

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE
MÉXICO
TUXTLA GUTIÉRREZ**



Departamento de Química y Bioquímica

Licenciatura en Ingeniería Química

Informe Técnico de residencia

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDO
CLOROGÉNICO A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE
CAFÉ VERDE (coffea arabica L.)**

PRESENTA:

Valeria Jazmín Pérez Cruz

ASESOR INTERNO

ING. Mazariegos Morales Marco Antonio

REVISORES

ING. Farrera Alcázar Roció

M. C. Rodríguez Meneses Amín

ASESOR EXTERNO

Dra. Guadalupe María Guatemala Morales (CIATEJ)

Guadalajara, Jalisco. junio de 2018



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a Dios, por la vida, la fuerza y las ganas de seguir siempre adelante alcanzando mis metas.

A mis padres por su apoyo, guía y enseñanza que nunca hay que rendirse.

A la Dra. Guadalupe María Guatemala Morales por permitirme de la más cordial manera desarrollar mi residencia profesional en las instalaciones de planta piloto en CIATEJ normalistas dentro del proyecto titulado: “ *Obtención de extractos de café verde para uso alimentario y cosmeceutico*” apoyado por el fondo FORDECYT (2018-2020), en el cual es la Responsable Técnico.

A los compañeros de CIATEJ, Dafne, Priscilla, Elisa, Ester, Alondra, Manuel y Naún por compartirme su experiencia y conocimientos y que juntos son un gran equipo.

Y, por último, pero no menos importante, a mi asesor el Ing. Maco Antonio Mazariegos Morales y mis asesores, la Ing. Roció Farrera Alcázar y el M. C. Amín Rodríguez Meneses por sus valiosos, necesarios conocimientos y orientación para la culminación de este estudio.

RESUMEN

Se estudió en una extracción por maceración y con agitación, el efecto al variar la temperatura, la relación sólido/solvente, solvente/solvente y el tiempo de contacto para la obtención de ácido clorogénico. Las muestras a tratar fueron subproductos de café verde. Los ácidos clorogénicos son una familia de compuestos polifenólicos presentes en gran cantidad en el café verde, pero se le atribuye el nombre al isómero más abundante (5-CQA). La concentración de 5-CQA en el extracto se cuantificó por cromatografía (HPLC) de fase reversa. Los resultados obtenidos indican que las condiciones recomendables para obtener un extracto con alta concentración de ácido clorogénico fue con una relación sólido/solvente de 25, con un tiempo de contacto de 45 minutos y una relación 50:50 relación de etanol:agua en un proceso a 30°C. La concentración de ácido clorogénico en el extracto fue de 44.166 mg de A. C./g de café verde para la variedad arábica (*coffea arabica*).

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA U ORGANIZACIÓN Y DEL PUESTO O AREA DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE | 6 |
| PROBLEMAS A RESOLVER..... | 6 |
| Caracterización de la materia prima: | 6 |
| Definir las condiciones de extracción por maceración con agitación:..... | 7 |
| Cuantificación del compuesto por HPLC:..... | 7 |
| OBJETIVOS..... | 7 |
| GENERAL..... | 7 |
| ESPECÍFICOS..... | 7 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 8 |
| MARCO TEÓRICO | 8 |
| Café verde | 8 |
| Ácido clorogénico..... | 11 |
| Transferencia de masa | 14 |
| Extracción..... | 14 |
| Clasificación | 15 |
| Extracción sólido-líquido..... | 15 |
| Maceración..... | 17 |
| Variables durante el proceso de extracción. | 18 |
| Agitación:..... | 18 |
| Temperatura | 18 |
| pH..... | 18 |

| | |
|--|----|
| Tiempo | 18 |
| Cromatografía | 19 |
| Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)* | 19 |
| Detectores HPLC | 20 |
| PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS | 21 |
| Preparación de la materia prima: Molienda, Tamizado y calculo de humedad | 21 |
| Método experimental | 22 |
| Extracción por maceración con agitación y calentamiento..... | 22 |
| Materiales..... | 24 |
| Procedimiento: | 25 |
| Procedimiento para determinación y cuantificación de ácido clorogénico por HPLC. | 26 |
| Preparación de la curva de calibración..... | 26 |
| Cuantificación del ácido clorogénico | 29 |
| Procedimiento: | 30 |
| RESULTADOS | 31 |
| Áreas obtenidas para la curva de calibración..... | 31 |
| PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO PARA LOS EXPERIMENTOS | 31 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 36 |
| COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS..... | 37 |
| FUENTES DE INFORMACIÓN | 40 |

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos más consumidos mundialmente, es considerado como materia prima y ocupa el segundo lugar después del petróleo. La principal actividad económica del café es la bebida o infusión preparada a partir del tostado y molienda del café, así mismo tiene una alta demanda en el mercado por sus múltiples beneficios terapéuticos y nutricionales debido a los componentes contenidos en el grano, siendo los antioxidantes los de mayor interés, estos a su vez están formados por compuestos polifenólicos siendo los ácidos clorogénicos (CGA) lo que están presentes en mayor cantidad en el café (Payen, 1816).

Actualmente se sabe que los CGA son una familia de esteres formados por ácidos hidroxicinámicos y el ácido quínico, dentro de esta familia el 5-CQA conocido como ácido clorogénico por ser el isómero más abundante (Clifford, 1999), formado por el ácido quínico y el ácido cafeíco (Fisher, Dangschat.1932). En particular para el 5-CQA se ha reportado una concentración en café verde *Coffea arabica* de entre 10 y 55 mg/g seco (Farah *et al.*, 2005)

Con respecto a los procesos a los que se somete el café verde para la obtención de productos, mucho del volumen usado de esta materia prima está destinado para ser un subproducto o meramente un desecho, adjunto a este problema y con la información sobre la obtención del ácido clorogénico resulta el interés y beneficio, aprovechar adecuadamente los granos desechados para darle un valor agregado al producto, por lo que se planteó y realizó la extracción sólido líquido del ácido clorogénico y se evaluó la concentración en diferentes condiciones de extracción, la cuantificación se obtuvo con ayuda de un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) marca waters y una columna C-18 de fase reversa (Kromasil, 250 x 4.6 mm, 5µm, Akzo Nobel) y con una longitud de onda de 325 nm, mediante el área del pico cromatográfico y la curva de calibración se pudo obtener la concentración del ácido clorogénico, teniendo como resultado que a una temperatura de 30 °C, relación solido/solvente de 25, tiempo de 45 min y con un porcentaje de etanol en el

solvente del 50% se obtuvo 44.166 mg de ácido clorogénico/gr de café verde que, con ayuda de este estudio se realizaran otras determinaciones a nivel industrial.

DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA U ORGANIZACIÓN Y DEL PUESTO O AREA DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) es un Centro de Investigación que pertenece a la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación del Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). Desde hace más de 40 años hemos realizado actividades de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación, además ofrecemos servicios tecnológicos y de formación de recursos humanos especializados con programas de posgrado (maestrías y doctorados), educación continua (capacitación) e iniciación a la investigación (estancias y tesis de pregrado). Todo ello para ofrecer soluciones tecnológicas y de capital humano que contribuyan a mejorar la competitividad de los sectores agropecuarios, alimentos y bebidas, salud animal y humana, medio ambiente y energía sustentable.

PROBLEMAS A RESOLVER

Caracterización de la materia prima:

- ✚ Reducción de tamaño a través de un molino industrial para café, para después determinar el tamaño promedio de partícula para ello se requiere el uso del tamizador RO-TAP con mallas de #20, 24, 40, 60, 100, 120, 150., siguiendo la

metodología de la norma NMX-F-013-2000 para cálculo de humedad para posteriores cálculos de concentración del ácido clorogénico.

Definir las condiciones de extracción por maceración con agitación:

- ✚ La técnica de extracción por maceración se basa en poner en contacto la matriz sólida (café verde) con el solvente, se debe probar y realizar un diseño de experimentos 2^4 variando la relación sólido/solvente, tiempo, temperatura y relación solventes, ya que son los principales factores que influyen en el proceso de extracción y que afectan a la variable de respuesta que es la concentración del compuesto 5-CQA en el extracto.
- ✚ Asegurar la transferencia de calor: para ello es necesario montar el equipo a escala laboratorio compuesto por una manta calefactora y un vaso de precipitado de 500 ml se basa en el calentamiento indirecto de la solución a extraer por convección isotérmica desde el medio líquido.

