdo a las Normas Mexicanas, NMX-F-551-SCFI-2008 y NMX-F-552-SCFI-2009 y de determinar la humedad (tabla 13) y la cantidad de polifenoles presentes en estas muestras de café, se determinó su contenido de cafeína; los resultados obtenidos se muestran en la figura 31.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

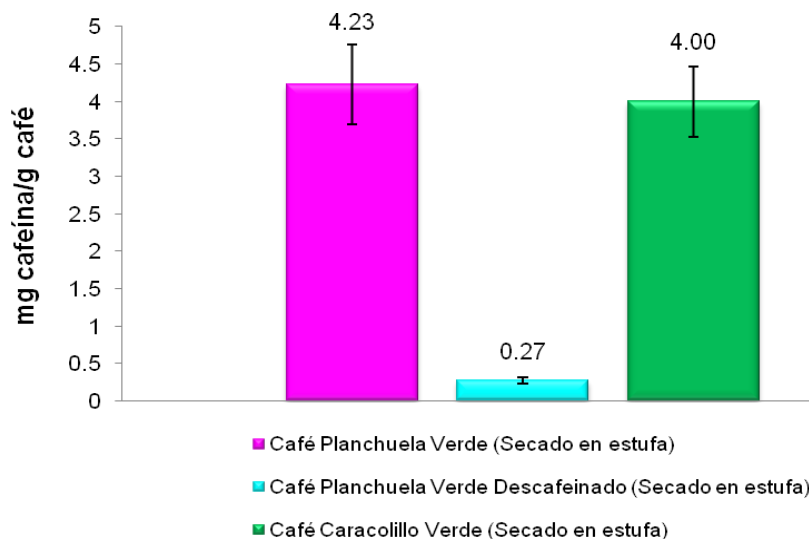


Figura 31. Contenido de cafeína en café verde secado en estufa.

En las tres muestras de café verde analizado se obtuvo casi la misma cantidad de cafeína tanto en el café liofilizado, no liofilizado y secado en estufa. Ésto se muestra más claramente en la tabla 18.

Método	Café Planchuela Verde	Café Planchuela Verde Descafeinado	Café Caracolillo Verde
Liofilización (mg cafeína/g café)	4.17 ± 0.12	0.21 ± 0.01	4.00 ± 0.15
Sin Liofilizar (mg cafeína/g café)	4.49 ± 0.21	0.20 ± 0.01	4.06 ± 0.22
Secado en Estufa (mg cafeína/g café)	4.23 ± 0.53	0.27 ± 0.05	4.00 ± 0.47

Tabla 17. Contenido de cafeína en café verde liofilizado, sin liofilizar y secado en estufa.

La cafeína es una sustancia química termoestable, y sólo sufre una pequeña pérdida por sublimación a 178 °C. Sin embargo, se ha observado, que en algunos casos el porcentaje de cafeína incrementa ligeramente durante el tueste, pero esta circunstancia se explica por la disminución de peso en el grano de café debido a las

pérdidas orgánicas (Astiasarán *et al.*, 2000). Esto fue más evidente en el café planchuela verde descafeinado secado en estufa que en los cafés planchuela verde y caracolillo secados por el mismo método.

Para determinar el contenido de cafeína en las muestras de café verde es mejor no someter a ningún tratamiento previo de secado al café, pues el agua libre del café no interfiere en la determinación, además de que se ahorra tiempo y se obtienen resultados muy parecidos entre sí.

El método de secado en estufa es un método rápido y preciso que nos sirvió para conocer la humedad de las muestras, y no afectó a la cafeína presente en las muestras de café, es considerado un buen método de secado para el café y otros alimentos.

3.12.1.3 Café Tostado en Origen

También se determinó el contenido de cafeína en diferentes variedades de café tostado. En la figura 32 se muestran los resultados obtenidos.

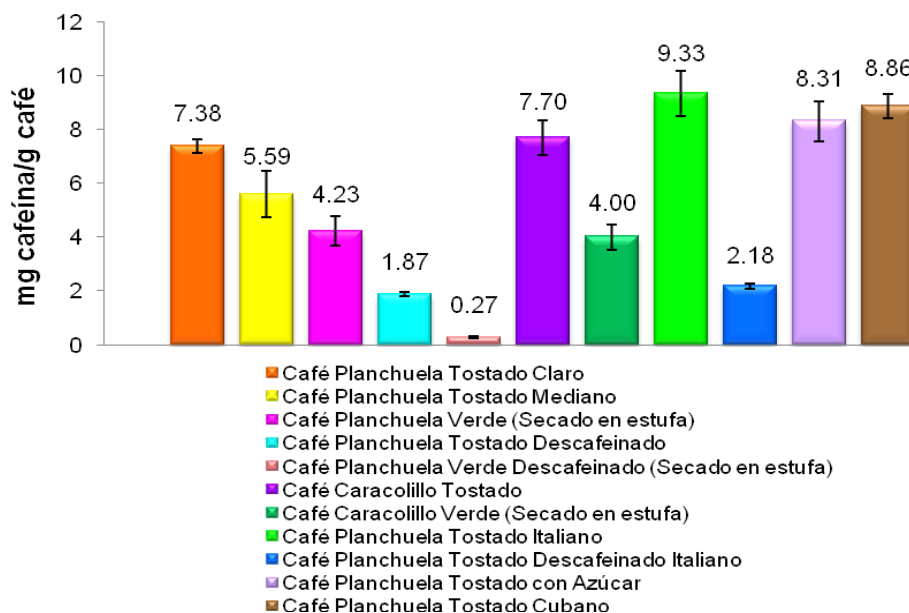


Figura 32. Contenido de cafeína en diferentes tipos de café tostado. Se incluyó también a los cafés verdes secados en estufa porque se tostaron durante el secado.

Al determinar el contenido de cafeína en las diferentes variedades de café tostado, el café planchuela tostado italiano fue el café que tuvo la mayor cantidad de cafeína (9.33 ± 0.85 mg cafeína/g café) seguido del café planchuela tostado cubano ($8.86 \pm$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

0.45 mg cafeína/g café) y del café planchuela tostado con azúcar (8.31 ± 0.74 mg cafeína/g café).

El café caracolillo tostado tuvo mayor cantidad de cafeína (7.70 ± 0.65 mg cafeína/g café) que el café caracolillo secado en estufa (4.00 ± 0.47 mg cafeína/g café), esto se debe a que existen diferentes calidades de café y aunque sean de la misma variedad no siempre tienen la misma calidad.