Cuantificación del compuesto por HPLC:

- ✚ La determinación de la concentración de ácido clorogénico mediante HPLC se realizó en un cromatógrafo marca Waters®, revisar cumplimiento del método a usar en el programa en este caso PALOMA, revisar las condiciones de operación como volúmenes de inyección y elución de las muestras y la presión de la columna.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la concentración de ácido clorogénico a partir de subproductos de café verde de la variedad arábica (*Coffea arabica*).

ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones de extracción por maceración del ácido clorogénico a partir de las muestras de café verde

- Identificar y cuantificar el ácido clorogénico (5-CQA) de los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
- Identificar el extracto con mayor contenido de 5-CQA

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo tiene como objetivo obtener un extracto acuoso de ácido clorogénico a partir de subproductos de café verde. El trabajo consiste en probar un método de extracción por maceración ejecutado en el laboratorio de planta piloto del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ). El CIATEJ es un Centro de investigación especializado en alimentos y bebidas. La Dra. Guadalupe M. Guatemala investigadora en el área de Tecnología Alimentaria en CIATEJ ha estado trabajando en desarrollo de tecnología para la obtención del compuesto de interés y poder llevar la técnica a escala industrial. Con este desarrollo se pretende obtener el estudio preliminar de la técnica; así también un beneficio hacia nuestro país, principalmente a los productores de este grano ya que mucha de esta materia prima como se mencionaba antes termina siendo un subproducto o desecho, aprovechando su estado para dándole valor agregado y que se obtenga un beneficio.

MARCO TEÓRICO

Café verde

El café es el producto alimenticio más importante del mundo y ocupa el segundo lugar, después del petróleo crudo, entre todos los productos básicos. Unos 60 países tropicales y subtropicales producen café extensivamente, siendo para algunos de ellos el principal producto de exportación agrícola (Lashermes, Andrade, y Etienne, 2008; Vieira, 2008). La importancia económica del café se debe principalmente a la infusión de café o bebida, una infusión preparada a partir de los granos tostados y molidos. La mayoría de las bebidas de café que se consumen en el mundo son producidas por las especies *Coffea arabica* L. (Arábica) y *Coffea canephora* (Robusta). El primero se considera superior debido a sus

propiedades sensoriales (Bertrand, Guyot, Anthony y Lashermes, 2003). Los granos de café o semillas están contenidos en el fruto del arbusto, los cuales en estado de madurez toman un color rojizo y se les denomina "cereza", la Figura 1 muestra las partes de este fruto. Cada una de ellas consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa dulce. El fruto del café cuyas semillas tostadas y molidas se utilizan para el consumo humano está compuesto, de afuera hacia dentro, por:

- cubierta exterior llamada pulpa.
- Una sustancia gelatinosa azucarada que recibe el nombre de mucílago.
- Una cubierta dura que se denomina pergamino o cáscara.
- Una cubierta más delgada y fina llamada película.
- Y finalmente el grano o almendra que es la parte del fruto que, una vez tostada y molido, se utiliza para la producción de la bebida del café.

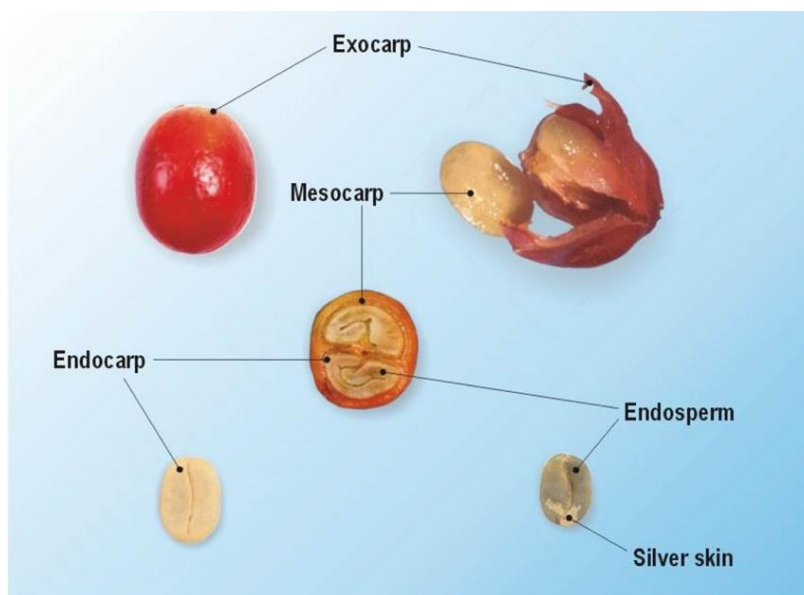


Figura 1. Café Fruto del cafeto (<http://www.fundesyram.info/>)

Con base en el Padrón Nacional Cafetalero (PNC), el cultivo del café en México se desarrolla en 11 estados (Figura 2), sin embargo, la producción cafetalera se concentra en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca, los cuales representan el 94% del total de la producción, mientras que Jalisco ocupa el noveno lugar con una producción de 978 toneladas de café verde (Flores, 2015).

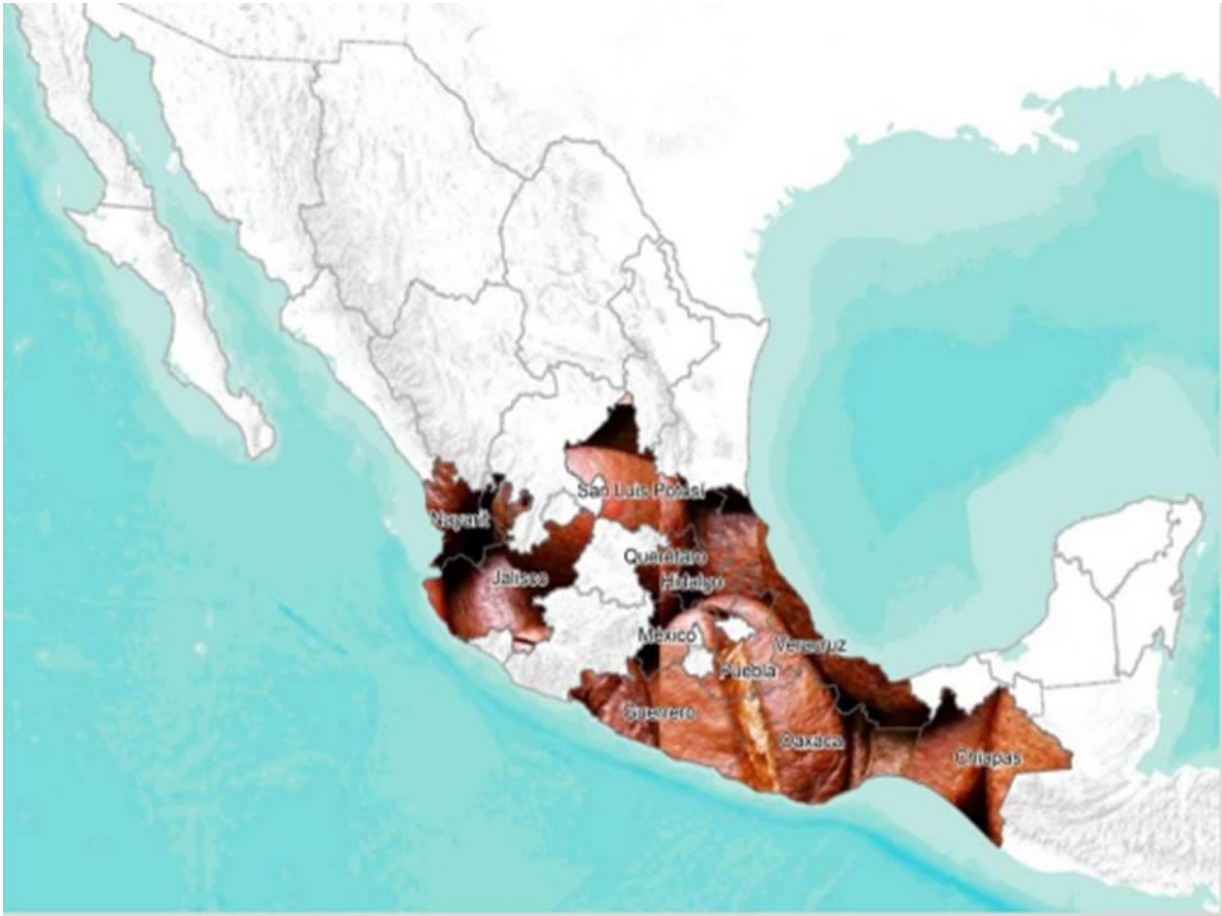


Figura 2. Principales estados productores de café en México.

SENASICA. 2016.

Los estudios realizados a la especie más cultivada *C. arabica* muestra la concentración de su composición, en las cuales resaltan el alto contenido de polisacáridos seguido de los lípidos y dentro de los principios activos los ácidos clorogénicos (Tabla 1).

| Componente | (%) en sólidos |
|---------------------|----------------|
| Polisacáridos | 50-55 |
| Oligosacáridos | 6-8 |
| Proteínas | 11-13 |
| Aminoácidos | 2.0 |
| Lípidos | 15-18 |
| Ácidos clorogénicos | 5.5-8.0 |
| Ácidos alifáticos | 1.5-2.0 |
| Minerales | 3.0-4.2 |
| Cafeína | 0.9-1.2 |
| Trigonelina | 1.0-1.2 |

Tabla 1. Composición química aproximada en base seca del café verde de la variedad arábica.

Modificada de Mussatto *et al.*, 2011

Recientemente por sus propiedades anteriormente descritas la industria cosmética, farmacéutica así como en la industria alimenticia éstos componentes han tomado especial interés debido a sus beneficios terapéuticos y nutricionales (Lima *et al.*, 2000). El café tiene sustancias antioxidantes. Los antioxidantes naturales que están constituidos por los polifenoles presentes en el café que actúan como protectores, estos compuestos tienen una serie de propiedades beneficiosas para la salud relacionadas con su potente actividad antioxidante, así como actividades hepatoprotectoras, hipoglucémicas y antivirales (Farah Y Marino, 2006).

Ácido clorogénico

Los ácidos clorogénicos (CGA) son una familia de ésteres formados entre los ácidos hidroxycinámicos y el ácido quínico. Los ácidos clorogénicos representan un grupo complejo de moléculas que incluye no solamente ésteres del ácido caféico (5-

cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico y 3-cafeoilquinico), sino también ésteres de otros cinamatos (ácidos ferúlico, p-cumárico y sinápico), así como los ácidos dicafeoilquínico y cafeoilferuoilquínico. En la figura 3 se muestran los isómeros de ácido clorogénico presentes en el café, el más abundante es el ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA). Fischer y Dangschat (1932) mostraron que el ácido clorogénico es una molécula producto de la conjugación entre el ácido caféico y el ácido quínico. Este es el Único disponible comercialmente y es aún llamado ácido clorogénico (Clifford, 1999).

En especial para el 5-CQA se han reportado la concentración en el café verde (*coffea arabica*) en un rango de 10 a 55 mg/g seco (Farah *et al.*, 2005)

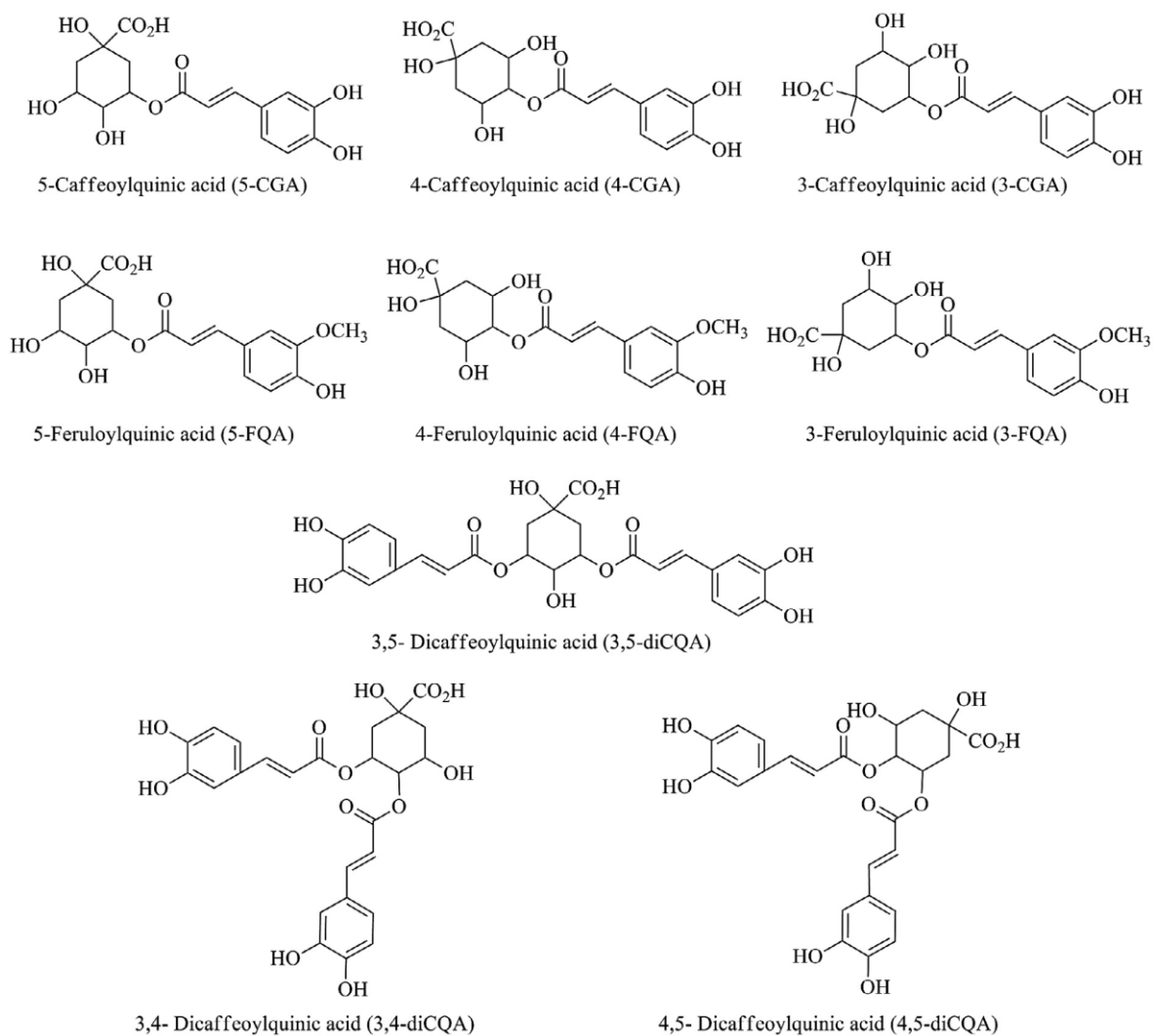


Figura 3. Representación estructural de los ácidos clorogénicos encontrados en el café

(Mills *et al.*, 2013)

Tabla 2. Propiedades del ácido clorogénico

| | | |
|-------------------|----------------|------------------|
| Peso molecular | 354.3087 g/mol | (Pubchem, 2007). |
| Fórmula molecular | C16H8O9 | |
| Punto de fusión | 205 a 209 ° C | (ChemBlink 2005) |