3.13 Evaluación de la Extracción de Cafeína con Cloroformo

Para conocer la precisión del método global (extracción de cafeína del grano + extracción de cafeína con cloroformo) se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Para ello, se utilizó nuevamente al café planchuela tostado cubano.

3.13.1 Repetibilidad y Reproducibilidad

Se realizaron dos extracciones de café planchuela tostado cubano y tres mediciones de cada una durante cinco días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18.

Día	Replica 1 mg cafeína/g café	Replica 2 mg cafeína/g café
1	9.49	9.33
2	9.91	9.82
3	9.19	9.42
4	9.83	8.96
5	9.75	9.51
Promedio	9.63	9.41

Tabla 18. Resultados obtenidos para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad.

También se realizó el análisis de varianza (ANOVA). En la tabla 19 se muestran la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl) y los cuadrados medios (CM) entre días y dentro de días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Fuente	SC	gl	CM
Entre días	0.41014	4	0.102535
Dentro de días	0.45055	5	0.09011
Total	0.86069	9	---

Tabla 19. Análisis de varianza (ANOVA).

También se determinó la variación entre días o repetibilidad y la reproducibilidad de acuerdo a las ecuaciones 5, 6 y 7.

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron de 3.15 % y 3.26 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el método para determinar cafeína con cloroformo es adecuado por tener una buena precisión.

3.14 Cuantificación de Cafeína Acoplado la Retención y la Extracción a un Sistema FIA

También se realizó la cuantificación de cafeína a través del sistema FIA utilizando una mini-columna de C₁₈. Con el desarrollo del método FIA para determinar cafeína no sólo se buscó cuantificar la cafeína presente en las muestras de café sino también eliminar el uso del cloroformo.

El método FIA para determinar cafeína es menos sensible que el método de extracción de cafeína con cloroformo, por lo que no se pudo utilizar para cuantificar cafeína en las muestras de café que tenían menos de 5 mg cafeína/g café ni en los cafés descafeinados, debido a que se utilizaron de 3 a 5 g de café para realizar las extracciones en los cafés analizados a través de este sistema. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la figura 33.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

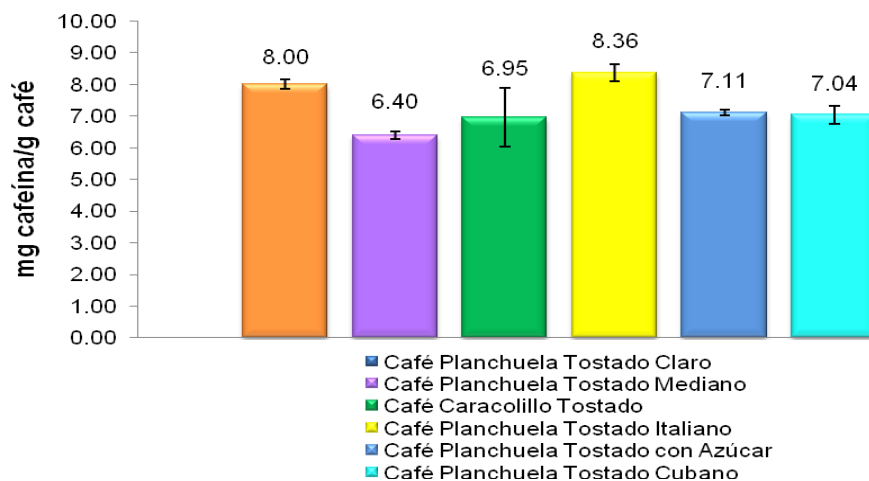


Figura 33. Contenido de cafeína en diferentes variedades de café tostado determinado con el sistema FIA utilizando una mini-columna de C_{18} .

3.15 Comparación entre la Extracción de Cafeína con Cloroformo y el Método FIA para Determinar Cafeína

Al realizar la determinación de cafeína por el sistema FIA se observa que algunos valores son menores que cuando se realizó la extracción con cloroformo, esto se muestra en la tabla 20.

Muestra	Determinación de cafeína por extracción con cloroformo (mg cafeína/g café)	Determinación de cafeína por FIA (mg cafeína/g café)
Café Planchuela Tostado Claro	7.38 ± 0.25	8.00 ± 0.15
Café Planchuela Tostado Mediano	5.59 ± 0.86	6.40 ± 0.12
Café Caracolillo Tostado	7.70 ± 0.65	6.95 ± 0.93
Café Planchuela Tostado Italiano	9.33 ± 0.11	8.36 ± 0.58
Café Planchuela Tostado con Azúcar	8.31 ± 0.74	7.11 ± 0.09
Café Planchuela Tostado Cubano	8.86 ± 0.45	7.04 ± 0.28
Media	7.86 ± 0.51	7.31 ± 0.36

Tabla 20. Determinación de cafeína realizada por dos métodos diferentes en las mismas variedades de café.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el objetivo de conocer si había diferencia significativa entre el método por extracción con cloroformo (oficial) y el método propuesto se llevó a cabo un análisis estadístico.

Con los resultados de la tabla 20 se llevó a cabo un estudio de contraste F para comparar las varianzas entre el método de extracción con cloroformo y el método FIA para determinar cafeína, tomando como hipótesis nula que las varianzas entre los dos métodos son iguales. El estadístico F se calculó de acuerdo a la ecuación 8, donde s_1 y s_2 son los cuadrados de las desviaciones estándar de cada método.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (8)$$

El valor de F que se obtuvo fue de 3.31 y el valor crítico es de 7.15 ($p = 0.05$ en contraste de dos colas). Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre las dos varianzas y se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto la comparación entre medias se hizo utilizando las ecuaciones 9 y 10 y se propone la hipótesis nula de que las medias obtenidas en los dos métodos de estudio son iguales.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (9)$$

donde s se calcula a partir de la ecuación:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (10)$$

y $|t|$ tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad y x_1 y x_2 son las medias de los métodos evaluados.

Existen 10 grados de libertad, así que el valor crítico de $|t|$ es de 2.23 ($p=0.05$ en contraste de dos colas). El valor experimental de $|t|$ es de 0.89, por lo que la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

diferencia entre los dos métodos no resulta significativa a un nivel de significancia del 5 %. Se puede concluir que los resultados obtenidos entre los dos métodos son iguales aceptando la hipótesis nula de que no existe diferencia significativa entre los dos métodos.

El sistema FIA es un buen método para determinar cafeína, no sólo porque no utiliza cloroformo sino también porque se ahorra tiempo y reactivos, además de que no genera residuos tóxicos, aunque para poder utilizarlo en cafés con poco contenido de cafeína sería necesario hacer extracciones con mayor cantidad de grano y de extractante (metanol:agua) o acoplar una columna de preconcentración.

3.15.1 Recobro de Cafeína en Café Planchuela Tostado Cubano

Para asegurar que no existían interferencias por efectos de la matriz, por el método FIA se hicieron tres extractos de café planchuela tostado cubano, en los cuales se cuantificó la concentración de cafeína empleando la configuración FIA propuesta. Posteriormente, se preparó una disolución estándar de cafeína en agua a una concentración de 1000 mg/L. A continuación se tomaron otros 5 mL del extracto y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL y se agregaron 5 mL de la disolución de 1000 mg/L de cafeína en agua, se mezcló todo y se inyectó al sistema FIA por triplicado.

En la tabla 21 se muestran los resultados obtenidos al fortificar los extractos de café planchuela tostado cubano.

Muestra	Concentración de referencia (mg/L)	Concentración encontrada (mg/L)	Recobro (%)
Café Planchuela Tostado Cubano	1350.25	1422.74	105.37
	1345.97	1413.51	105.02
	1343.92	1357.29	100.99

Tabla 21. Recobros de los extractos de café planchuela tostado cubano fortificados con cafeína.

Los recobros de los tres extractos de café planchuela tostado estuvieron en un intervalo entre 100.99 % y 105.37 %. Por lo tanto, podemos decir que no hay

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

interferencias de matriz apreciables en la determinación de cafeína realizada a través del sistema FIA en las muestras analizadas.

3.15.2 Repetibilidad y Reproducibilidad de la Extracción y Cuantificación de Cafeína por FIA

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Se utilizó nuevamente al café planchuela tostado cubano. Se realizaron dos extracciones de este café y se inyectaron por triplicado durante cinco días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Día	Replica 1 mg cafeína/g café	Replica 2 mg cafeína/g café
1	7.03	6.81
2	7.64	6.33
3	6.56	6.73
4	7.96	8.36
5	7.17	7.04
Promedio	7.27	7.05

Tabla 22. Resultados obtenidos para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), en la tabla 23 se muestran la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl) y los cuadrados medios (CM) entre días y dentro de días.

Fuente	SC	gl	CM
Entre días	2.71286	4	0.678215
Dentro de días	0.98515	5	0.197030
Total	3.69801	9	---

Tabla 23. Análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

También se determinó la variación entre días o repetibilidad y la reproducibilidad de acuerdo a las ecuaciones 5, 6 y 7.

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron de 6.20 % y 9.24 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el método para determinar cafeína a través del sistema FIA es adecuado por tener una buena precisión. Aunque este valor es superior al encontrado cuando la extracción se hace manualmente con cloroformo, sigue siendo menor al 10 %, valor que es aceptable cuando se trabaja en ese nivel de concentraciones. Al trabajar con la mini-columna de C₁₈ es importante empacarla correctamente, cambiarla diariamente antes de realizar cualquier determinación y que siempre sea del mismo tamaño (1.7 cm) para obtener mejores resultados.

IV. CONCLUSIONES

- En la extracción de polifenoles y cafeína la mayor cantidad de estos analitos se obtuvo al pH del extracto (4.0-5.5). El pH de las muestras de café que se analizó se encontró entre estos valores.
- El proceso de liofilización afectó el contenido de polifenoles en los granos de café verde analizado (planchuela verde, planchuela verde descafeinado y caracolillo verde); debido a que estas muestras se sometieron a bajas temperaturas durante la liofilización (-41 °C a -50 °C) y a una presión de vacío de (0.045 mbar) lo que afectó la estabilidad de estos compuestos obteniendo con ello menor cantidad de polifenoles en el café liofilizado que en el café sin liofilizar.
- En las tres muestras de café verde que se analizaron se obtuvo menor cantidad de polifenoles cuando las muestras de café se secaron en estufa que cuando se liofilizaron, por lo que la temperatura de secado (130 °C \pm 2 °C) afectó más la estabilidad de éstos compuestos. Esto se observó más claramente en los cafés tostados en origen en donde los cafés que tenían mayor grado de tueste tuvieron menor cantidad de polifenoles.
- Las muestras de café verde analizado tuvieron mayor contenido de polifenoles cuando no se sometieron a ningún método de secado (liofilización y secado en estufa). El contenido de humedad no intervino en la determinación de polifenoles.
- El proceso de liofilización y secado en estufa no afectó a la cafeína presente en los granos de café verde analizado, debido a que la cafeína es una sustancia química termoestable y sólo sufre una pequeña pérdida por sublimación a 178 °C.
- En los cafés tostados en origen se obtuvo mayor contenido de cafeína en los cafés que tenían mayor grado de tueste, esto se debe a que durante el tostado el café tiene mayores pérdidas orgánicas, por lo que el grano tiene menor peso y el porcentaje de cafeína incrementa ligeramente.

- No se encontró que existiera una relación directa entre el contenido de polifenoles y el contenido de cafeína en los cafés verdes y tostados analizados.
- El sistema FIA utilizado para la determinación de polifenoles demostró ser preciso, exacto y rápido (1.30 minutos por inyección); lo que lo convierte en un buen método para determinar polifenoles en café.
- El método FIA para determinar cafeína, es menos sensible que el método por extracción con cloroformo, sin embargo el método FIA acopla en línea la retención, la extracción y la detección, por lo que ahorra tiempo y reactivos, no utiliza cloroformo y no genera residuos tóxicos.
- Los sistema FIA utilizados para determinar polifenoles y cafeína reducen el tiempo de análisis y producen resultados reproducibles, además de que logran disminuir la cantidad de reactivos que se utilizan al hacer el análisis de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá, S. E. Desarrollo y Validación de un Método para la Determinación de Cafeína en Alimentos Mediante el Uso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Tesis, Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2007.
- Amarowicz, R.; Carle R.; Dongowski G.; Durazzo A.; Galensa R.; Kammerer D.; Maiani G.; Piskula M. K. Influence of Postharvest Processing and Storage on the Phenolic Acids and Flavonoids in Foods. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009, 53: S151-S183.
- Aresta, A.; Palmisano F.; Zambonin C. G. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine, Theophylline, Paraxanthine and Nicotine in Human Milk by Liquid Chromatography with Diode Array UV Detection. *Food Chemistry*. 2005, 93: 177-181.
- Astiasarán, A. I.; Martínez Hernández J. A. Alimentos. Composición y Propiedades. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, 2000. Pág. 239-249.
- Avello, M.; Sulwasky M. Radicales Libres, Antioxidantes Naturales y Mecanismos de Protección. Atenea. 2006, 494: 161-172.
- Badui, D. S. Diccionario de Tecnología de los Alimentos. Alhambra. México, 1996. Pág. 68.
- Belitz, H. D.; Grosh W.; Schieberle P. Food Chemistry. Tercera edición alemana. 2004. Pág. 939-951.
- Cámara de Diputados. H. Congreso de la Unión. Centro de Estudios de las Finanzas Públicas. El Mercado del Café en México. Palacio Legislativo de San Lázaro D. F., Diciembre de 2001. Pág. 1-35.