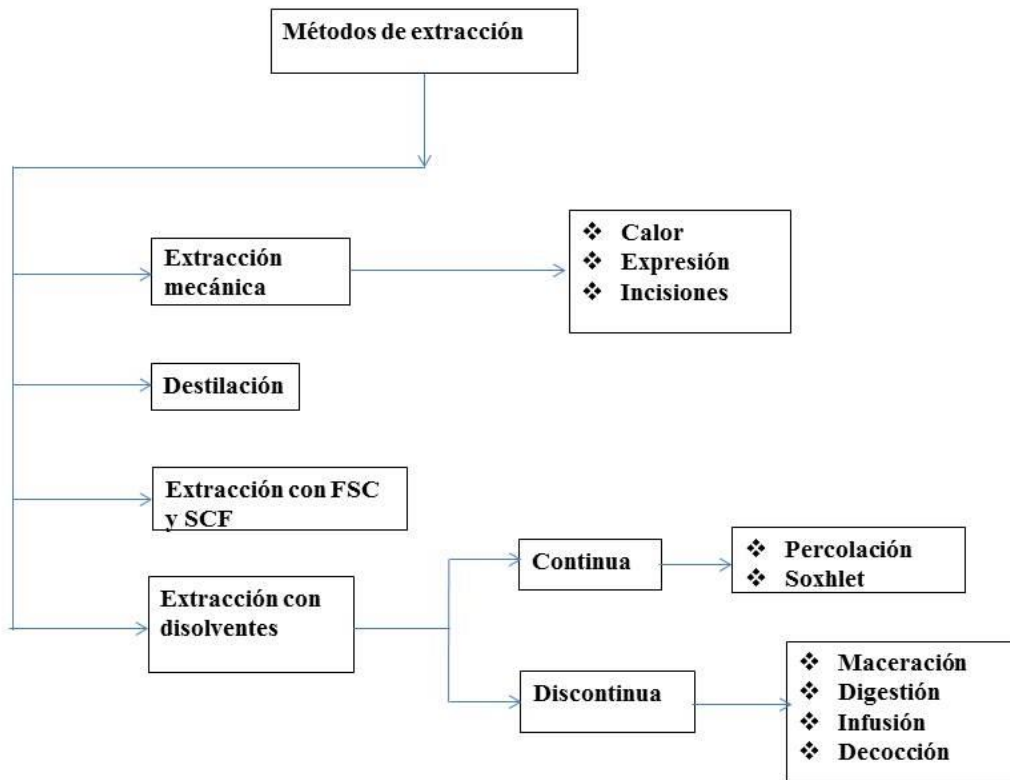
Transferencia de masa

El principio de la transferencia de masa se basa en el desplazamiento de uno o varios componentes desde una región de alta concentración hasta otra de baja concentración. El fenómeno es en consecuencia debido a la acción de una fuerza impulsora conocida como diferencia o gradiente de concentraciones del componente o componentes que se desplazan. Cuando el gradiente es cero, ya no existirá transferencia, estableciéndose el nuevo estado de equilibrio (Cremasco, 1998 and Welty *et al*, 2001). Existen dos mecanismos de transferencia de masa conocidos como transferencia de masa por difsi3n y convecci3n.

Extracci3n

La Extracci3n es una operaci3n unitaria de transferencia de masa basada en la disoluci3n de uno o varios componentes de una mezcla l3quido o s3lido en un disolvente selectivo. Se hace la distinci3n entre la extracci3n s3lido-l3quido y la extracci3n l3quido-l3quido. La primera de ellas, llamada *lixiviaci3n* o *extracci3n del s3lido*, se utiliza para disolver materia soluble a partir de su mezcla con un s3lido insoluble. La segunda, llamada *extracci3n del l3quido*, se emplea para separar dos l3quidos miscibles utilizando un disolvente que disuelve preferentemente a uno de ellos.

Clasificación



Esquema 1. Clasificación de los métodos de extracción

Extracción sólido-líquido

En el proceso de extracción se toman en cuenta dos aspectos importantes: la selectividad del solvente y, a su vez la permanencia de la composición química de la materia vegetal (Sharapin, Nikolai *et al.* 2000). La selectividad del solvente está directamente relacionada con la polaridad del compuesto de interés, ya que estos deberán tener la misma naturaleza polar.

Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos simultáneos: la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas (Figura 4a) y la disolución y difusión de las sustancias

solubles de células intactas (Figura 4b). Cuando la materia vegetal se pone en contacto con el solvente, inicialmente el solvente penetra en la célula vegetal y expelle el aire contenido en el citoplasma e induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos, es así como las moléculas del compuesto extraíble se adhieren a las moléculas del solvente (Sharapin, Nikolai *et al.* 2000). La capacidad de asociación se expresa en términos de la constante dieléctrica que cuanto más polar sea el solvente, mayor constante dieléctrica tendrá, en la Tabla 5 se puede observar las constantes dieléctricas de algunos solventes y con respecto a lo anteriormente dicho, ordenadas del menos polar al más polar. Por último se presenta la difusión de la solución fuera de la célula vegetal.

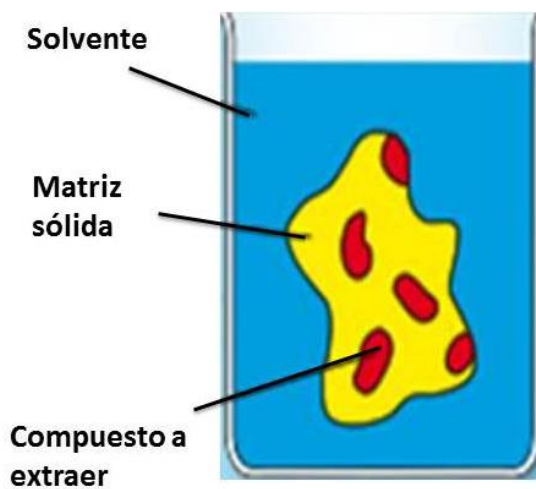


Figura 4a: Lixiviación de las sustancias solubles de células rotas

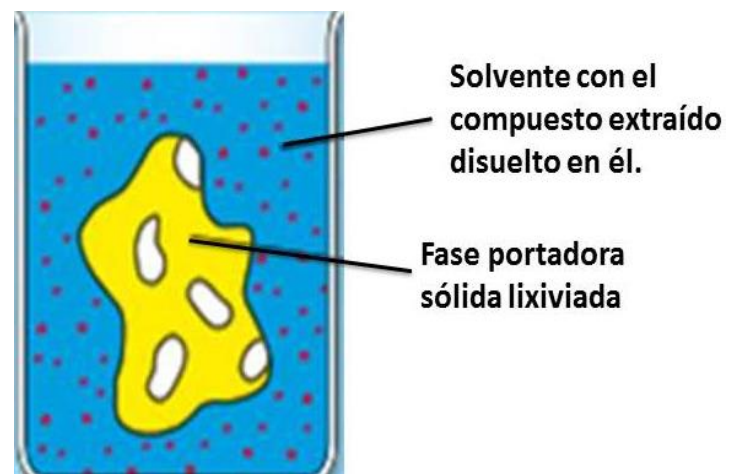
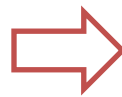


Figura 4b: Disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas.

| Solventes | Constante dieléctrica (ϵ) a 25°C |
|-------------------------|---|
| Hexano | 1,89 |
| Ciclohexano | 2,02 |
| 1,4-dioxano | 2,21 |
| Tetracloruro de carbono | 2,24 |
| Benceno | 2,28 |
| Tolueno | 2,38 |
| Acetonitrilo | 3,88 |
| Éter etílico | 4,34 |
| Cloroformo | 4,87 |
| Acetato de etilo | 6,02 |
| Ácido acético | 6,15 |
| Tetrahidrofurano | 7,58 |
| Diclorometano | 9,14 |
| Piridina | 12,3 |
| 2-butanol | 15,8 |
| 1-butanol | 17,8 |
| 2-propanol | 18,3 |
| 1-propanol | 20,1 |
| Acetona | 20,7 |
| Etanol | 24,3 |
| Metanol | 33,6 |
| Glicerina | 43,0 |
| Agua | 78,3 |

Tabla 3. Valores de las constantes dieléctricas de algunos solventes
(BRAITHWAITE. A, and SMITH, F. J. 1985)

Maceración

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Se trata de un proceso que dé como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente y depende de factores que están unidos a la droga, como por ejemplo su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad y factores que están relacionados con el solvente, este procedimiento se puede llevar a cabo por el proceso clásico que dura varios días conocido como maceración simple o, maceración dinámica que se le suministra agitación. (Sharapin, Nikolai *et al.* 2000).

VARIABLES DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN.