- Cañizares, M. M. P.; Duarte Lisci G. A. Fundamentos de Química Analítica. Segunda edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2009. Pág.286.
- Castillo, M. J. M. A. Obtención Enzimática de Ácido Cafeico a Partir de Ácido Clorogénico Recuperado de Café Verde. Tesis, Químico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2007.
- Celeste, M.; Tomás C.; Cladera A.; Estela J. M.; Cerda V. Enhanced Automatic Flow-Injection Determination on the Total Polyphenol Index of Wines Using Folin-Ciocalteu Reagent. *Analytica Chimica Acta*. 1992, 269: 21-28.
- Chen, Q. CH.; Mou S.; Hou X.; Ni Z. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Foods and Pharmaceutical Preparations by Using Ion Chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 371: 287-296.
- Chin, L. K.; Noirot M.; Hamon S. Comparasion of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffe Beans (*Coffea* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45: 786-790.
- Clifford, M. N. Chlorogenic Acids and Other Cinnamates –Nature Occurrence, Dietary Burden, Absorption and Metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, 80: 1033-1043.
- Clifford, M. N. Chlorogenic Acids and Other Cinnamates-Nature Occurrence and Dietary Burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999, 79: 362-372.
- Clifford, M. N.; Knight S.; Suruku B.; Kuhnert N. Characterization by LC-MSⁿ of Four New Classes of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans: Dimethoxycinnamoylquinic Acids, Diferuloylquinic Acids, Caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic Acids, and Feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54: 1957-1969.

- Clifford, M. N. Marks S.; Knight S.; Kuhnert N. Characterization by LC-MSⁿ of Four New Classes of p-Coumaric Acid-Containing Diacyl Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54: 4095-4101.
- Danache, R. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Tr. Ester Boix. Omega. Barcelona, 1990. Pág.83.
- De Maria, C. A. B.; Trugo L. C.; Moreira R. F. A. Simultaneous Determination of Total Chlorogenic Acid, Trigonelline and Caffeine in Green Coffee Samples by High Performance Gel Filtration Chromatography. Food Chemistry. 1995, 52: 447-449.
- Dillenburg, M. A. Optimisation of a CE Method for a Caffeine Analysis in Decaffeinated Coffee. Food Chemistry. 2010, 120: 1155-1161.
- Eau, S. C.; Jin J. Y.; Kyung H. M.; Joo K. N.; Won L. K.; Joo L. H. Attenuation of Oxidative Neuronal Cell Death by Coffe Phenolic Phytochemicals. Mutation Research. 2000, 664: 18-24.
- Faller, A. L. K.; Fialho E. Polyphenol content and Antioxidant Capacity in Organic and Conventional Plant Foods. Journal Food Composition and Analysis. 2010, XXX: XXX-XXX.
- Farah, A.; De Paulis T.; Trugo L. C.; Martín P. R. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53: 1505-1513.
- Fellows, P. Tecnología del Procesado de los Alimentos: Principios y Prácticas. Tr. Francisco Javier Sala Trepant. Acribia. Zaragoza (España), 1994. Pág. 421-432.
- Ferrer, P. P. Efectos Anticancerosos de Polifenoles Naturales: Peterostilbeno y Quercetina. Tesis, Doctoral. Universidad de Valencia. España, 2008.

- Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª. edición. Reverté. México, 2001. Pág. 500-502.
- Hart, F. L.; Johnstone F.H. Análisis Moderno de los Alimentos. 2ª. reimpresión. Tr. Justino Burgos González. Acribia. Zaragoza (España), 1991. Pág. 115-130.
- Horts, D. T. Fundamentos de Tecnología de los Alimentos. Tr. Fernando González Fierro-Marcilla. Acribia. Zaragoza (España), 2001. Pág. 27-30.
- Horwitz, W.; Latimer G. W. Official Methods of Analysis. 18ª. edición. Estados Unidos, 2006. Capítulo 30, pág. 3.
- Huang, D.; Ou B.; Prior R. L. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53: 1841-1856.
- Ibarz, R. A.; Barbosa C. G. V.; Garza G. S.; Gimeno A. V. Métodos Experimentales en la Ingeniería Alimentaria. Acribia. Zaragoza (España), 2000. Pág. 117-119.
- Jiménez, M. T. S. Determinación del Contenido de Agua en Muestras de Especies y Granos de Café por Medio de la Extracción Asistida con Ultrasonido y la Detección con el Reactivo de Karl Fisher en Línea. Tesis, Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2007.
- Kirk, R. S.; Sawyer R.; Egan H. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Tr. José Luis Ríos y Pérez y María Teresa Aguilar Ortega. 2ª. edición. Continental. México, 1996. Pág. 398-410.
- Long, K. C.; Noiro M.; Hamon, S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (Coffea sp.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997, 45 (3): 786-790.
- López, M. L.; López de Alba P. L.; García C. R.; De León R. L. M. Simultaneous Determination of Methylxanthines in Coffees and Teas by UV-VIS