Algunas de las variables principales a tomar en cuenta para la eficiencia de una extracción son:

Agitación:

La eficiencia del proceso extractivo es función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado. El movimiento del líquido, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente aumentando la eficiencia del proceso

Temperatura

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de temperatura, que de igual forma contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación. Pero el aumento de la temperatura también puede causar pérdida de sustancias volátiles ya que muchos principios activos son termolábiles

pH

El pH influye en la solubilidad de compuestos ya que permite la posibilidad de formar sales. La obtención de alcaloides, por ejemplo: dependiendo de la finalidad deseada, el solvente extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos. Entre los solventes más utilizados son los alcoholes a linfáticos o mezclas de estos con agua.

Tiempo

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función al solvente y del equipo a utilizar. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado de no ser excedido.

Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación y análisis de diferentes tipos de muestras. Permiten la separación de las moléculas por medio de mecanismos como son: adsorción, partición e intercambio iónico. (Mayolo, 2012). Esta consta de una fase móvil y una fase estacionaria; la fase móvil es una sustancia inerte que sirve como vehículo de los componentes de la muestra, que fluye dentro de una columna cromatográfica que está compuesta por una fase estacionaria. La interacción de la muestra con la fase móvil y estacionaria permite la retención de analitos y luego pasan al detector para emitir una señal de respuesta.

Dentro de la clasificación general de esta técnica, se reconocen dos grandes sistemas, la denominada Cromatografía de Gases por sus siglas en inglés (GC), y Cromatografía de Líquidos (LC). La cromatografía de gases es empleada para la separación de mezclas que contienen compuestos volátiles orgánicos. Esta técnica suele presentar dificultades si la sustancia a analizar no es volátil, si descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular; se estima que el 20% de compuestos orgánicos conocidos pueden ser separados por GC. Por otro lado, la cromatografía de líquidos es una técnica muy versátil ya que cubre una amplia gama de aplicaciones, teniendo la virtud de separar una gran cantidad de compuestos polares y con baja polaridad presentes en una muestra (Quattrocchi, 1992).

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)*

Esta técnica también denominada Cromatografía Líquida o también conocida como HPLC (high performance liquid chromatography), por sus siglas en inglés, permite la mencionada separación de compuestos de una mezcla, fundamentados en la distribución de la molécula entre la fase estacionaria que puede ser sólida o líquida, y la fase móvil que es líquida, razón por la cual se debe su nombre.

| Tipos de cromatografía líquida | |
|--|--|
| Fase normal | Fase reversa o inversa |
| consiste en la aplicación de una fase estacionaria de carácter polar y una fase móvil apolar | consiste en la aplicación de una fase estacionaria de carácter apolar y una fase móvil polar |

En la Figura 5 se muestra el modo de operación del sistema que permite la inyección de la muestra disuelta en una solución de fase móvil; a través del sistema de bombas, la fase móvil es introducida en el sistema acarreado a la muestra, la cual atraviesa la columna que contiene a la fase estacionaria. La migración de los compuestos dependerá de las interacciones no covalentes entre estos y la fase estacionaria. Los compuestos separados son medidos a través de sistemas de detección integrados al sistema cromatográfico. La utilización de diferentes tipos de detectores permite y depende de la medición de propiedades físicas de la molécula objeto de estudio (Miranda, 2013).

Detectores HPLC

Una de las partes principales del cromatógrafo es el detector, cuya función es ver y distinguir la ubicación de cada uno de los componentes de la muestra en tiempo y espacio al momento de salida de la columna cromatográfica. Las principales características de un detector es tener un amplio rango dinámico de respuesta, poseer una respuesta lineal, responder a todos los solutos y poseer una sensibilidad apropiada para los diferentes análisis.

El detector de barrido de diodos (DAD) o barrido de fotodiodos (PDA) permiten la determinación de la concentración de moléculas orgánicas a partir de la medición de luz absorbida por la misma, al igual que ocurre en los sistemas UV-Vis. Sin embargo, las diferencias entre estos detectores radican en la capacidad de trabajo que alcanza el PDA operando en un rango de longitudes de onda comprendido entre 180 a 800 nm, y permitiendo un análisis con un mayor número de puntos medidos al trabajar en rango de longitudes de onda en lugar de una sola (Esparza, 2011).

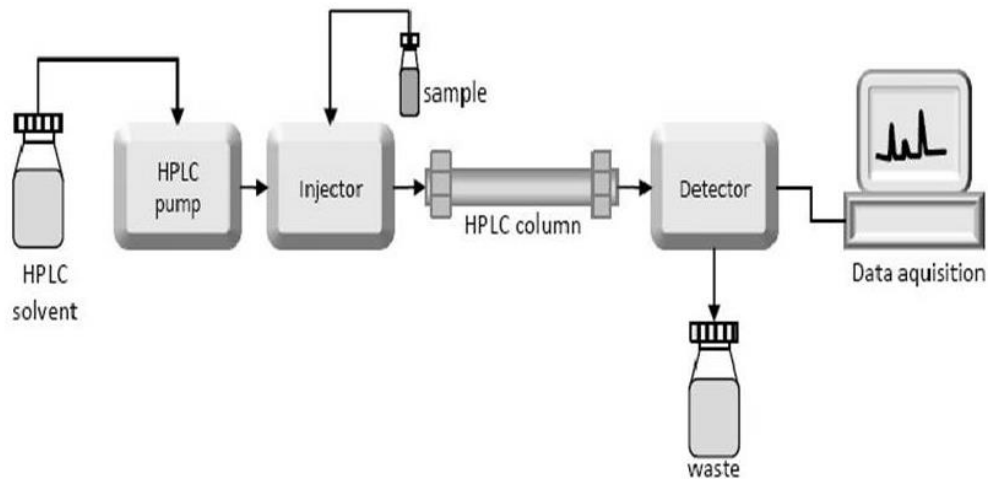


Figura 5: Esquema general del método de operación de la cromatografía líquida (HPLC)

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Preparación de la materia prima: Molienda, Tamizado y calculo de humedad

Se pesó 7.600kg de café verde de variedad arábica (*coffea arabica*, L.) posteriormente se redujo el tamaño en el molino de discos (Maren 1.5HP, Pulvex) (Figura 6). Se determinó el tamaño de partícula con ayuda de un tamizador RX-29, RO-TAP (Figura 7) con mallas de 20, 24, 40, 60, 100, 120, 150 (Grupo Ineza) durante 10 minutos para obtener un tamaño de partícula clasificado como “moderadamente grueso” que comprende valores > 0.71 mm y/o “semi-fino” > 0.18 mm para la producción industrial de extractos y tinturas (Sharapin, Nikolai *et al.* 2000). Siguiendo la metodología de la norma NMX-F-013-2000 para la humedad. Por último se empacaron en bolsas de plástico con sellador y se almacenó a -10°C .



Figura 6. Molino de discos Maren 1.5HP, Pulvex. **Figura 7.** Tamizador RX-29, RO TAP.

Método experimental

Se propone una metodología para la extracción por maceración del ácido clorogénico (5-CQA) que comprende la influencia de temperatura y agitación.

Extracción por maceración con agitación y calentamiento.

El diseño del experimento se realizó con el software estadístico STATGRAPHICS (tabla 1) con un diseño 2^4 con 2 puntos centrales (Tabla 4).

$$grc = \frac{S/S*V}{1000} \quad (1)$$

Dónde:

grc = Gramos de café.

S/S = Relación sólido/solvente (mg/ml).

V = Volumen utilizado de solvente en cada muestra(ml).