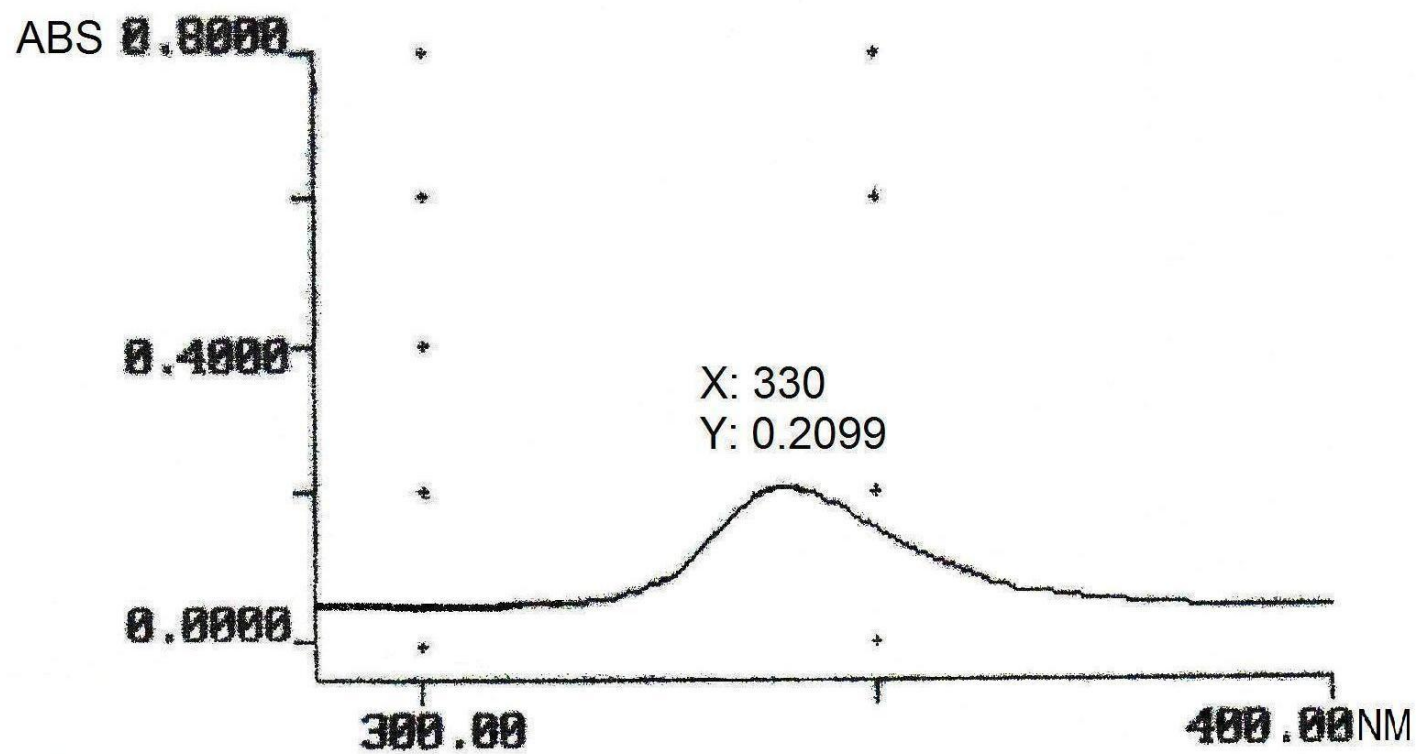
- Spectrophotometry and Partial Leas Squares. Analytica Chimica Acta. 2003, 493:83-94.
- Lowry, O. H.; Rosebrough N. J.; Lewis F. A.; Randall R. J. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. Journal Biological Chemistry. 1951, 193: 265-275.
 - Meyer, A.; Ngiruwonsanga T. Determination of Adenine, Caffeine, Theophylline and Theobromine by HPLC with Amperometric Detection. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 1996, 356:284-287.
 - Miller, J. C.; Miller J. N. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª. edición. Pearson educación. 2002. Pág. 59-65, 97-101 y 111-127.
 - Nogueira, T.; Lucio do Lago C. Determination of Caffeine in Coffee Products by Dynamic Complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and Separation by CZE. Electrophoresis. 2007, 28: 3570-3574.
 - Norma Mexicana, NMX-551-SCFI-2008. Café Verde. Especificaciones, Preparaciones y Evaluación Sensorial. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial: México, 2008.
 - Norma Mexicana, NMX-F-552-SCFI-2009. Café Verde Descafeinado Especificaciones y Métodos de Prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial: México, 2009.
 - Nutri Pro. Café: Donde Quiera, Cuando Quiera y Como Quiera. Revista de Nutrición Nestlé Professional. 1-11, Consultada en Agosto de 2010.
 - Orozco, G. J. M. Desarrollo de un Método Automatizado Para la Determinación de Metales Pesados con Ditizona Micelar por Análisis por Inyección en Flujo. Tesis, Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2007.

- Pat, M. C. Ultracongelación de Alimentos. Tr. Juan Antonio Ordóñez Pereda y Marco Antonio Díaz Hernández. Acribia. Zaragoza (España), 1987. Pág. 106-107.
- Perrone, D.; Marino D. C.; Farah A. Fast Simultaneous Analysis of Caffeine, Trigonelline, Nicotinic Acid and Sucrose in Coffee by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Food Chemistry. 2008, 110: 1030-1035.
- Petracco, M. Our Everyday Cup of Coffe: The Chemisty Behind Its Magic. Journal of Chemical Education. 2005, 82: 1161-1167.
- Pomilio, A. B.; Trajtemberg S. P.; Vitale A. A. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Methylxanthines-containing Beverages: Discussion of the Molecular Species Involved. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2005, 85: 622-628.
- química.unam.mx/IMG/pdf/7cloroformo, 3-marzo-2010.
- Ramalakshmi, K.; Rahath K. I.; Mohan R. L. J. Antioxidant Potential of Low-Grade Coffe Beans. Food Research International. 2008, 41: 96-103.
- Ruíz, B. A. Desarrollo de un Método Automático Para Determinar Vitamina C. Tesis, Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2006.
- Ruzicka, J.; Hansen E.H. Flow Injection Analyses: Part I. A New Concept of Fast Continuos Flow Analysis. Analitica Chimica Acta. 1975, 78: 145-157.
- Ruzicka, J.; Hansen E. H. Inject Analysis. Analytical Chemistry. 2000, March 1: 212-217.
- Scott, A. Understanding Microwaves. Wiley – Interscience. 1993. Pág. 3-19.
- Shrivas, K.; Fen Wu H. Rapid Determination of Caffeine in One Drop of Beverages and Foods Usin Drop-to-Drop Solvent Microextraction with Gas

- Cromatography/Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A. 2007, 1170: 9-14.
- Skoog, D. A.; Holler J. F.; Nieman T. A. Principios de Análisis instrumental. 5ª edición. Mc. GrawHill. España, 2001. Pág. 897-918.
 - Solís, L. D.; Herrera C. H. Desarrollo de un Método de Análisis para la Cuantificación de Ácidos Clorogénicos en Café. Agronomía Costarricense. 2005, 29 (2): 99-107.
 - Spătaru, N.; Sarada B.; Tryk D. A.; Fujishima A. Anodic Voltammetry of Xanthine, Theophylline, Theobromine and Caffeine at Conductive Diamond Electrodes and Its Analytical Application. Electroanalysis. 2002, 14 (11): 721-728.
 - Sun, C. E.; Jin J. Y.; Kyung H. M.; Joo K. N.; Won L. K.; Joo L. H. Attenuation of Oxidative Neuronal Cell Death by Coffee Phenolic Phytochemicals. Mutation Research. 2009, 661: 18-24.
 - The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Décimo tercera edición. Staff. Estados Unidos, 2001. Pág. 357 y 1639.
 - Trugo, L.C.; De Maria A. B.; Werneck C. C. Simultaneous Determination of Total Chlorogenic Acid and Caffeine in Coffee by High Performance Gel Filtration Chromatography. Food Chemistry. 1991, 42: 81-87.
 - Valcárcel, C. M.; Luque de Castro M. D. Análisis por Inyección en Flujo. Departamento de Química Analítica. Córdoba (España), 1984. Pág. 47-65, 109-135.
 - Wei, Y. L.; Dong C.; Shuang S. M.; Liu D. S. Study for Luminescence Performance of Tree Methyl Xanthine Derivatives. Spectrochimica Acta Part A. 2005, 61: 2584-2589.