Tabla 4. Tratamientos experimentales para el diseño factorial para la maceración de la extracción de ácido clorogénico con agitación magnética y calentamiento.


| Experimento | Temperatura (°C) | Sólido/Solvente (mg/ml) | Tiempo (min) | %Etanol (V) | gr café | V 25 ml |
|-------------|------------------|-------------------------|--------------|-------------|---------|---------|
| 1 | 60 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | |
| 2 | 30 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | |
| 3 | 60 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | |
| 4 | 30 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | |
| 5 | 30 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | |
| 6 | 30 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | |
| 7 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | |
| 8 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | |
| 9 | 60 | 75 | 45 | 50 | 1.875 | |
| 10 | 60 | 25 | 15 | 50 | 0.625 | |
| 11 | 60 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | |
| 12 | 30 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | |
| 13 | 30 | 25 | 15 | 50 | 0.625 | |
| 14 | 60 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | |
| 15 | 60 | 25 | 45 | 0 | 0.625 | |
| 16 | 60 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | |
| 17 | 30 | 75 | 45 | 50 | 1.875 | |
| 18 | 30 | 25 | 45 | 0 | 0.625 | |
| 19 | 60 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | |
| 20 | 30 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | |
| 21 | 60 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | |
| 22 | 30 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | |
| 23 | 30 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | |
| 24 | 30 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | |
| 25 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | |

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|-------|
| 26 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 |
| 27 | 60 | 75 | 45 | 50 | 1.875 |
| 28 | 60 | 25 | 15 | 50 | 0.625 |
| 29 | 60 | 75 | 15 | 0 | 1.875 |
| 30 | 30 | 75 | 45 | 0 | 1.875 |
| 31 | 30 | 25 | 15 | 50 | 0.625 |
| 32 | 60 | 75 | 15 | 50 | 1.875 |
| 33 | 60 | 25 | 45 | 0 | 0.625 |
| 34 | 60 | 25 | 45 | 50 | 0.625 |
| 35 | 30 | 75 | 45 | 50 | 1.875 |
| 36 | 30 | 25 | 45 | 0 | 0.625 |

Materiales

Tabla 5. Materiales, equipos y reactivos utilizados en la extracción de ácido clorogénico

| Cant. | Materiales | Cant. | Equipos | | Reactivos |
|-------|--------------------------------------|-------|--|--|-----------|
| 1 | Probeta de 50 ml | 1 | Plancha calefactora con agitación magnética KA C-MAG HS4 digital |  | Acetona |
| 3 | Charolitas de aluminio para muestras | 1 | Balanza analítica SARTORIUS modelo BP-2215 |  | Etanol |

| | | | | | |
|----|---------------------------------------|---|---|--|------------------|
| 1 | Embudo | 1 | Bomba de vacío Greiffenberg Antriebstechnik Marktredwitz |  | Agua desionizada |
| | Papel filtro N° 1 marca whatman | | | | |
| 36 | Frascos ámbar de 100 ml | | | | |

Procedimiento:

La extracción se realizó de acuerdo al método reportado por Meinhart *et al.*(2017) con modificaciones. En el matraz colocaron los gramos de café y se vertió 25 ml del solvente en las proporciones para cada experimento con ayuda de un vaso de precipitados con agua desmineralizada para asegurar la transferencia de calor por convección isotérmica hacia el matraz. Se Fijó la temperatura en la placa calefactora, se agitó a 240 rpm a los tiempos indicados, al cabo de la extracción se aforó a 100 ml con agua desmineralizada. Se filtró la solución con ayuda de una bomba de vacío con papel filtro (Whatman n° 1), finalmente los extractos se guardaron en frascos de ámbar y se almacenó a 4°C (Esquema 2).

Esquema 2. Procedimiento utilizado para la extracción de ácido clorogénico



Procedimiento para determinación y cuantificación de ácido clorogénico por HPLC.

Preparación de la curva de calibración

Tabla 6. Materiales, equipos y reactivos para realizar cura de calibración del ácido clorogénico

| Cant. | Material | Equipos | Reactivos |
|-------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| 3 | Matraces aforado de 1 mL | Balanza analítica | Acetona |
| 9 | Viales de ámbar de 1 mL | Vortex | Metanol grado HPLC |

| | | | |
|----|-----------------------------------|-----------|--|
| 1 | Microjeringa de 1mL | Sonicador | Ácido clorogenico (USP Estándar, Sigma-Aldrich). |
| 12 | Jeringas de plástico de 3 mL | | |
| 2 | Vasos de precipitados de 100 mL | | |
| | Guantes de nitrilo para solventes | | |

Para obtener la curva de calibración para la cuantificación se prepararon soluciones estándar de Ácido clorogénico (USP Estándar, Sigma-Aldrich) en metanol con las siguientes concentraciones: 400, 300, 200, 100, 80, 40 y 10 $\mu\text{g/mL}$

Preparar solución madre con una concentración de $10,000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$.

Pesar 0.01 gr de ácido clorogénico en el matraz de 1 mL, aforar con metanol grado HPLC, colocar el matraz en el VORTEX para homogenizar la solución. Para preparar las soluciones a las concentraciones descritas se usó la microjeringa para extraer los volúmenes correspondientes; las soluciones se colocaron en viales de ámbar y se almacenó con refrigeración.

Solución madre (2) a una concentración de $1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ en 1 mL de metanol

$$C_1V_1 = C_2V_2 \dots \dots \dots \text{(ec. 2)}$$

Donde:

$V_1 = \text{Volumen inicial de la solución madre a extraer}$

$V_2 = \text{Volumen requerido (1000 } \mu\text{L)}$

$C_1 = \text{Concentración solución madre inicial (} \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{)}$

$C_2 = \text{Concentración requerida (} \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{)}$

Alícuota a extraer de la solución madre despejar V_1 de la ec. 2

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} \dots\dots\dots(\text{ec. 3})$$

$$V_1 \frac{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 1\text{mL}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 0.1\text{mL} \rightarrow 100 \mu\text{L}$$

Usar la ec. 3 para las demás diluciones.

Tabla 7. Curva de calibración

| Curva de calibración | | | |
|----------------------|---|---|------------------|
| | Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Vol. A extraer de la solución madre (2) | Vol. De solución |
| 1 | 10 | 10 μL | 1mL |
| 2 | 40 | 40 μL | 1mL |
| 3 | 80 | 80 μL | 1mL |
| 4 | 100 | 100 μL | 1mL |
| 5 | 200 | 200 μL | 1mL |
| 6 | 300 | 300 μL | 1mL |
| 7 | 400 | 400 μL | 1mL |

Cuantificación del ácido clorogénico

Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos para realizar la cuantificación del ácido clorogénico

| Cant. | Materiales | Equipos | | Reactivos |
|-------|---------------------------------|--|--|---|
| 68 | Acrodiscos (filtros de jeringa) | Un cromatógrafo marca Waters y una columna C-18 de fase reversa (Kromasil, 250 x 4.6 mm, 5µm, Akzo Nobel). | | Metanol (CH ₄ OH) |
| 68 | Viales de ámbar de 1mL | Sonicador | | Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) |
| 136 | Jeringas de 3ml | Centrifuga Fisher scientific eppendorf | | Solución estándar de 5-CQA |
| 2 | Matraz aforado de 2 L | | | Extracto acuosa a identificar de 5-CQA |
| 1 | Micropipeta de 1ml | | | |
| 60 | Microtubos | | | |
| 1 | Cartucho C-18 | | | |
| 1 | Guantes de latex | | | |
| 1 | Cubrebocas | | | |

Procedimiento:

La cuantificación del compuesto 5-CQA se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con base en el método reportado por Fujioka & Shibamoto (2008) se empleó un cromatógrafo marca Waters (Figura 8) y una columna C-18 de fase reversa (Kromasil, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Akzo Nobel). Las muestras se pasaron por un cartucho C-18 (Step-pak, Waters) y por un filtro de jeringa de 0.45 μ m (Sigma-Aldrich) antes de ser inyectados a la columna. El volumen de inyección fue de 20 μ l y cada muestra se inyectó por duplicado. La fase móvil consistió de ácido fosfórico 5mM (Karal) y metanol grado HPLC (Sigma-Aldrich) y se inyectó con el siguiente gradiente de elución: 85/15 de 0 a 5 min, 80/20 de 6 a 10 min, 60/40 de 11 a 20 min, 70/30 de 21 a 25 min, 80/20 de 26 a 30 min y 85/15 de 31 a 35 min. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min y el análisis se realizó a temperatura ambiente. Se empleó un detector de arreglo de diodos (996, Waters), se estableció una longitud de onda de 325 nm para medir la absorbancia del 5-CQA. Para obtener la curva de calibración para la cuantificación se prepararon soluciones estándar de 5-CQA (USP Estándar, Sigma-Aldrich) en metanol con las siguientes concentraciones: 400, 300, 200, 100, 80, 40 y 10 μ g/ml.