- Willard, H. H.; Merritt L. L.; Dean J.A.; Settle F. A. Métodos Instrumentales de Análisis. 4^a. reimpresión. Continental. México, 1992. Pág. 48-49.

Espectro de Absorción de Ácido Clorogénico (CGA)



Validación de la Curva de Calibración de Ácido Clorogénico

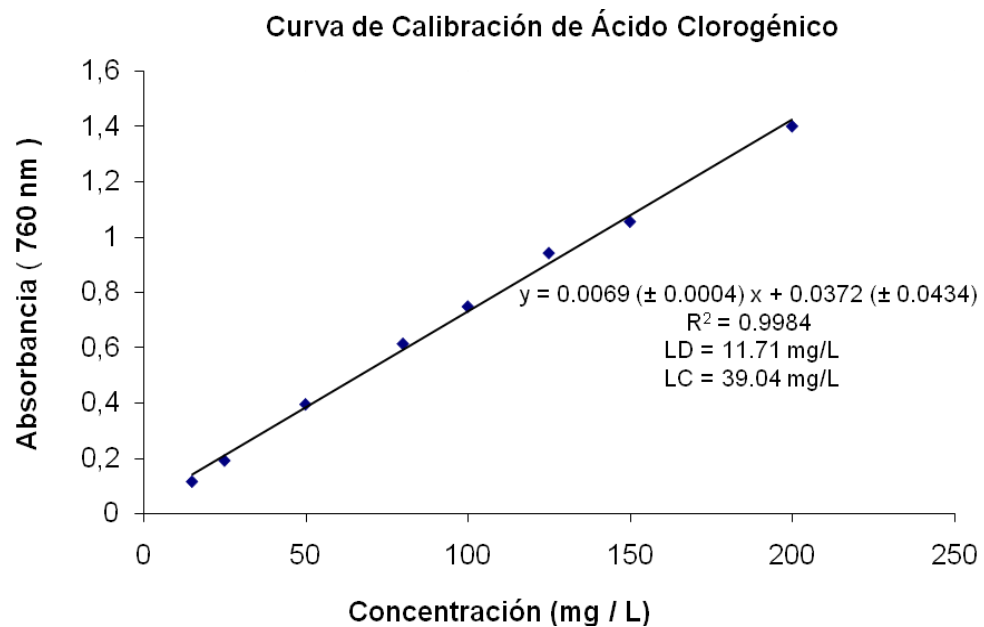
Concentración (mg / L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	DS	y = mx + b y = 0.0069x + 0.0372	
15	0.1143	0.1143	0.1195	0.1160	0.0030	Pendiente (m) 0.0069 Ordenada (b) 0.0372 Regresión 0.9984	
25	0.1923	0.1923	0.1923	0.1923	0		
50	0.4040	0.3913	0.3913	0.3955	0.0073		
80	0.6059	0.6186	0.6186	0.6144	0.0073		
100	0.7574	0.7579	0.7318	0.7490	0.0149		
125	0.9468	0.9468	0.9342	0.9426	0.0073		
150	1.0730	1.0351	1.0604	1.0562	0.0193		
200	1.4139	1.4012	1.3886	1.4012	0.0127		

Concentración (mg / L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia 4	Absorbancia 5	Absorbancia 6	Absorbancia 7
120	0.8441	0.8211	0.8134	0.8211	0.8211	0.8211	0.8288

Absorbancia Promedio	Desviación Estándar	CV
0.8244	0.0098	1.18 %

Concentración calculada (mg / L)	Conc. 1 (mg / L)	Conc. 2 (mg / L)	Conc. 3 (mg / L)	Conc. 4 (mg / L)	Conc. 5 (mg / L)	Conc. 6 (mg / L)	Conc. 7 (mg / L)
	116.2833	112.9687	111.8590	112.9687	112.9687	112.9687	114.0784

Concentración Promedio (mg / L)	Desviación Estándar (mg / L)	CV
113.44	1.41	1.24 %



x	x ²	y	y ²	(x-x̄) ²	(y-ȳ) ²
15	225	0.1160	0.1413	6103.5156	0.0006
25	625	0.1923	0.2107	4641.0156	0.0003
50	2500	0.3955	0.3842	1859.7656	0.0001
80	6400	0.6144	0.5923	172.2656	0.0005
100	10000	0.7490	0.7311	47.2656	0.0003
125	15625	0.9426	0.9046	1016.0156	0.0014
150	22500	1.0562	1.0781	3234.7656	0.0005
200	40000	1.4012	1.4250	11422.2656	0.0006
93.1250	97875			28496.8750	0.0044
Promedio	Suma			Suma	Suma

S y / x	0.0271		Límite de detección:
Desv. Std. Pend.	0.0002		$y = b + 3 S x / y$ 0.12
Desv. Std. Ord.	0.0177	Pendiente 0.0069±0.0004	$y = 0.0069x + 0.0372$ 11.71
t (6, 0,05)	2.4469	Ordenada 0.0372±0.0434	Límite de cuantificación:
t * DS Pend.	0.0004		$y = b + 10 S x / y$ 0.31
t * DS Ord.	0.0434		$y = 0.0069x + 0.0372$ 39.04
			DER 1.24 %

Validación de la Curva de Calibración de Cafeína en Cloroformo

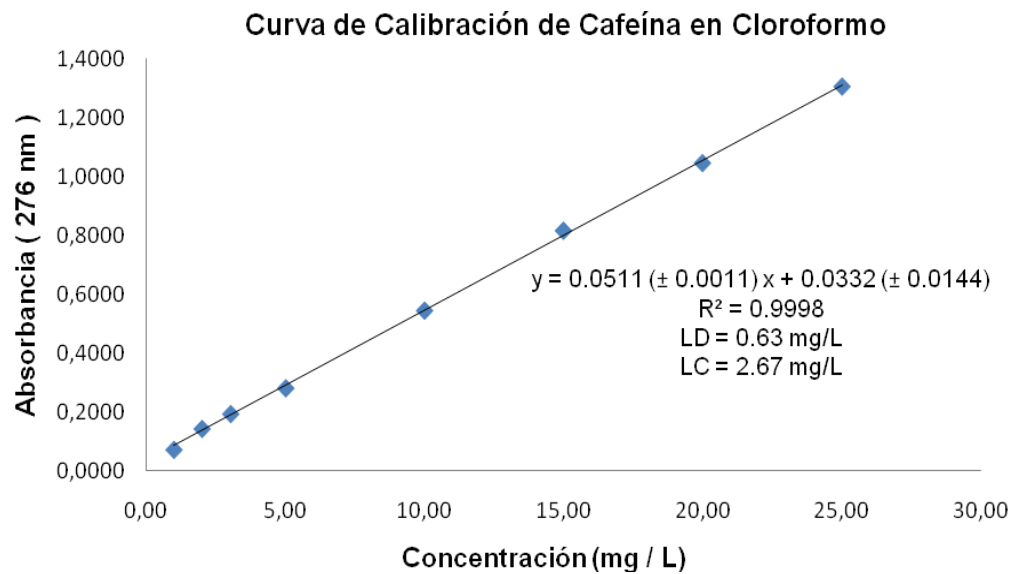
Concentración (mg / L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	DS	y = mx + b y = 0.0511x + 0.0332	
1.00	0.0724	0.0722	0.0726	0.0724	2.00E-04	Pendiente (m) Ordenada (b) Regresión	0.0511 0.0332 0.9998
2.01	0.1461	0.1430	0.1411	0.1434	2.52E-03		
3.04	0.1937	0.1936	0.1944	0.1939	4.36E-04		
5.02	0.2816	0.2822	0.2811	0.2816	5.51E-04		
10.01	0.5459	0.5446	0.5453	0.5453	6.51E-04		
15.00	0.8140	0.8191	0.8176	0.8169	2.62E-03		
20.00	1.0440	1.0479	1.0486	1.0468	2.48E-03		
25.02	1.3050	1.3075	1.3079	1.3068	1.57E-03		

Concentración (mg / L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia 4	Absorbancia 5	Absorbancia 6	Absorbancia 7
13.01	0.6915	0.6995	0.6920	0.6998	0.6950	0.6980	0.6901

Absorbancia Promedio	Desviación Estándar	CV
0.6951	0.0040	0.58%

Concentración calculada (mg / L)	Conc. 1 (mg / L)	Conc. 2 (mg / L)	Conc. 3 (mg / L)	Conc. 4 (mg / L)	Conc. 5 (mg / L)	Conc. 6 (mg / L)	Conc. 7 (mg / L)
	12.8911	13.0478	12.9009	13.0537	12.9597	13.0184	12.8637

Concentración Promedio (mg / L)	Desviación Estándar (mg / L)	CV
12.96	0.08	0.61%



x	x ²	y	y ²	(x-x̄) ²	(y-ȳ) ²
1.00	1.0000	0.0724	0.0843	83.4939	0.0001
2.01	4.0401	0.1434	0.1359	66.0563	5.6611E-05
3.04	9.2416	0.1939	0.1885	50.3745	2.9474E-05
5.02	25.2004	0.2816	0.2896	26.1888	6.3617E-05
10.01	100.2001	0.5453	0.5444	0.0163	8.4435E-07
15.00	225.0000	0.8169	0.7992	23.6439	0.0003
20.00	400.0000	1.0468	1.0545	97.2689	5.9319E-05
25.02	626.0004	1.3068	1.3108	221.4888	1.6313E-05
10.14	1390.6826			568.5314	0.0007
Promedio	Suma			Suma	Suma

S y / x	0.0107		Límite de detección:
Desv. Std. Pend.	0.0004		$y = b + 3 S y / x$ 0.07
Desv. Std. Ord.	0.0059	Pendiente 0.0511±0.0011	$y = 0.0511x + 0.0332$ 0.63
t (6, 0,05)	2.4469	Ordenada 0.0332±0.0144	Límite de cuantificación:
t * DS Pend.	0.0011		$y = b + 10 S y / x$ 0.14
t * DS Ord.	0.0144		$y = 0.0511x+0.0332$ 2.67
			DER 0.61 %

Validación de la Curva de Calibración de Cafeína por FIA

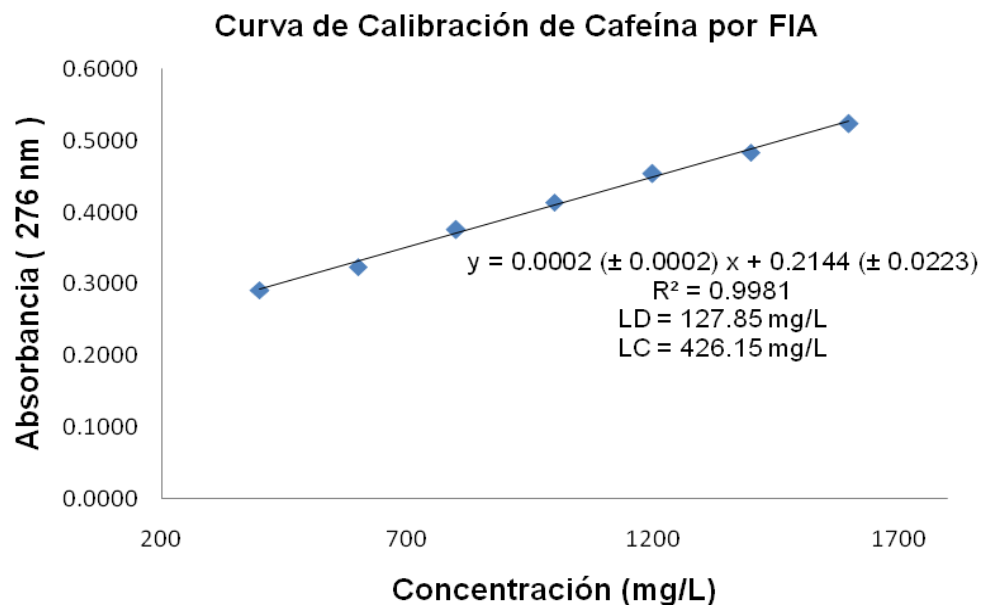
Concentración (mg / L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	DS	y = mx + b y = 0.0002x + 0.2144	
400	0.2925	0.2909	0.2909	0.2914	9.2400E-04	Pendiente (m) Ordenada (b) Regresión	0.0002 0.2144 0.9981
600	0.3198	0.3283	0.3241	0.3241	4.2501E-03		
800	0.3898	0.3742	0.3638	0.3759	1.3086E-02		
1000	0.4106	0.4158	0.4158	0.4141	3.0022E-03		
1200	0.4470	0.4574	0.4574	0.4539	6.0044E-03		
1400	0.4886	0.4834	0.4782	0.4834	5.2000E-03		
1600	0.5198	0.5250	0.5250	0.5233	3.0022E-03		