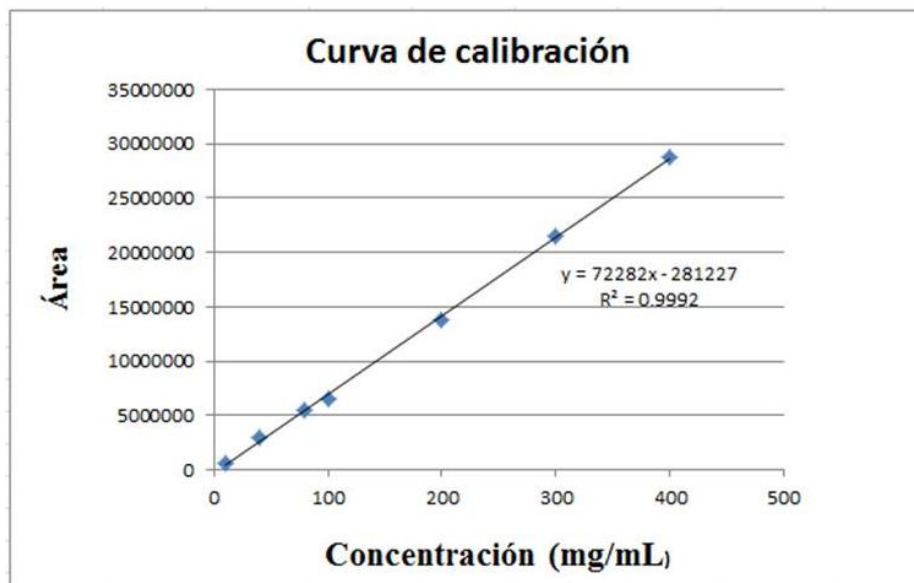
Figura 8. Cromatógrafo para la cuantificación del ácido clorogénico.

RESULTADOS

Áreas obtenidas para la curva de calibración

Tabla 9. Área del pico cromatográfico correspondientes a la curva de calibración.

| CONCENTRACIÓN (µg/mL) | ÁREA 1 (µV*s) | AREA 2 (µV*s) | ÁREA prom |
|-----------------------|---------------|---------------|-----------|
| 10 | 539458 | 713210 | 626334 |
| 40 | 2520743 | 3344045 | 2932394 |
| 80 | 5046486 | 6047406 | 5546946 |
| 100 | 6190215 | 6830064 | 6510140 |
| 200 | 13010024 | 14555914 | 13782969 |
| 300 | 18813854 | 24129190 | 21471522 |
| 400 | 27631138 | 30048582 | 28839860 |



Gráfica 2. Concentración de ácido clorogénico de la curva de calibración vs área del pico cromatográfico.

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO PARA LOS EXPERIMENTOS

Con la ecuación de la recta generada, al graficar concentración de ácido clorogénico vs área de la curva de calibración como referencia para calcular la concentración de las muestras.

Se tiene entonces:

$$y = 72282x - 281227$$

Donde

$$y = \text{Área del pico de respuesta} (\mu V * s)$$

$$x = \text{Concentración de ácido clorogénico en la muestra} \left(\frac{mg}{mL}\right)$$

Para determinar la concentración de las demás muestras despejamos x

$$x = \frac{y+281227}{72282}$$

La concentración de ácido clorogénico determinada será equivalente a μg Ac. clorogénico/gr de café verde con el siguiente análisis dimensional:

$$\frac{\mu g \text{ Ac.c}}{1mL \text{ extracto}} * \frac{100 mL \text{ extracto}}{gr \text{ café humedo}} * \frac{100 g \text{ café humedo}}{(100-H)g \text{ café seco}} = \frac{\mu g \text{ de Ac.C}}{gr \text{ cafe seco}} * \frac{1 mg}{1000\mu g} =$$

$$\frac{mg}{g \text{ café verde}}$$

Dónde:

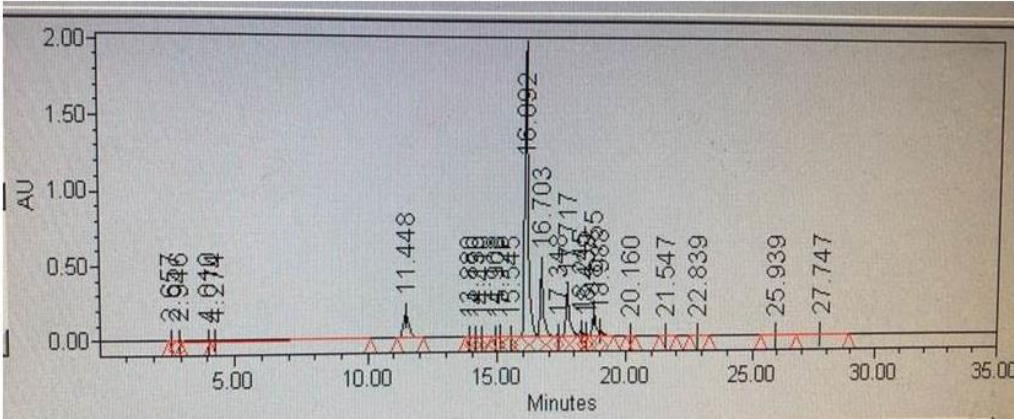
$$H = 7.082\%$$

Tabla 10. Resultado de la concentración de ácido clorogénico para cada experimento.

| DISEÑO EXPERIMENTAL | | | | | | RESULTADOS HPLC | | | | |
|---------------------|------------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|----------|---------------------------------------|----------|-------------------------------|
| Experimento | Temperatura (°C) | Sólido/Solvente (mg/ml) | Tiempo (min) | %Etanol (V) | gr de café | TR | Area | Concentración Ac. clorogénico (µg/mL) | %Humedad | Concentración Ac. Clorogénico |
| 1 | 60 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | 16.041 | 1729634 | 27.819 | 7.0828 | 4.790 |
| 2 | 30 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | 15.531 | 9548752 | 135.994 | | 23.417 |
| 3 | 60 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | 16.068 | 10121675 | 143.921 | | 8.260 |
| 4 | 30 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | 16.017 | 3770695 | 56.057 | | 3.217 |
| 5 | 30 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | 15.779 | 27170148 | 379.781 | | 21.798 |
| 6 | 30 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | 17.671 | 47206 | 4.543 | | 0.782 |
| 7 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | 15.817 | 18564702 | 260.727 | | 22.448 |
| 8 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | 15.737 | 17865999 | 251.061 | | 21.615 |
| 9 | 60 | 75 | 45 | 50 | 1.875 | 16.072 | 31266159 | 436.448 | | 25.051 |
| 10 | 60 | 25 | 15 | 50 | 0.625 | 15.774 | 12495136 | 176.757 | | 30.436 |
| 11 | 60 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | 15.759 | 8186584 | 117.149 | | 6.724 |
| 12 | 30 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | 15.987 | 10959635 | 155.513 | | 8.926 |
| 13 | 30 | 25 | 15 | 50 | 0.625 | 15.954 | 9156116 | 130.562 | | 22.482 |
| 14 | 60 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | 15.715 | 30426476 | 424.831 | | 24.384 |
| 15 | 60 | 25 | 45 | 0 | 0.625 | 16.094 | 2589022 | 39.709 | | 6.837 |
| 16 | 60 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | 15.712 | 12139777 | 171.840 | | 29.590 |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|-------|--------|--------------|---------|--|--------|
| 17 | 30 | 75 | 45 | 50 | 1.875 | 15.905 | 2743883 7 | 383.498 | | 22.012 |
| 18 | 30 | 25 | 45 | 0 | 0.625 | 17.636 | 208279 | 6.772 | | 1.166 |
| 19 | 60 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | 0 | 0 | 0 | | 0 |
| 20 | 30 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | 16.092 | 1825834 5 | 256.489 | | 44.166 |
| 21 | 60 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | 17.637 | 131492 | 5.709 | | 0.327 |
| 22 | 30 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | 17.638 | 75904 | 4.940 | | 0.283 |
| 23 | 30 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | 15.87 | 2732684 2 | 381.949 | | 21.923 |
| 24 | 30 | 25 | 15 | 0 | 0.625 | 17.643 | 73484 | 4.907 | | 0.845 |
| 25 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | 16.039 | 1376752 5 | 194.360 | | 16.734 |
| 26 | 45 | 50 | 30 | 25 | 1.25 | 16.079 | 1618606 | 26.283 | | 2.262 |
| 27 | 60 | 75 | 45 | 50 | 1.875 | 15.984 | 3652818 0 | 509.247 | | 29.230 |
| 28 | 60 | 25 | 15 | 50 | 0.625 | 16.062 | 1248682 4 | 176.642 | | 30.417 |
| 29 | 60 | 75 | 15 | 0 | 1.875 | 15.97 | 5483360 | 79.751 | | 4.577 |
| 30 | 30 | 75 | 45 | 0 | 1.875 | 15.652 | 7887167 | 113.007 | | 6.486 |
| 31 | 30 | 25 | 15 | 50 | 0.625 | 15.829 | 1117431 9 | 158.484 | | 27.290 |
| 32 | 60 | 75 | 15 | 50 | 1.875 | 15.709 | 2877243 7 | 401.948 | | 23.071 |
| 33 | 60 | 25 | 45 | 0 | 0.625 | 15.985 | 3614567 | 53.897 | | 9.280 |
| 34 | 60 | 25 | 45 | 50 | 0.625 | 16.083 | 1355561 1 | 191.428 | | 32.963 |
| 35 | 30 | 75 | 45 | 50 | 1.875 | 15.893 | 2809423 6 | 392.566 | | 22.532 |
| 36 | 30 | 25 | 45 | 0 | 0.625 | 15.814 | 4187460 | 61.822 | | 10.645 |