Concentración (mg / L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia 4	Absorbancia 5	Absorbancia 6	Absorbancia 7
1100	0.4292	0.4285	0.4262	0.4280	0.4276	0.4296	0.4254

Absorbancia Promedio	Desviación Estándar	CV
0.4278	0.0015	0.36 %

Concentración calculada (mg / L)	Conc. 1 (mg / L)	Conc. 2 (mg / L)	Conc. 3 (mg / L)	Conc. 4 (mg / L)	Conc. 5 (mg / L)	Conc. 6 (mg / L)	Conc. 7 (mg / L)
	1074	1070.5	1059	1068	1066	1076	1055

Concentración Promedio (mg / L)	Desviación Estándar (mg / L)	CV
1066.93	7.66	0.72 %



x	x ²	y	y ²	(x-x̄) ²	(y-ȳ) ²
400	160000	0.2914	0.2944	360000	8.8011E-06
600	360000	0.3241	0.3344	160000	0.0001
800	640000	0.3759	0.3744	40000	2.3511E-06
1000	1000000	0.4141	0.4144	0	1.1111E-07
1200	1440000	0.4539	0.4544	40000	2.1778E-07
1400	1960000	0.4834	0.4944	160000	0.0001
1600	2560000	0.5233	0.5344	360000	0.0001
1000	8120000			1120000	0.0004
Promedio	Suma			Suma	Suma

S y / x	0.0085		Límite de detección:
Desv. Std. Pend.	8.7234E-05		$y = b + 3 S x / y$ 0.24
Desv. Std. Ord.	0.0087	Pendiente 0.0002±0.0002	$y = 0.0002x+0.2144$ 127.85
t (5, 0,05)	2.5706	Ordenada 0.2144±0.0223	Límite de cuantificación:
t * DS Pend.	0.0002		$y = b + 10 S x / y$ 0.30
t * DS Ord.	0.0223		$y = 0.00019x+0.2156$ 426.15
			DER 0.72 %

ECUACIONES PARA EVALUAR LA LINEALIDAD Y PARÁMETROS DE ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA PARA VALIDAR LOS MÉTODOS

- **Ecuación de la línea recta:**

$$y = mx + b$$

$y =$ Variable dependiente ;

$m =$ Pendiente;

$x =$ Variable independiente;

$b =$ Ordenada al origen

- **Pendiente:**

$$m = \frac{\sum_i \left\{ \left(x_i - \bar{x} \right) \left(y_i - \bar{y} \right) \right\}}{\sum_i \left(x_i - \bar{x} \right)^2}$$

$\bar{x} =$ Media de los valores de x ;

$\bar{y} =$ Media de los valores de y .

- **Ordenada al origen:**

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

- **Coefficiente de correlación:**

$$r = \frac{\sum_i \left\{ \left(x_i - \bar{x} \right) \left(y_i - \bar{y} \right) \right\}}{\left[\sum_i \left(x_i - \bar{x} \right)^2 \right] \left[\sum_i \left(y_i - \bar{y} \right)^2 \right] }^{\frac{1}{2}}$$

- **Estadístico $S_{y/x}$ (estimador de errores aleatorios en la dirección y):**

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2}{n-2}}$$

$\hat{y}_i =$ Valor de y ajustado por la recta de regresión para un determinado valor de x .

- **Desviación estándar de la pendiente:**

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i \left(x_i - \bar{x} \right)^2}}$$

- **Desviación estándar de la ordenada al origen:**

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i \left(x_i - \bar{x} \right)^2}}$$

- **Intervalo de confianza para la pendiente:**

$$IC(m) = m \pm (t_{0.95, n-2})(Sm)$$

- Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC(b) = b \pm (t_{0.95, n-2})(Sb)$$

- Media aritmética (promedio):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Desviación estándar relativa:

$$DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

- Límite de detección (LOD):

$$LD = y_b + 3S_b$$

- Residuos de y:

$$R_{y_i} = y_i - \hat{y}_i$$

- Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

- Intervalo de confianza de la media de muestras pequeñas:

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \times \frac{S}{\sqrt{n}}$$

- Límite de cuantificación:

$$LC = y_b + 10S_b$$

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA COMPARAR MÁS DE DOS MEDIAS

$$H_0 = \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 \dots \bar{x}_i$$

- Estadístico F.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrados Medios (CM)	F
Entre días	$SC_{inter} = \sum_{i=1} \frac{T_i^2}{n} - \frac{T^2}{N}$	$g.l._{inter} = h - 1$	$CM_{inter} = \frac{SC_{inter}}{g.l._{inter}}$	$F = \frac{MC_{inter}}{MC_{intra}}$
Dentro de días	$SC_{intra} = SC_{Total} - SC_{inter}$	$g.l._{intra} = N - h$	$CM_{intra} = \frac{SC_{intra}}{g.l._{intra}}$	-----
Total	$SC_{Total} = \sum_{i=1} \sum_{j=1} x_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$	$g.l._{intra} = N - 1$	-----	-----

Donde:

N = Número total de mediciones.

h = Número de muestras.

n = Número de mediciones por muestra.

T = Suma de todas las mediciones.

T_i = Suma de las mediciones en la muestra i .

$\sum_{i=1} \sum_{j=1} x_{ij}^2$ = Suma del cuadrado de cada medición j en la muestra i .

- Valor crítico para F y criterio de rechazo de H_0 .

➤ Valor crítico para F con $g.l._{inter}$ y $g.l._{intra}$ para el numerador y denominador.

$\alpha = 0.05$, 95 % de confianza.

➤ Si el valor de F es mayor a $F_{crítica}$ se rechaza H_0 .

➤ Si al calcular la probabilidad con el estadístico F, si la probabilidad es menor a 0.05 se rechaza H_0 .

Espectro de Absorción de Cafeína en Cloroformo