Figura 11. Cromatograma obtenido para el experimento con mayor contenido de ácido clorogénico



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✚ La manipulación de las variables en el proceso fueron cruciales para saber la cantidad extraída de ácido clorogénico en cada experimento realizado y lograr evaluar la concentración del ácido clorogénico a partir de café verde a diferentes condiciones de extracción.
- ✚ Con la utilización de la técnica HPLC y por medio de un cromatógrafo marca Waters se pudo identificar y cuantificar el ácido clorogénico para cada experimento, se obtuvo las condiciones óptimas de extracción que fueron a 30°C, relación sólido/solvente de 25, 45 minutos y 50 % de etanol en el solvente que correspondió al experimento número 20, dando como resultado una concentración de 44.166 mg de ácido clorogénico por cada gramo de café seco, la concentración más alta a comparación de los demás experimentos.
- ✚ Como ya se mencionó anteriormente, el mejor solvente fue una mezcla hidrolcohólica con 50 % de etanol ya que estaba en perfectas condiciones y al comparar las extracciones hechas con agua desmineralizada había tendencia a la aparición de hongos con un tiempo de almacenamiento de un mes, lo que descarta su utilización para la realización de otros productos o someterlo a un proceso de purificación con antelación al tiempo ya mencionado.
- ✚ El HPLC es un proceso automático, la ventaja de esta técnica es que toma sólo unos pocos minutos para producir resultados, esto gracias a que usa una bomba de alta velocidad para forzar la separación polar de los compuestos a través de un tubo densamente empaquetado, que a diferencia de otros que utiliza la gravedad, además

que opera con un detector de arreglo de diodos mejorando la medición en un rango más amplio de longitudes de onda.

- ✚ La realización de éste estudio preliminar sirvió para encontrarlas condiciones de operación de la extracción del ácido clorogénico, ya que posteriormente se determinará el tiempo de residencia del proceso y llevarlo a escala industrial para obtener un producto terminado de interés comercial, más que nada de tipo cosmeceútico.
- ✚ Para realizar la cuantificación por HPLC es recomendable en primen instancia centrifugar las muestras, antes de filtrarlas, ya que se formar partículas mayores como gomas o incluso si se mantienen la muestras en congelación tiende a formar precipitaciones, por lo que podría haber un ensanchamiento de la banda que acompaña a la sobre carga de la columna.

COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

- ✚ Aplicación de conceptos de matemáticas para la resolución de problemas complejos de Ingeniería Química de acuerdo con los principios y leyes de la física, y química.
- ✚ Manejo de software para la solución de gráficas y ecuaciones.
- ✚ Realización de análisis e interpretación de estudios experimentales y teóricos para explicar los fenómenos físicos, químicos, a través técnicas analíticas.
- ✚ Aplicación de estrategias para la solución de problemas que faciliten la toma de decisiones mediante un diagnóstico técnico.
- ✚ Manejó de fuentes de información para el desarrollo del proyecto.
- ✚ Desarrollo de habilidades para el manejo de grupos de trabajo de forma presencial.
- ✚ Desarrollar técnicas para el control de las actividades a realizar.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. BRAITHWAITE, A, and SMITH, F. J., *Cromatographic Methods*, 4a Edición, Chapman and Hall, London. 1985.
2. B. Bertrand · B. Guyot · F. Anthony · P. Lashermes. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. Arabica*. *Theor Appl Genet* (2003) 107:387–394. DOI 10.1007/s00122-003-1203-6.
3. Clifford M. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *F Sci Food Agric* 79:362.372 (1999).
4. Cremasco, M. A. (1998). *Fundamentos de transferencia de massa*. Campinas- SP, Brasil: Editora de Universidade Esradual de Campinas.
5. Daglia M, Racchi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G. In vitro and ex vivo ant hydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 1700-1704.
6. Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipoperoxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1282: 63-70.
7. Esparza, M. L. (2006). Métodos espectrofotométricos UV-Vis. En *Litter, Cromatografía*. Recuperado el 01 de 06 de 2018.
8. Farah, A and Marino C, Phenolic compounds in coffee, *Universidade Federal do Riode Janeiro, Cidade Universitária, CT, Bloco A, Sala 528-A. Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21949-900, Brazil*.
9. Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1505-1513.
10. Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in varius commercial brewed coffees. *Food chemistry*, 106(1), 217-221.

11. Flores, F., 2015. La producción de café en México: Ventana de oportunidad para el sector agrícola de Chiapas. *Innovación más Desarrollo*, 4(7), pp.174–194.
12. Halliwell, B* Gutteridge, J† Aruoma. O*, The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *ELSEVIER*, Volume 165, Issue 1, 15 August 1987, Pages 215-219.
13. Lashermes, Andrade, y Etienne, 2008. Genomics of coffee one the world’s largest traded commodities. Vol 1.
14. Lima, D., Andrade, F. y Flores, G., 2000. Can coffee help fighting the drug problem? Preliminary results of a Brazilian youth drug study. *Acta Pharmacologica Sinica*, 21(12), pp.1059–1070.
15. Fischer, H und Dangschat, G: Konstitution der Chlorogenstiure (3. Mitteil. iiber Chinasgumund Derivate). [Aus d. Chem. Institut d. Universitat Berlin.](Vorgetragen in d. Sitzudg der Deutschen Chem. Gcsellschaft; eingegangen am 12. Mai 1932.)
16. Mayolo-Deloisa¹, Martínez², K y Rito-Palomares¹, P. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y SU APLICACIÓN A ESTUDIOS DE CAMBIOS CONFORMACIONALES, ESTABILIDAD Y REPLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 11, No. 3 (2012) 415-429.
17. Meinhart, A., Ferreira, T., Araújo, R., Mateus F., Bruns R., Teixeira H., Multivariate Optimization of Chlorogenic Acid Extraction From Brazilian Coffee. Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, 14 March, 2017.
18. Miranda, A. (12 de Febrero de 2013). Cromatografía Líquida (HPLC). Recuperado el 06 de Febrero de 2017.
19. Mussatto, S., Machado, E., Martins, S., Teixeira, J., 2011. Production Composition and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), pp.661–672.
20. Mills, C., Oruna, M., Mottram, D., Gibson, G., Spencer, J., 2013. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141(4), pp.3335–3340.

21. Quattrocchi, O. (1992). Introducción a la HPLC. Buenos Aires: Capítulo 10.
22. SENASICA, 2016. Programa agroalimentario, café, P-1
23. Sharapin, Nikolai et al. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá, D. C; Convenio André Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED).