

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SEDE DE OCCIDENTE

PRÁCTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN

LABORATORISTA QUÍMICO

“Implementación de un método para la cuantificación individual de ácidos clorogénicos en café en grano tostado de *Coffea arabica*, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución”

DIANA SALAS CORTES

Recinto de Grecia, Costa Rica

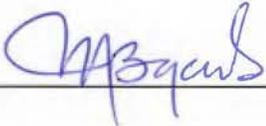
Julio 2021

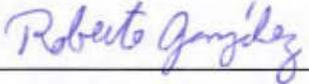
Hoja de aprobación

PRÁCTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN LABORATORISTA QUÍMICO

“Implementación de un método para la cuantificación individual de ácidos clorogénicos en café en grano tostado de *Coffea arabica*, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución”

Máster Esteban Pérez López 
Presidente del tribunal

Lic. Marvin Bogantes Jiménez 
Miembro del tribunal

Lic. Roberto Rojas González 
Director Trabajo

Máster Laura Vindas Ángulo 
Lector 1

Máster Miguel Barquero 
Lector 2

Diana Salas Cortés 
Sustentante

Carta de aprobación del filólogo

Cartago, de julio de 2021

Los suscritos, Elena Redondo Camacho, mayor, casada, filóloga, incorporada a la Asociación Costarricense de Filólogos con el número de carné 0247, portadora de la cédula de identidad número 3-0447-0799 y, Daniel González Monge, mayor, casado, filólogo, incorporado a la Asociación Costarricense de Filólogos con el número de carné 0245, portador de la cédula de identidad número 1-1345-0416, ambos vecinos de Quebradilla de Cartago, revisamos el trabajo final de graduación que se titula: *Implementación de un método para la cuantificación individual de ácidos clorogénicos en café en grano tostado de Coffea arabica, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución*, sustentado por Diana Salas Cortes.

Hacemos constar que se corrigieron aspectos de ortografía, redacción, estilo y otros vicios del lenguaje que se pudieron trasladar al texto. A pesar de esto, la originalidad y la validez del contenido son responsabilidad directa del autor.

Esperamos que nuestra participación satisfaga los requerimientos de la Universidad de Costa Rica.

ANA ELENA
REDONDO
CAMACHO
(FIRMA)

Firmado digitalmente
por ANA ELENA
REDONDO CAMACHO
(FIRMA)
Fecha: 2021.07.30
13:55:18 -06'00'

DANIEL
ALBERTO
GONZALEZ
MONGE (FIRMA)

Firmado digitalmente por
DANIEL ALBERTO GONZALEZ
MONGE (FIRMA)
Fecha: 2021.07.30 13:58:28
-06'00'

Dedicatoria

A Dios y a mis padres, por ser mi apoyo incondicional para la superación personal y profesional.

Agradecimientos

Primordialmente, a Dios, el creador del cielo y la tierra, quien merece alabanza por darme la vida y esperanza para cumplir mis sueños.

A mis padres, por estar siempre a mi lado y darme todo su apoyo durante mi carrera profesional.

Al profesor Luis Alexis Jiménez Barboza, por su paciencia, vocación y dedicación en su labor de docente del curso de tesis.

A la profesora Priscilla Rojas Alvarado, por su paciencia, vocación y dedicación en su labor de docente del curso de tesis.

A Roberto Rojas González, como director de este proyecto, por el apoyo técnico y teórico.

A los lectores que formaron parte de mi comité asesor, Laura Vindas Angulo y Miguel Barquero, por su colaboración con esta práctica dirigida.

A Yorleny Alpízar Montero, encargada de control de calidad del laboratorio químico del Icafe por el apoyo, paciencia y consejos para perseverar con esta práctica dirigida.

Al Instituto del Café de Costa Rica, por la oportunidad de efectuar esta práctica dirigida en su laboratorio químico.

Índice

Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Problema y justificación	7
1.3. Objetivo general.....	8
1.4. Objetivos específicos	8
Capítulo II. Marco teórico	10
2.1. Historia del café	10
2.2. La planta de café, su cultivo y grano.....	11
2.3. Los grupos de café más importantes de la especie coffea arabica.....	12
2.4. Ácidos clorogénicos en granos de café	12
2.5. Efecto del tueste sobre los ácidos clorogénicos en el café	18
2.6. Beneficios del café para la salud de consumidor	20
2.7. Técnicas que se utilizan en la determinación de ácidos clorogénicos en café	21

2.7.1. Técnica de espectroscopía de absorción molecular por ultravioleta (UVVis)	21
2.7.2. Técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	21
2.8. Instituto del Café de Costa Rica.....	22
2.9. Regiones cafetaleras de Costa Rica.....	23
Capítulo III. Marco metodológico.....	25
3.1. Optimización de la metodología para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de Coffea arabica, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	25
3.1.1. Descripción del método para análisis de CGA en HPLC para café tostado	25
3.1.2. Reactivos y soluciones para el método de análisis de CGA en HPLC para café tostado	27
3.1.3. Equipos para el método de análisis de CGA en HPLC para café tostado	28
3.1.4. Condiciones cromatográficas para el método de análisis de CGA en HPLC para café tostado	29

3.1.4.1. Columna cromatográfica.....	30
3.1.4.2. Longitud de onda y volumen de inyección.....	30
3.1.4.3. Flujo y composición de la fase móvil	31
3.1.5. Preparación de la extracción de la muestra de café para la optimización del método para análisis de CGA en HPLC para café tostado	32
3.1.6. Comparación del orden de elución de los compuestos de ácidos clorogénicos reportados por la Norma Alemana DIN 10767.....	33
3.1.7. Análisis de evaluación de la aptitud del sistema para la optimización del método para análisis de CGA en HPLC para café tostado	34
3.1.7.1. Evaluación de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico de HPLC.....	35
3.1.7.2. Evaluación de la prueba de idoneidad del método de análisis para HPLC.....	35
3.1.8. Descripción del cálculo de ácidos clorogénicos individuales según el método para análisis de CGA en HPLC para café tostado.....	36
3.2. Validación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de arábica (Coffea), mediante HPLC	37

3.2.1. Procedimiento de validación del método normalizado para el análisis de CQA en HPLC para café tostado.....	37
3.2.2. Descripción y verificación de los parámetros de desempeño del método para el análisis de CQA en HPLC para café tostado	38
3.2.2.1. Parámetros de desempeño de la norma alemana 10767.....	38
3.2.2.2. Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)	40
3.2.2.3. Veracidad (sesgo) y recuperación	43
3.2.2.4. Linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.....	46
3.2.2.5. Estimación de la incertidumbre.....	49
3.2.2.6. Especificidad	51
3.2.2.7. Robustez	51
3.2.2.8. Falsos positivos o falsos negativos	53
3.3. Cuantificación del contenido de ácidos clorogénicos (CQA) por HPLC, en muestras de grano tostado de arábica (Coffea).....	53
3.3.1. Origen y tipo de café tostado para la cuantificación con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado	53

3.3.2. Preparación previa de cada café para la cuantificación con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado.....	55
3.3.3. Cálculo de contenido de analito en las muestras de café de tostado de rutina con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado	56
3.3.4. Análisis de los resultados para las muestras de café recolectadas, con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado	56
3.3.5. Comparación de los resultados de las muestras de café tostado realizadas con los parámetros de desempeño que declara la norma alemana DIN 10767	56
Capítulo IV. Ventajas y desventajas de la práctica dirigida.....	58
4.1. Ventajas.....	58
4.2. Desventajas	58
Capítulo V. Resultados y discusión.....	60
5.1. Resultados para comparar el orden de elución de los compuestos de ácidos clorogénicos reportados por la norma alemana DIN 10767.....	60
5.2. Resultados para la optimización del método normalizado para análisis de ácidos clorogénicos (CGA) en café <i>coffea arabica</i> , mediante HPLC.....	61

5.2.1. Prueba de idoneidad para el sistema cromatográfico de HPLC	61
5.2.2. Prueba de idoneidad para el método de análisis de HPLC	62
5.3. Resultados de la verificación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de <i>Coffea arabica</i> , mediante HPLC según criterios del ECA-MC-C18 con la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017	64
5.3.1. Resultados para la verificación de los parámetros de desempeño de la norma alemana DIN 10767.....	64
5.3.2. Verificación de precisión en términos de repetibilidad	66
5.3.3. Verificación de la precisión en términos de precisión intermedia.....	68
5.3.4. Resultados de la verificación de la veracidad (sesgo) y la recuperación	70
5.3.5. Verificación de la linealidad, el límite de detección y el límite de cuantificación	73
5.3.6. Resultados de la verificación de la especificidad	75
5.3.7. Resultados de la verificación de la incertidumbre	76
5.4. Resultados para la cuantificación de muestras recabadas con el método	

normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de <i>coffea arabica</i> , mediante HPLC	79
5.4.1. Cuantificación de muestras café en grano tostado	79
5.4.2. Análisis estadístico de la cuantificación de muestras de café en grano tostado	80
5.4.3. Diferencias absolutas de los duplicados de cada muestra de café en grano tostado para cada ácido individual comparado con el límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 10767	83
Capítulo VI. Conclusiones	86
Capítulo VII. Recomendaciones	88
Referencias bibliográficas	90
Anexos	100
Anexo 1	100
Anexo 2	102
Anexo 3	103
Anexo 4	104

Anexo 5.....	105
Anexo 6.....	106
Anexo 7.....	107
Anexo 8.....	109
Anexo 9.....	111
Anexo 10.....	112
Anexo 11.....	113
Anexo 12.....	114

Índice de figuras

Figura 1 Muestra la molécula química del ácido quínico y su fórmula química es C ₇ H ₁₂ O ₆	14
Figura 2 Estructuras, fórmulas y masas moleculares del ácido cafeico y el ácido ferúlico	15
Figura 3 Transformación del ácido clorogénico en quino lactona	19
Figura 4 Estructuras químicas de las principales quino lactonas presentes en el grano de café tostado	19
Figura 5 Las ocho regiones cafetaleras de Costa Rica	24
Figura 6 Curva de calibración del estándar de Ácido 5-CQA	28
Figura 7 Gradiente de eluyentes de fase móvil del sistema cromatográfico para la Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC .	32
Figura 8 Cromatograma de HPLC reportado para la Norma Alemana DIN 10767:2015-08 Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble. Método de HPLC	33
Figura 9 Comparación de cromatogramas del análisis de ácidos clorogénicos en HPLC	60
Figura 10 Comparación del límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 10767	

y las diferencias absolutas de muestras de café tostado	65
Figura 11 Repetibilidad del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (Coffea), mediante HPLC	67
Figura 12 Resultados de precisión intermedia del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (Coffea), mediante HPLC	69
Figura 13 Veracidad y recuperación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de Coffea arabica, mediante HPLC	72
Figura 14 Representación gráfica de la curva de calibración para el estándar 5-CQA, se basó en el promedio de 10 curvas de calibración	74
Figura 15 Prueba de verificación de la especificidad del método	76
Figura 16 Comparación de los resultados de incertidumbre según la ecuación de Horwitz-Thompson obtenidos y los resultados de incertidumbre reportados por la norma alemana DIN 10767	77
Figura 17 Comparación de los resultados de incertidumbre obtenidos según la desviación estándar de reproducibilidad y los resultados de incertidumbre reportados por la norma alemana DIN 10767	78

Figura 18 Distribución para cada ácido clorogénico cuantificados en 25 muestras recabadas de café tostado molido	82
Figura 19 Comparación del límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 1076 para cada ácido clorogénico y las diferencias absolutas de muestras de café tostado	85

Índice de cuadros

Cuadro 1 Estructuras, fórmulas y masas moleculares de isómeros mono y di ésteres del ácido quínico con el ácido cafeico y ferúlico	15
Cuadro 2 Condiciones cromatográficas para el método de análisis “Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC”	29
Cuadro 3 Parámetros y especificaciones para la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico HPLC para la “Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC”	34
Cuadro 4 Datos de parámetros de desempeño para la determinación de ácidos clorogénicos en una muestra de café (café tostado), según la norma alemana DIN 10767	39
Cuadro 5 Datos de parámetros de desempeño para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad de ácidos clorogénicos en una muestra de café (café tostado), según la norma alemana DIN 10767	41
Cuadro 6 Datos de parámetros de desempeño para la determinación de la precisión intermedia de ácidos clorogénicos en una muestra de café (café tostado), según la norma alemana DIN 10767	42
Cuadro 7 Datos de incertidumbre para la determinación de ácidos clorogénicos en café tostado, según la Norma Alemana DIN 10767	50

Cuadro 8 Muestras realizadas de café tostado molido analizadas por el método verificado para análisis de CQA en HPLC para café tostado	54
Cuadro 9 Resultados de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico HPLC	62
Cuadro 10 Resultados de la prueba de idoneidad para la optimización del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de Coffea arabica, mediante HPLC.....	63
Cuadro 11 Resultados de la prueba t-student de evaluación del sesgo para el ácido 5-CQA del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de Coffea arabica, mediante HPLC	70
Cuadro 12 Valores obtenidos para las pruebas de verificación del parámetro de recuperación para el ácido 5-CQA del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de Coffea arabica, mediante HPLC.....	72
Cuadro 13 Resultados de los parámetros que definen la linealidad del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (Coffea), mediante HPLC	74
Cuadro 14 Cálculo de la media, desviación estándar, el valor mínimo y máximo para cada ácido clorogénico cuantificados en 25 muestras de rutina de café	

tostado molido..... 79

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Cálculo del contenido de cada CGA individual para el método de determinación de CGA en café tostado	36
Ecuación 2 Cálculo del coeficiente de variación de Horwitz-Thompson	42
Ecuación 3 Cálculo del parámetro de Horrat.....	42
Ecuación 4 Cálculo del sesgo	43
Ecuación 5 Cálculo de la t- student observada para el sesgo.....	44
Ecuación 6 Cálculo de las recuperaciones relativas de adiciones	45
Ecuación 7 Cálculo de la t- student observada para la recuperación.....	45
Ecuación 8 Cálculo de la línea de regresión	47
Ecuación 9 Cálculo del límite de detección (LD)	48
Ecuación 10 Cálculo del límite de cuantificación (LC).....	48
Ecuación 11 Cálculo de la incertidumbre de medición expandida según la ecuación de Horwitz.....	50
Ecuación 12 Cálculo de la incertidumbre de medición expandida según desviación estándar de reproducibilidad en la Norma Alemana DIN 10767	51

Índice de abreviaturas

3,4-diCQA: ácido 3,4-dicafeoilquínico.

3,5-diCQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico.

3-CGL: lactona de ácido 3-cafeoilquínico.

3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico.

3-FQA: ácido 3-feruloilquínico.

4,5-diCQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico.

4-CGL: lactona de ácido 4-cafeoilquínico.

4-CQA: ácido 4-cafeoilquínico.

4-FQA: ácido 4-feruloilquínico.

5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico principal en el café).

5-FQA: ácido 5-feruloilquínico.

AOAC: Métodos oficiales de análisis.

Cenicafe: Centro Nacional de Investigaciones del Café, Colombia.

CGA: Ácidos clorogénicos individuales.

Cicafe: Centro de investigación del café de Costa Rica.

DIN 10767:1992-05: Análisis de café y productos de café – Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble-.

DIN 10767:2015-08: Norma alemana sustituye a DIN 10767:1992-05.

ECA: Ente de acreditación costarricense.

HPLC: Técnica de cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés.

Icafe: Instituto del Café de Costa Rica.

Inteco: Instituto de normas técnicas de Costa Rica de masas.

DIN: Instituto alemán de normalización.

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrofotometría.

Método de HPLC.

UV-Vis: Técnica de espectroscopía de absorción molecular por ultravioleta visible.

Capítulo I. Introducción

El café es una bebida altamente comercial en el ámbito mundial, su consumo se debe a las propiedades organolépticas que le dan sabor y aroma. Los compuestos químicos contenidos en los granos de café proporcionan las características sensoriales para la calidad de la bebida (Gotteland y de Pablo, 2007). Estos compuestos químicos son principalmente sustancias orgánicas como los lípidos, carbohidratos, proteínas, cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos (Puerta, 2011).

El contenido de estas sustancias en los granos de café es influenciado por diferentes factores como la variedad y la altitud en la que se cultiva, el tipo de suelo, el clima, los diferentes procesos industriales y el nivel de tostado (Escarramán *et al.*, 2007). El caracterizar la variación de la calidad del café a través de la relación de los factores genéticos y los compuestos químicos presentes en los granos puede mejorar la resistencia del cultivo y la calidad de taza de alguna variedad *Coffea arabica* de interés (Leroy *et al.*, 2006).

Existen dos especies en el ámbito mundial que son las más comerciales en el género *Coffea*, *arabica* y *canephora* y la más importante entre ambas son los genotipos de la especie *arábica*. Algunas investigaciones se han centrado en evaluar y caracterizar la composición química de ambas especies de granos de café (Moreira *et al.*, 2014). Para la especie *Coffea arabica* los contenidos de lípidos y

sacarosa son superiores a la especie *Coffea canephora* y para la composición de robusta se destacan en mayor contenido los ácidos clorogénicos, cafeína, polisacáridos y cenizas (Puerta, 2011).

El principal compuesto fenólico contenido en el café son los ácidos clorogénicos, que tienen la propiedad de dar sabor y color a los granos de café y ayudan a dar calidad y aceptación en el mercado por parte del consumidor (Moreira *et al.*, 2014). Los ácidos clorogénicos se encuentran en las paredes celulares y tienen la propiedad de darles soporte, textura y protección a las plantas. Entre las investigaciones realizadas en los últimos 60 años, se desarrolló la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) para los ácidos clorogénicos en granos de café y se utilizaron varios métodos analíticos para su cuantificación (Marín y Puerta, 2008).

Los ácidos clorogénicos al ser parte importante de la composición química del café han sido tema de muchos estudios que se han centrado en encontrar la forma en que el cuerpo humano puede metabolizar estos compuestos y, de esta manera, conocer los beneficios para la salud del consumidor. Entre algunos beneficios está el tratamiento de la presión arterial alta y de la diabetes (Watanabe *et al.*, 2006; Bisht y S. S., 2010).

Asimismo, se menciona que estos compuestos poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Ludwig *et al.*, 2013; Marín y Puerta, 2008). Además, se le atribuyen usos farmacéuticos y cosméticos y el uso como aditivo en

productos alimenticios (Dawidowicz y Typek, 2017). Otros estudios mencionan sus influencias en el estado de ánimo y los procesos cognitivos (Cropley *et al.*, 2012).

La cuantificación del contenido de ácidos clorogénicos en los granos de café se puede llevar a cabo por dos técnicas analíticas de ensayo, ya sea si se desea medir ácidos clorogénicos totales (CQAT) o CGA individuales o libres (cafeico, quínico, ferúlico, cumárico, sinápico), sus ésteres y sus isómeros (Marín y Puerta, 2008). Para la determinación de CQAT, según la AOAC, el procedimiento que se debe seguir es el método oficial AOAC 957.04, Método espectrofotométrico para ácidos clorogénicos en café verde. En la norma AOAC no se encuentra un método analítico para la determinación de ácidos clorogénicos individuales en café (AOAC Internacional, 2016).

Por consiguiente, esta práctica dirigida tiene como objetivo implementar un método para la cuantificación individual de ácidos clorogénicos en café en grano tostado de arábica *Coffea arabica*. Lo anterior mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución para el laboratorio químico del Icafe.

1.1. Antecedentes

En Colombia, en el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafe), se llevó a cabo un estudio del contenido de ácidos clorogénicos individuales (CGA), en granos de genotipos de *Coffea arabica* y *Coffea canephora* según el desarrollo del fruto. El objetivo del estudio era diferenciar café de Colombia, en cuanto a

calidad y origen, por medio de la identificación de estos compuestos químicos con la técnica de HPLC y la técnica espectrofotometría ultravioleta.

Cenicafe obtuvo la separación de tres isómeros del CQA, tres isómeros de los di-CQA, los FQA y los ácidos hidrocínámicos (cinámico, sináptico, ferúlico, cafeico, p-cumárico o-cumárico). Los resultados en HPLC residieron en mayor concentración de CGA, que para la técnica de espectrofotometría para ambas variedades. El ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) es el que posee mayor porcentaje en ambas especies de café (Marín y Puerta, 2008).

En Europa se llevó a cabo una revisión de los métodos analíticos más importantes para determinar compuestos bioactivos de café, entre los cuales se encuentra HPLC, UV y técnicas de voltámetro. Las separaciones de los componentes de café resultaron más eficientes con técnicas de mayor resolución, ya que permitieron medir todo el rango de constituyentes, como los ácidos clorogénicos. Entre estas técnicas se destacan las técnicas LC-MS (Jeszka *et al.*, 2014).

En una investigación efectuada en HPLC se comprobó que diferentes tipos de preparación del grano verde de café afectan la concentración de ácidos clorogénicos (Gloess *et al.*, 2013). Otro estudio de café que se llevó a cabo en la Universidad Ahmadu Bello de Nigeria demostró que los diferentes métodos de extracción para llevar a cabo una infusión de café afectan el contenido de ácidos clorogénicos (Nuhu, 2014).

En un estudio realizado por la Universidad de Novi Sad, en Serbia, se determinó que el ácido clorogénico 5-CQA, principal en granos de café por su alto porcentaje en concentración, es de fácil determinación por HPLC. Los resultados en este análisis por HPLC evidencian que el contenido de 5-CQA se presenta en mayor proporción en la especie *Coffea canephora* (Grujić *et al.*, 2015).

Otra investigación elaborada en Polonia y España determinó los ácidos clorogénicos por la técnica HPLC-DAD para 12 muestras de café de *Coffea arabica* y *canephora* de diferentes orígenes, incluidas muestras descafeinadas. El estudio mostró que el café robusta presenta el doble de concentración que el café arábica. Para las muestras descafeinadas, la concentración de CGA no se ve afectada por este proceso (Jeszka *et al.*, 2016).

A pesar de que a los ácidos clorogénicos se les atribuyen beneficios para la salud y calidad del café, se asocia que, en cantidades excesivas producen una reducción en la calidad de la taza, por ejemplo, los sabores amargos. De acuerdo con un artículo de la revista Food Science and Technology, diferentes muestras de café de calidad de Brasil, tomadas de concursos de calidad y de diferentes procesos, con un grado de tueste estandarizado, pueden tener altos contenidos de ácidos clorogénicos (Zanin *et al.*, 2016).

Según la AOAC el procedimiento que se debe seguir para la determinación de ácidos clorogénicos totales es el método oficial AOAC 957.04, Método espectrofotométrico para ácidos clorogénicos en café verde. En la norma AOAC no

existe un método HPLC para la determinación de ácidos clorogénicos individuales en café (AOAC Internacional, 2016).

La norma DIN 10767: 2015-08 Análisis de Café y productos del café-Determinación de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble, utiliza un método HPLC para esta determinación. Esta norma es una sustitución a la norma alemana DIN 10767:1992-05 y establece un método para determinar los tres ácidos 3-4 y 5-CQA, los tres ácidos 3,4-3,5 y 4,5-diCQA, los tres ácidos 3-,4-y 5-FQA y las dos lactonas 3-y 4- CGL (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).

En China se llevó a cabo un estudio para la determinación simultánea de ácidos clorogénicos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA, para lo que se utilizó como estándar único el 5-CQA y se calcularon las concentraciones de los otros ácidos a partir de los factores de respuesta relativa. Los resultados que obtuvieron los compararon utilizando los estándares de 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA (Shan *et al.*, 2017).

La empresa Agilent Technologies Inc. desarrolló un método para determinación de ácidos clorogénicos en productos de café, basado en la norma DIN 10767. Esta norma se fundamenta en una serie de mediciones para el adecuado control de calidad del café y sus productos. Esta metodología utiliza la técnica HPLC para la detección del contenido de ácidos clorogénicos (Naegele, 2016).

La presente práctica dirigida se basará en la norma DIN 10767: 2015-08 Análisis de café y productos del café-determinación de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble, para la implementación de la metodología HPLC en el laboratorio químico del Icafe.

1.2. Problema y justificación

En el ámbito nacional no existen técnicas, métodos de análisis o normas oficiales para la cuantificación de CGA individuales en granos de café, que estén documentados o publicados. De la misma forma, el Icafe, que es el ente regulador de la actividad del café de Costa Rica, todavía no tiene una técnica para la determinación de CQA individuales en el café tostado. El laboratorio químico de esta institución solo cuenta con un análisis para determinar ácidos clorogénicos totales en café por la técnica espectrofotometría ultravioleta (Solís y Herrera, 2005).

Ante la necesidad de actualización y mejoras en las técnicas de análisis para evaluar la calidad del café del productor costarricense, en el Icafe se busca el desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación y cuantificación de los ácidos clorogénicos individuales, que logre la precisión y sensibilidad adecuada (Moldoveanu y David, 2013). Además, se busca que en el futuro se pueda incluir en el alcance de acreditación del laboratorio (Anexo 1).

Asimismo, el laboratorio químico del Icafe colabora con el estudio que hacen otras unidades de la Gerencia Técnica, a la cual pertenece. Por ejemplo, la Unidad de Investigación se encarga del estudio y mejoramiento genético de variedades del café de Costa Rica. Por lo tanto, es de mucho interés para esta unidad el desarrollo del método para la determinación de los ácidos clorogénicos individuales por la técnica de HPLC. De esta manera, esta unidad suministra las muestras de café para el análisis de este trabajo.

Esta práctica dirigida está destinada a desarrollar y validar un método para la determinación de los ácidos clorogénicos individuales por la técnica de HPLC, basado en la Norma DIN 10767:2015-05 Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble, Método de HPLC.

1.3. Objetivo general

Implementar el método normalizado de la *Norma DIN 10767:1992-05* para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.4. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de la investigación son los siguientes:

1. Optimizar el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución.

2. Validar el método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC, cumpliendo con los criterios descritos en el ECA-MC-C18 con la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017.

3. Cuantificar el contenido de ácidos clorogénicos (CGA) por HPLC, en muestras de grano tostado de *Coffea arabica* recibidas en el laboratorio químico del ICAFE durante el periodo 2019-2020, mediante el método normalizado verificado.

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Historia del café

El centro de origen del café se localiza en Etiopía, después se distribuyó por Europa hasta llegar a América. En el año 1500 se descubrió que, además de tostar el grano, se podía moler, lo que estimuló más su consumo. El café es uno de los productos más comercializados del mundo. De las más de 500 especies del género *coffea*, la mayor importancia económica y comercialización mundial ocurre para las diversas variedades de las especies *arabica* y *canephora* (Jiménez, 2010).

En América *coffea arabica* se introdujo en el año 1720. Para el año 1808, durante el gobierno de Tomás de Acosta, se empezó el cultivo del café en Costa Rica, así fue como se convirtió en el primer país centroamericano en comenzar la industria de café. La especie cultivada más común de esa época fue la variedad *Typica*, llamada también *criollo* de la especie *arabica*, de porte alto, excelente calidad de bebida, pero de baja productividad, con una excelente calidad de grano, pero baja densidad de siembra. Esto provocó cambiar esta variedad por *caturra* y *catuaí*, que ayudaron a mantener y aumentar la calidad (Icafe, 2015).

En 1933 fue necesario la creación de un organismo público que se encargara de la regulación de la actividad cafetalera en Costa Rica, por lo que se fundó el Instituto de Defensa del Café. Posteriormente, en el año 1948 se transformó en la Oficina del café de Costa Rica y en el año 1985 pasó a ser el Instituto del Café de

Costa Rica con la función de controlar toda la comercialización del café en el país (Icafe, 1993).

2.2. La planta de café, su cultivo y grano

La planta de café se reproduce por medio de semillas, por lo que forma parte del subgrupo de las angiospermas. El cafeto pertenece a la familia botánica *Rubiaceae* compuesta por más de 500 géneros y 6000 especies de arbustos o árboles. El género al que pertenece el café es *Coffea*, principal miembro económico de la familia *Rubiaceae*. En este género se pueden encontrar más de 100 especies, pero solo dos de estas son comercialmente importantes, *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. No obstante, las variedades pertenecientes al *Coffea arabica* son las más destacadas por sus características sensoriales de calidad de la bebida (Quirós, 1998).

Los granos de café se obtienen del fruto rojo de la planta de café, los cuales después de la recolección son beneficiados por diferentes procesos (Narita e Inouye, 2014). El propósito del beneficiado es separar la pulpa y el mucílago que rodean el grano de café para obtener granos rodeados de una capa de protección llamada pergamino o cascarilla. El proceso continúa con preparar esta presentación de granos para su almacenamiento, que consiste en bajar su humedad entre 11 %-12 % (Bekedam, 2008).

Para la venta o para continuar con el proceso de tostado, a los granos almacenados se les retira el pergamino y se obtiene el grano verde, también llamado oro. Por último, seguido de la molienda se lleva a cabo la infusión de café para producir la conocida taza de café (Bekedam, 2008).

2.3. Los grupos de café más importantes de la especie *coffea arabica*

Para la especie arábica se destacan en el mundo dos subtipos, en cuanto a cultura y genética, son las cultivares Typica y Bourbon. Estas variedades se extrajeron del sudoeste de Etiopía hasta Yemen y, en la actualidad, muchos de los cultivos se desarrollan en América Latina con base en estas variedades. Por ejemplo, en Brasil el mayor porcentaje de producción implica estos tipos de café (Research World Coffee, 2016).

2.4. Ácidos clorogénicos en granos de café

En el café existen varios compuestos bioactivos, entre los cuales se destacan los ácidos clorogénicos y sus características antioxidantes (Jeszka *et al.*, 2014). Estos compuestos bioactivos están relacionados con las características sensoriales de la bebida y para la cuantificación de estos compuestos es necesario el uso de métodos precisos y sensibles (Nuhu, 2014).

Los ácidos clorogénicos individuales (CGA) son compuestos fenólicos presentes en las plantas, que cumplen la función de proteger a la misma contra el estrés ambiental. Además, presentan propiedades antioxidantes, a las que se le

atribuyen beneficios para la salud del ser humano. El ácido clorogénico funciona como un intermedio en la biosíntesis de lignina, es un polímero orgánico importante en los tejidos estructurales de las paredes celulares de las plantas y posee características de rigidez y soporte (Farah y Duarte, 2014).

Los CGA utilizan la nomenclatura IUPAC (es un sistema de nomenclatura de compuestos químicos y de descripción de la ciencia y de la química en general). Las concentraciones de CGA son variantes, dependen de la especie, el clima, el suelo, el tipo de proceso de beneficiado y el grado de tueste (Farah y Duarte, 2014; Jeszka *et al.*, 2014).

Asimismo, están presentes en los granos verdes de las especies *arabica* y *canephora*, en un porcentaje de contenido de un 6 % y 10 % respectivamente. Los ácidos clorogénicos individuales (CGA) se componen de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, cumarico, sinapico) esterificados con el ácido quínico y están presentes en los granos de café. También forman mono y di esterés que constituyen isómeros en las posiciones 1-3-4-5 del ácido quínico (Suárez *et al.*, 2013) (ver Figura 1).

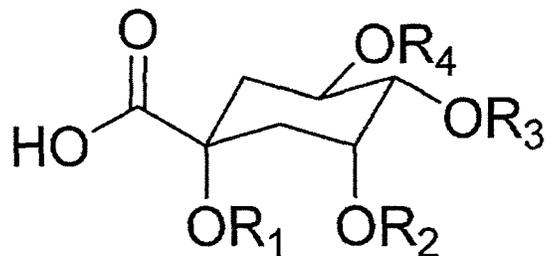


Figura 1

Muestra la molécula química del ácido quínico y su fórmula química es C₇H₁₂O₆

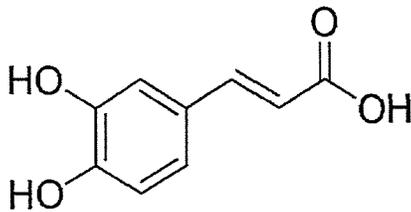
Fuente: Erk *et al.* (2014).

Para la aplicación de este método los compuestos que se analizan son isómeros mono y di ésteres del ácido quínico con el ácido cafeico y ferúlico (ver Figura 2). Estos son tres ácidos mono-cafeoilquinicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA), tres ácidos di-cafeoilquinicos (3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA), los tres ácidos feruloilquinicos (3- FQA, 4- FQA y 5-FQA) y las dos lactonas de ácidos clorogénicos (3-CGL y 4-CGL) en granos de café tostado (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).

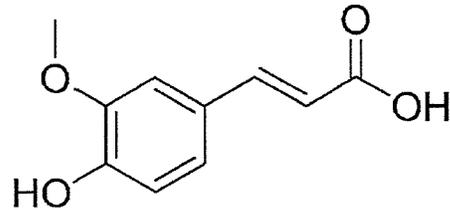
En la Figura 2 se muestran las estructuras, fórmulas y masas moleculares del ácido cafeico y el ácido ferúlico respectivamente. Estos compuestos se unen con el ácido quínico para formar ácidos clorogénicos en el café.

Ácido Cafeico

Ácido Ferúlico



Fórmula química: $C_9H_8O_4$
 Masa molecular: 180,16 g/mol



Fórmula química: $C_{10}H_{10}O_4$
 Masa molecular: 194,18 g/mol

Figura 2

Estructuras, fórmulas y masas moleculares del ácido cafeico y el ácido ferúlico

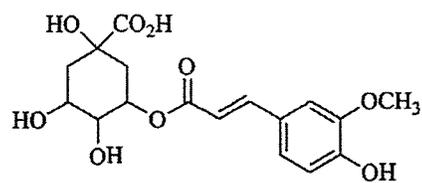
Fuente: Erk *et al.* (2014).

En el Cuadro 1 se muestran las estructuras, fórmulas y masas moleculares los tres ácidos mono-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA), tres ácidos di-cafeoilquínicos (3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA), los tres ácidos feruloilquínicos (3- FQA, 4- FQA y 5-FQA) y las dos lactonas de ácidos clorogénicos (3-CGL y 4-CGL), presentes en el café tostado (Marín y Puerta, 2008).

Cuadro 1

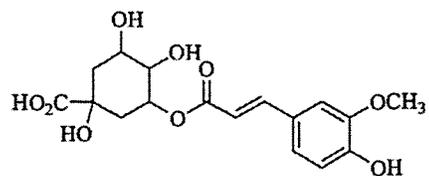
Estructuras, fórmulas y masas moleculares de isómeros mono y di ésteres del ácido quínico con el ácido cafeico y ferúlico

Ácidos Clorogénicos del café tostado			
Nombre IUPAC	Fórmula Molecular	Abreviatura	Estructura Química Molecular
Ácido 5-O-feruloilquínico	$C_{17}H_{20}O_9$	5-FQA	



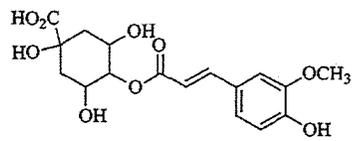
Ácido
3-O-feruloilquínico

$C_{17}H_{20}O_9$ 3-FQA



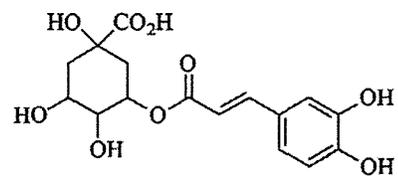
Ácido
4-O-feruloilquínico

$C_{17}H_{20}O_9$ 4-FQA



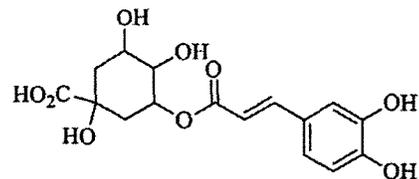
Ácido 5-cafeolquínico

$C_{16}H_{18}O_9$ 5-CQA



Ácido 3-cafeolquínico

$C_{16}H_{18}O_9$ 3-CQA



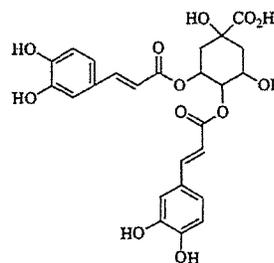
Ácido 4-cafeoilquínico

$C_{16}H_{18}O_9$

Ácido
3,4-dicafeoilquínico

$C_{25}H_{24}O_{12}$

3,4-diCQA



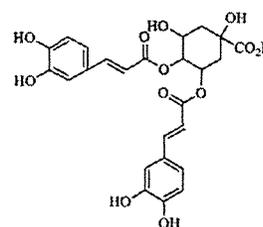
Ácido
3,5-dicafeoilquínico

$C_{25}H_{24}O_{12}$

Ácido
4,5-dicafeoilquínico

$C_{25}H_{24}O_{12}$

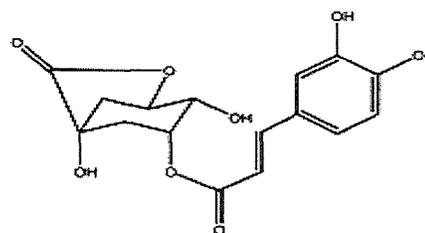
4,5-diCQA



Ácido
3-o-cafeoilquínico
lactona

$C_{16}H_{13}O_8$

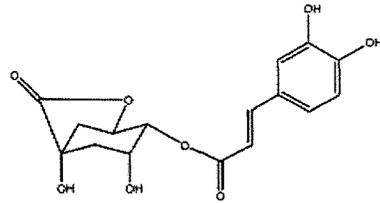
3-CQL



Ácido
4-o-cafeoilquínico
lactona

$C_{16}H_{13}O_8$

4-CQL



Fuente: Dawidowicz y Typek (2017) y Mills *et al.* (2013).

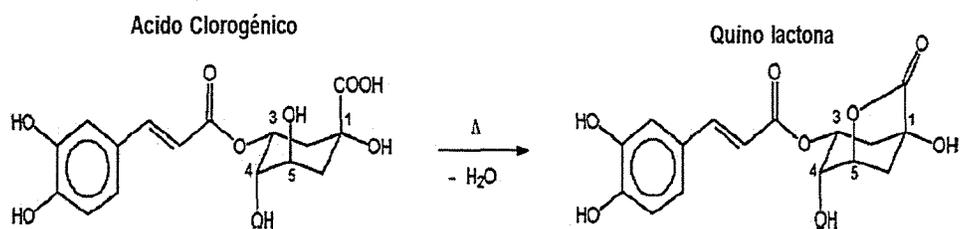
2.5. Efecto del tueste sobre los ácidos clorogénicos en el café

Cuando el grano de café pasa por el proceso de tostado, el ácido clorogénico 5-cafeoilquinico (5-CQA), produce productos de oxidación, que están asociados con una taza de mala calidad, por la presencia de sabores desagradables y de astringencia (Nuhu, 2014). Esto se debe a que el contenido de CGA disminuye conforme aumenta el tostado del grano (Narita e Inouye, 2014).

Durante el proceso de tostado o torrefacción, los granos de café se someten a temperaturas entre los 200° y 300 °C, con un calentamiento uniforme, con ayuda de agitación. Los granos de café durante el tueste cambian de color, de verde-amarillo, amarillo marrón y, finalmente, a un marrón más oscuro y aceitoso. El sabor amargo que se genera con el tostado del café se debe a la formación de lactonas del ácido clorogénico, CGL (Narita e Inouye, 2014) (ver Figura 4).

Los ácidos clorogénicos se isomerizan y se transforman en quino lactonas debido a la deshidratación y formación de un enlace intramolecular. En la Figura 3 se aprecia la formación de ácido clorogénico en 1,5- γ -quinolactona, debido a la

deshidratación que sufre durante el tueste del grano de café. En la Figura 4 se muestran las estructuras químicas de las lactonas principales en el grano de café tostado, estas son 3-cafeoilquinico-1,5-γ-lactona y 4-cafeoilquinico-1,5-γ-lactona (Farah y Donangelo, 2006).

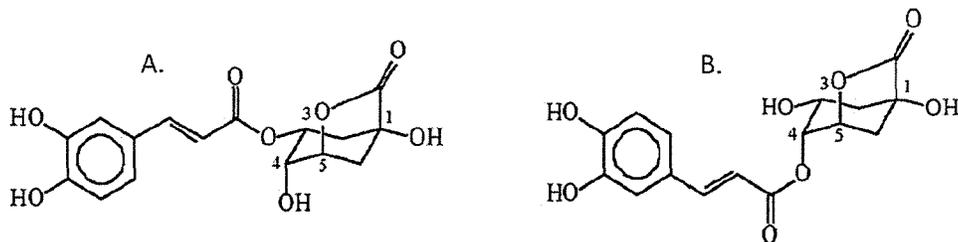


Δ: Deshidratación, eliminación de una molécula de agua del compuesto de ácido clorogénico.

Figura 3

Transformación del ácido clorogénico en quino lactona

Fuente: Dawidowicz y Typek (2017).



A: es 3-cafeoilquinico-1,5-γ-lactona.

B: es 4-cafeoilquinico-1,5-γ-lactona.

Figura 4

Estructuras químicas de las principales quino lactonas presentes en el grano de café tostado

Fuente: Dawidowicz y Typek (2017).

2.6. Beneficios del café para la salud de consumidor

El café posee muchos beneficios para la salud, gracias a la presencia de los ácidos clorogénicos que desempeñan un papel muy importante en el grano de café. Entre las ventajas se encuentra que contiene propiedades antioxidantes, por ejemplo, los compuestos de 3, 4 y 5 CQA, las cuales son similares a α -tocoferol y ácido ascórbico. Además, se encuentran mayores efectos antioxidantes en los granos que contienen los tres isómeros diCQA (3,4-, 3,5- y 4,5-diCQA) (Narita e Inouye, 2014).

Se han realizado estudios sobre los efectos terapéuticos de los ácidos clorogénicos en el tratamiento del cáncer; por ejemplo, el complejo de ácido clorogénico (CGA7), inhibe el cáncer de colon. Por lo tanto, se puede utilizar para la prevención. Los ácidos clorogénicos tienen propiedades antiinflamatorias y antibacterianas, así como efectos curativos contra el control de la obesidad y la diabetes. El consumo de estos compuestos puede reducir el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (Gouthamchandra *et al.*, 2017; Mills *et al.*, 2013).

Por último, el ácido clorogénico que se encuentra principalmente en los granos de café, 5-CQA, presenta la propiedad de proteger las neuronas. Por este motivo, se le atribuye la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Jeszka *et al.*, 2016).

2.7. Técnicas que se utilizan en la determinación de ácidos clorogénicos en café

A continuación, se presentan los detalles de estas técnicas.

2.7.1. Técnica de espectroscopía de absorción molecular por ultravioleta (UVVis)

La técnica de espectroscopía de absorción molecular por ultravioleta visible es una de las técnicas que más se utilizan en los laboratorios analíticos. Para la determinación de ácidos clorogénicos en café verde se encuentra el método espectrofotométrico oficial AOAC 957.04 (AOAC Internacional, 2016).

Esta técnica de análisis se basa en la absorción de luz en las regiones visibles y ultravioletas del espectro electromagnético, principalmente de compuestos orgánicos que presentan grupos funcionales no saturados, los cuales absorben radiación a una longitud de onda específica en la región del espectro. Por lo tanto, la luz absorbida tiene una relación lineal con la concentración del analito, según la Ley de Beer (Gras *et al.*, 2005).

2.7.2. Técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La técnica HPLC posee muchas aplicaciones en el análisis de productos de toda la industria. Por lo tanto, es el método más aplicado para la determinación de

los compuestos de café, debido a sus bajos límites de detección y variabilidad en el análisis (Nuhu, 2014).

Para el análisis casi de cualquier molécula existe la técnica de HPLC, instrumento fundamental en muchos laboratorios de control de calidad. El objetivo de la cromatografía líquida de alta resolución es analizar cualquier compuesto disuelto en agua, de una forma rápida y sencilla, con la mejor sensibilidad y selectividad para detección en analitos orgánicos e inorgánicos (García y Yusá, 2016).

En la técnica de cromatografía líquida existen varios componentes que influyen en la separación o detección, entre ellos la fase móvil, el soluto y la columna o fase estacionaria. Las fuerzas que interactúan entre estos componentes definen los tipos de cromatografías HPLC. Para este estudio se utiliza la cromatografía en fase reversa, esto es cuando las cadenas funcionales R son apolares y R puede ser una cadena de C8 (n-óctil) o C18 (n-octadecil). Al contrario, la fase móvil es de carácter polar, generalmente son mezclas de agua con metanol, acetonitrilo, etc. y los analitos poseen tiempo de retención de más polar al menos polar (Faraldos y Goberna, 2009).

2.8. Instituto del Café de Costa Rica

El instituto del Café de Costa Rica se fundó en 1933, como ente que regula toda la actividad cafetalera del país y tiene el objetivo de promover, de forma

equitativa, la producción cafetalera en el sector cafetalero. Este sector está conformado por beneficiadores, productores, exportadores y torrefactores. Además, el Icafe debe apoyar la exportación y comercialización del café (Icafe-MC-01v1 Manual Calidad Laboratorio Químico, 2015).

EL Icafe constantemente busca investigar y desarrollar nuevas prácticas cafetaleras en el centro de investigación del café, Cicafe. El laboratorio químico forma parte importante de esta investigación, al brindar apoyo al sector cafetalero con temas y análisis de la química de café. En este se hacen determinaciones del contenido de azúcares, ácidos clorogénicos, humedad, ocratoxinas y otros, en café en grano verde y tostado (Icafe-MC-01v1 Manual Calidad Laboratorio Químico, 2015).

2.9. Regiones cafetaleras de Costa Rica

Costa Rica cuenta con ocho regiones cafetaleras: Valle Occidente, Valle Central, Guanacaste, Turrialba, Orosí, Tarrazú, Brunca y Tres Ríos. Las diferencias entre ellas son generadas por el clima, la altitud, la temperatura y las variedades de *coffea arabica* que se utilizan (ver Figura 5). Estos factores influyen en el sabor (sobre todo en la acidez) y el aroma de la bebida. Estas regiones se encuentran distribuidas desde las zonas más bajas, menos de los 1000 m s. n. m. y las zonas más altas, más de 1200 m s. n. m. En las primeras el café es más liviano y en las segundas el café es más fuerte o ácido (Icafe, 2015).



Figura 5
Las ocho regiones cafetaleras de Costa Rica

Fuente: La Cafeografía (2016).

Capítulo III. Marco metodológico

3.1. Optimización de la metodología para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de Coffea arabica, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En los siguientes apartados se detalla toda la información perteneciente al marco metodológico.

3.1.1. Descripción del método para análisis de CGA en HPLC para café tostado

Esta práctica dirigida se llevó a cabo en el laboratorio químico del Centro de investigaciones del café de Costa Rica (Cicafe), que pertenece al Instituto del café de Costa Rica (Icafe). Para esto se implementó y verificó una nueva metodología de análisis, Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC, con la cual se puedan brindar servicios al sector cafetalero y a los clientes internos del Cicafe.

El método de análisis que se utiliza se basó en la Norma Alemana DIN 10767:2015-08 Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble, método de HPLC. El DIN es el instituto alemán de normalización y la comisión de normas del DIN elaboró esta norma para alimentos y productos agrícolas (NAL). El Icafe contrató a un traductor oficial del Ministerio de Relaciones

Exteriores para la traducción al español de esta Norma Alemana (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).

Los compuestos de ácidos clorogénicos que se determinaron por este método de análisis fueron tres ácidos mono-cafeoilquinicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA), tres ácidos di-cafeoilquinicos (3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA), los tres ácidos feruloilquinicos (3- FQA, 4- FQA y 5-FQA) y las dos lactonas de ácidos clorogénicos (3-CGL y 4-CGL) en granos de café tostado (Deutsche Norm DIN 10767, 2015) (ver Figura 2).

El contenido de cada CGA se calculó y reportó con base en el Ácido 5-O cafeoilquinico (5-CQA) en g/100 g de masa seca, el estándar que se utilizó para llevar a cabo la curva de calibración fue el ácido n-clorogénico ($M=354,32$ g/mol) marca SIGMA de 95 % de pureza. La norma DIN 10767:1992-05 permite cuantificar los CGA individuales con respecto al estándar de ácido 5-CQA, si no se cuenta con los otros estándares de referencia. Para esto, se emplea un factor de conversión que se obtiene de la relación de los coeficientes de extinción de las masas molares del 5-CQA en relación con los compuestos 3-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3- FQA, 4- FQA, 5-FQA, 3-CGL y 4-CGL.

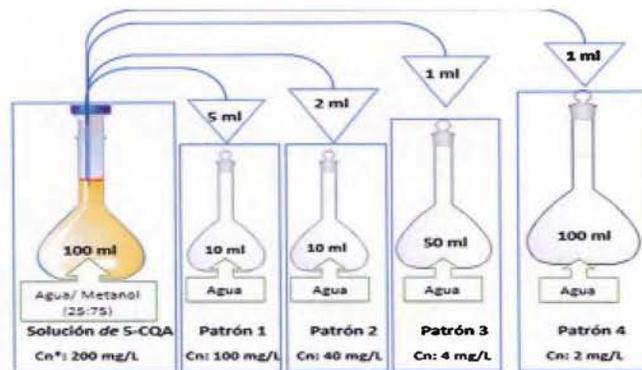
Por lo tanto, para esta práctica dirigida se preparó únicamente una curva de calibración del estándar 5-CQA, ya que no se contaba con el resto de los estándares y no se lograron adquirir durante este trabajo. El cálculo de estos compuestos se llevó a cabo como se describe en el párrafo anterior, según la Ecuación 1, descrita

en el punto 3.1.8, más adelante en este trabajo. El tiempo de retención se obtuvo a partir de la descripción del cromatograma de HPLC de referencia que da la Norma DIN 10767:2015-05 y las publicaciones de otros autores (Deutsche Norm DIN 10767, 2015; Marín y Puerta, 2008; Shan *et al.*, 2017).

3.1.2. Reactivos y soluciones para el método de análisis de CGA en HPLC para café tostado

Los reactivos que se utilizaron fueron de alta pureza para análisis de HPLC: acetonitrilo, agua tipo 1 (ultrapura), metanol, mezcla de metanol y agua al 25 % para la preparación de la solución madre del estándar 5-CQA y mezcla de metanol y agua al 50 % para la preparación de las muestras. Para la fase móvil del método de HPLC se utilizó un gradiente de soluciones de ácido acético al 2 %v/v y acetonitrilo para HPLC. Ambas soluciones se filtraron por sistema de filtración al vacío con filtros de membrana 0,45 µm para eliminar impureza y gases.

En la Figura 6 se observa la preparación de la curva de calibración de 5-CQA. Se preparó una solución madre estándar de 5-CQA de una concentración de 200 mg/L y se tomaron 5 ml, 2 ml, 1 ml y 1 ml para preparar los patrones de 100 mg/L, 40 mg/L, 4 mg/L y 2 mg/L en balones de 10 ml, 10 ml, 50 ml y 100 ml, respectivamente y después se aforaron con agua tipo 1. Luego, se inyectó en el HPLC después de pasar por filtros de membrana de 0,45 µm.



Cn*: Concentración de cada solución patrón en miligramos por litros (mg/L).

Figura 6
Curva de calibración del estándar de Ácido 5-CQA

Fuente: Elaboración propia con base en la información de la norma alemana DIN 10767:2015-08.

3.1.3. Equipos para el método de análisis de CGA en HPLC para café tostado

La cantidad de café tostado que se utiliza para la determinación de CGA en HPLC se nombrará *muestra*, por lo tanto, cada café tostado que tenga asignado un código de identificación será una muestra para efectos de esta práctica dirigida. La medición de la masa de las muestras para el análisis se llevó a cabo en una balanza analítica, debido a que esta medición se debe realizar con una exactitud y precisión de 0,0001 g y después se extrajeron en un baño ultrasónico marca BRANSON a una temperatura de 60 °C.

El equipo de HPLC que se utilizó es marca Thermo Scientific/Dionex modelo Ultimate 3000. Este posee un detector de longitud de onda variable modelo WWD-3400RS, tiene lámparas de deuterio y tungsteno; con capacidad para medir

hasta 200 Hz y registrar hasta cuatro longitudes de onda (Thermo Fisher Scientific, 2012). Este equipo de HPLC posee un automuestreador modelo WPS-3000SL, con jeringa de 100 µl, sample loop 100 µl y buffer loop 100 µl. Además, posee válvula de inyección de 2 puertos y 6 puertos adecuada para presiones <62 MPa (9000 psi) (Thermo Fisher Scientific, 2013).

3.1.4. Condiciones cromatográficas para el método de análisis de CGA en HPLC para café tostado

Las condiciones cromatográficas que se utilizan para la optimización del método de análisis de CQA en HPLC para café tostado se basaron en las recomendaciones de la Norma Alemana DIN 10767:2015-08 (Deutsche Norm DIN 10767, 2015). Estas condiciones cromatográficas se resumen en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Condiciones cromatográficas para el método de análisis "Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC"

	Método DIN 10767:2015-08	Optimización del Método
Columna Cromatográfica		
Diámetros	2 mm hasta 5 mm	3 mm
Longitud	150 mm hasta 250 mm	150 mm
Relleno	Derivado de octadecilo (C-18). Fase de polaridad similar (Fenil-Hexil).	C-18
Tamaño de partícula	5 µm o más pequeña	3 µm
Condiciones Cromatográficas		
Detector	Ultravioleta Visible para HPLC	Ultravioleta Visible para HPLC
Longitud de onda	324 nm	324 nm

Volumen de inyección	5 µl y 20 µl	5 µl
Flujo	4,6 mm = 1 ml/min 2 mm = 0,25 ml/min	3 mm = 0,5 ml/min
Composición de la fase móvil	Gradiente de eluyentes A y B A: Ácido acético al 2 % (acuoso) B: Acetonitrilo	Gradiente de eluyentes A y B A: Ácido acético al 2 % (acuoso) B: Acetonitrilo

Fuente: Elaboración propia con base en la información de la Norma Alemana DIN 10767:2015-08.

3.1.4.1. Columna cromatográfica

La Norma Alemana DIN 10767:2015-08 recomienda que las columnas separadoras analíticas se mantengan en las siguientes características: diámetros internos de 2 mm hasta 5 mm, longitud externa de 150 mm hasta 250 mm, relleno interno de un compuesto de derivado de octadecilo (C18) o una fase de polaridad similar y el tamaño de partícula interna de 5 µm hasta más pequeña.

Para el desarrollo de este método de análisis de CGA en HPLC para café tostado se utilizó una columna cromatográfica Thermo Acclaim 120 C18 3 µm (3 mm x 150 mm). Esta posee un tamaño de partícula 3 µm, una longitud de 150 mm, un diámetro interno de 3 mm, un relleno interno C18 y marca Thermo.

3.1.4.2. Longitud de onda y volumen de inyección

La longitud de onda de trabajo para detección de CGA fue de 324 nm y el volumen de inyección de la muestra fue de 5 µl, según la norma se recomienda 5 µl a 20 µl. El volumen de inyección utilizado presentó la mejor resolución de la señal cromatográfica (pico cromatográfico).

3.1.4.3. Flujo y composición de la fase móvil

La norma alemana DIN 10767:2015-08 recomienda un flujo de 1 ml/min para columnas cromatográficas con diámetro de 4,6 mm y un flujo de 0,25 ml/min para cromatográficas con diámetro de 2 mm. Se utilizó un flujo de 0,5 ml/min para la columna empleada (Thermo Acclaim 120 C18 3 μ m (3 x 150 mm)). Esto se obtuvo a partir de inyectar en el HPLC varias veces una muestra de café tostado a diferente flujo entre 0,2 ml/min hasta 1 ml/min hasta obtener un cromatograma de HPLC bien resuelto.

La fase móvil del sistema cromatográfico es un gradiente de soluciones de ácido acético (al 2 % v/v) y acetonitrilo (grado HPLC), que varían su porcentaje de concentración según el tiempo. Esto se describe en la Figura 7.

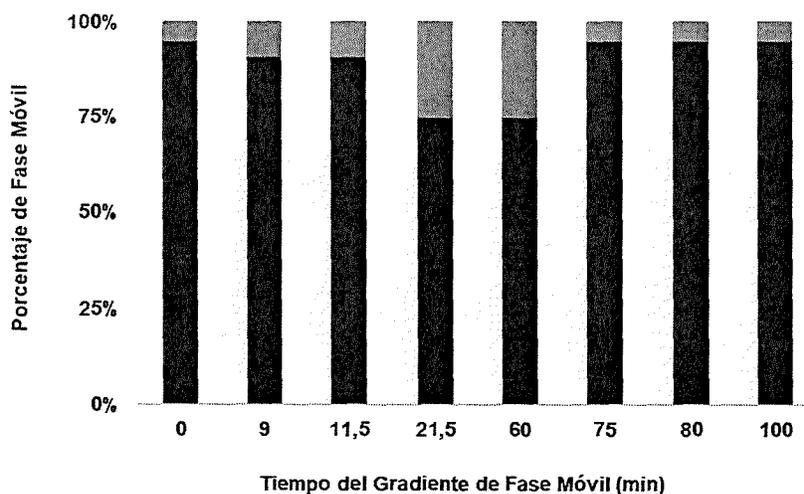


Figura 7

Gradiente de eluyentes de fase móvil del sistema cromatográfico para la Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC

█: Porcentaje de ácido acético al 2 % v/v del gradiente de fase móvil.

█: Porcentajes de Acetonitrilo del gradiente de fase móvil.

Fuente: Elaboración propia con base en la información de La Norma Alemana DIN 10767:2015-08

3.1.5. Preparación de la extracción de la muestra de café para la optimización del método para análisis de CGA en HPLC para café tostado

Se seleccionó una muestra de café tostado molido de la custodia de muestras del laboratorio químico del Icafe. Esta muestra se pasó por tamices de tamaños de malla 0,63 y 0,25 mm, la medición de la masa se llevó a cabo con la muestra de café que quedó entre ambos tamices.

En balanza analítica se pesaron aproximadamente 0,2 g de café en un frasco erlenmeyer de 50 ml y después se agregaron 25 ml de una mezcla de 50 % metanol y 50 % agua del volumen total. Después, se colocó durante 15 minutos a 60°C en el baño ultrasónico.

La solución extraída se decantó en un balón de 50 ml y al residuo que quedó en el frasco erlenmeyer se le volvió a agregar 25 ml de una mezcla de 50 % metanol y 50 % agua del volumen total y se volvió a decantar en el balón de 50 ml. Cuando la temperatura de la solución final del balón de 50 ml estuvo a 25°C se completó el volumen con agua y se mezcló. Posteriormente, se filtró por membrana (0,45 µm) y se inyectó 5 µl el filtrado en el sistema de HPLC.

3.1.6. Comparación del orden de elución de los compuestos de ácidos clorogénicos reportados por la Norma Alemana DIN 10767

En la Figura 8 se muestra en un cromatograma el orden de elución de los compuestos 3-CQA, 5-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3- FQA, 4- FQA, 5-FQA, 3-CGL y 4-CGL, según las condiciones cromatográficas aplicadas en la Norma Alemana DIN 10767.

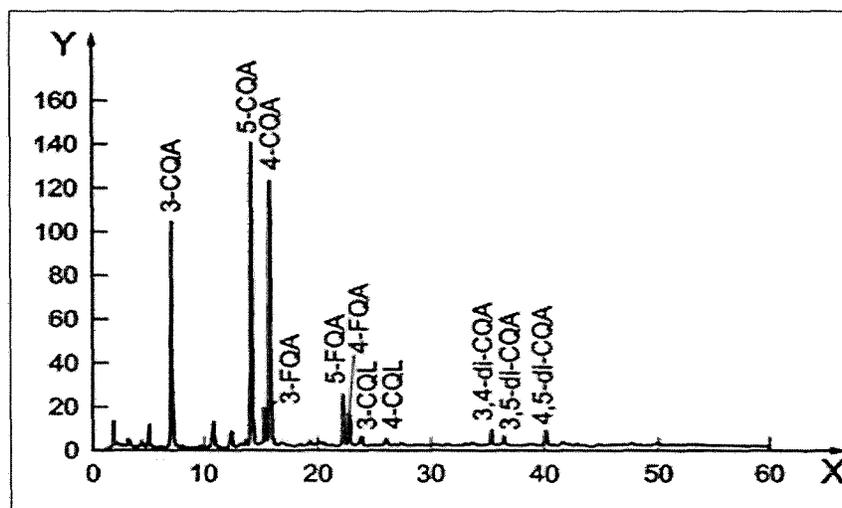


Figura 8
Cromatograma de HPLC reportado para la Norma Alemana DIN 10767:2015-08 Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble. Método de HPLC

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

El cromatograma de HPLC de la Figura 8 se comparó con el cromatograma obtenido para una muestra de café tostado, en la optimización de metodología de análisis, Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC, del laboratorio químico del Icafe. El tiempo de elución de los compuestos de

ácidos clorogénicos en la muestra de café se determinó según el orden de elución del cromatograma de la Norma Alemana DIN 10767:2015-08.

3.1.7. Análisis de evaluación de la aptitud del sistema para la optimización del método para análisis de CGA en HPLC para café tostado

El análisis de evaluación de la aptitud del sistema es una verificación de los parámetros cromatográficos que se utilizan en los métodos analíticos para garantizar que el sistema de medición funciona adecuadamente. Este también se conoce también como prueba de idoneidad y es importante antes de la verificación o validación de un método analítico que se utiliza por primera vez (Faife y Corea, 2009).

Por lo tanto, se llevó a cabo una prueba de idoneidad para evaluar las condiciones analíticas del análisis de CGA en HPLC para café tostado. Los parámetros cromatográficos analizados se describen junto con su especificación o criterio de aceptación en el Cuadro 3 (Sanabria *et al.*, 2017; Sierra y Gómez, 2014).

Cuadro 3

Parámetros y especificaciones para la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico HPLC para la "Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado por HPLC"

Parámetro 1*	Descripción	Especificación
Repetibilidad CV	Coefficiente de variación de las áreas obtenidas para una misma sustancia	< 2 %
Número de platos teóricos	Mide la eficiencia de la columna cromatográfica que se utiliza para el sistema de HPLC	> 2000

Factor de Asimetría	Es la simetría de los picos cromatográficos	< 1,5
Resolución	Es el cálculo de la cercanía entre dos picos cromatográficos adyacentes	> 1,5

^{1*}: Estos parámetros fueron calculados automáticamente por el *software* del equipo HPLC, "Thermo Scientific Dionex Chromeleon 7 Chromatography Data System, Versión 7.2 S. R 4", pero también se realizaron los cálculos en Microsoft Excel para validar los resultados por el *software* del equipo HPLC.

Fuente: Elaboración propia con base en información de Sanabria *et al.* (2017) y Sierra y Gómez (2014).

3.1.7.1. Evaluación de la prueba de idoneidad del sistema

cromatográfico de HPLC

Para evaluar el sistema cromatográfico se preparó un estándar 5-CQA con una concentración de aproximadamente 200 mg/L y se le realizaron 10 inyecciones. Además, se analizaron los parámetros del Cuadro 2.

3.1.7.2. Evaluación de la prueba de idoneidad del método de análisis

para HPLC

Debido a que no se cuenta con los otros estándares de CGA la evaluación de la aptitud del sistema del método de análisis se hizo con una muestra de café tostado, identificando cada ácido clorogénico según el tiempo de retención del cromatograma de la Norma Alemana DIN 10767:2015-08. Asimismo, se realizaron 10 extracciones independientes de la muestra y se inyectaron una vez cada uno en el sistema de HPLC. Los resultados de los parámetros de idoneidad fueron el promedio de las 10 réplicas.

3.1.8. Descripción del cálculo de ácidos clorogénicos individuales según el método para análisis de CGA en HPLC para café tostado

Para llevar a cabo el cálculo del contenido de cada CGA individual se utiliza la Ecuación 1, referenciada por la Norma Alemana DIN 10767:2015-08. Esta ecuación permite determinar el contenido de los compuestos 3-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3- FQA, 4- FQA, 5-FQA, 3-CGL y 4-CGL, a partir de la curva de calibración de 5-CQA. Por lo tanto, los resultados se reportaron con base en el 5-CQA.

$$((A_i - b) \cdot V \cdot f) / (100 \cdot a \cdot m \cdot WDM) = W_i$$

Ecuación 1

Cálculo del contenido de cada CGA individual para el método de determinación de CGA en café tostado

Donde:

W_i = La fracción de masa del derivado del CGA, en porcentaje y calculada sobre base seca.

A_i = El área del derivado del CGA correspondiente que debe determinarse, en unidades de área. b = La sección del eje de la recta de calibración de estándar de calibración 5-CQA, en unidades de área.

V = Volumen total de las extracciones realizadas a las de café (50 ml).

F = El factor de conversión que se obtiene de los coeficientes de extinción de muestras los analitos individuales. Para CQA y CGL es 1 y para los di-CQA y FQA es 0,77.

A = La pendiente de la recta de calibración de estándar de calibración 5-CQA, en unidades de área. m = Cantidad de muestra en gramos que se pesó.

WDM = Fracción de masa seca de la muestra, en porcentaje.

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

3.2. Validación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de arábica (Coffea), mediante HPLC

A continuación, se detalla toda la información.

3.2.1. Procedimiento de validación del método normalizado para el análisis de CQA en HPLC para café tostado

El procedimiento de validación para el método de análisis de CQA en HPLC para café tostado se basó en los requerimientos que ofrecen los criterios descritos en el ECA-MC-C18 Criterios para evaluación y acreditación de laboratorios bajo la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017. Estos criterios corresponden a veracidad (sesgo), precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación, sensibilidad (pendiente), especificidad, falsos positivos o falsos negativos, recuperación, estimación de la incertidumbre y robustez (ECA, 2019).

Este documento del ECA declara que, si un laboratorio de ensayo utiliza un método normalizado sin ninguna modificación, debe verificar los parámetros de desempeño anteriores contra los valores establecidos en el método normalizado. Por otra parte, si no se cuenta con valores de referencia, el laboratorio puede establecer sus valores con documentación técnica o en consenso con el cliente (ECA, 2019).

El método para el análisis de CQA en HPLC que se utiliza en esta práctica dirigida se basa en la Norma Alemana DIN 10767:2015-08 Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble. Método de HPLC (Deutsche Norm DIN 10767, 2015). Al ser un método desarrollado por un organismo de normalización en Alemania, se considera un método normalizado según el ECA-MC-C18.

En este método se cuantifican 11 ácidos clorogénicos calculados como 5-CQA, porque solo se cuenta con este material de referencia. Por lo tanto, la verificación se lleva a cabo únicamente para el ácido 5-CQA, ya que no se puede cumplir con la revisión de todos los parámetros que solicita el ECA para los compuestos 3-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3- FQA, 4- FQA, 5-FQA, 3-CGL y 4-CGL, al no contar con los materiales de referencia.

3.2.2. Descripción y verificación de los parámetros de desempeño del método para el análisis de CQA en HPLC para café tostado

La información se detalla en los siguientes apartados.

3.2.2.1. *Parámetros de desempeño de la norma alemana 10767.*

Los parámetros de desempeño para la precisión que la norma alemana DIN 10767 declara se muestran en el Cuadro 4. La norma indica que el parámetro de desempeño para la repetibilidad se evalúa al tomar en cuenta la diferencia absoluta entre dos duplicados preparados independientemente de una misma muestra de

café. Este resultado se compara con el límite de repetibilidad del Cuadro 4 y no se debe sobrepasar en un 5 % del total de muestras analizadas.

Para evaluar lo descrito en el párrafo anterior se analizaron 6 muestras de café por duplicados independientes y las diferencias absolutas se compararon con el límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 170767.

Cuadro 4

Datos de parámetros de desempeño para la determinación de ácidos clorogénicos en una muestra de café (café tostado), según la norma alemana DIN 10767

Parámetro Estadístico	3-CQ A	5-CQ A	4-CQ A	3-FQ A	5-FQ A	4-FQ A	3-CQ L	4-CQ L	3,4-di- CQA	3,5-di- CQA	4,5-di- CQA
	Incertidumbre										
± 95 % - Nivel de confianza, g/kg	±0,10 3	±0,28 0	±0,17 5	±0,06 2	±0,18 9	±0,15 5	±0,36 3	±0,10 4	±0,072	±0,063	±0,037
Desviación estándar relativa de Horwitz, %	4.44	3.83	4.3	6.47	6.15	6.15	4.97	5.55	6.11	6.32	5.91
	Repetibilidad										
Límite de Repetibilidad, g/kg	0.2	0.296	0.243	0.048	0.113	0.071	0.085	0.075	0.058	0.062	0.052
Límite relativo de Repetibilidad	3.96	2.23	3.96	11.79	9.76	12.34	3.59	6.59	9.68	12.84	6.93

bilidad
r_{rel}, %

	Reproducibilidad										
Horrat	0.77	0.89	1.08	3.54	6.64	6.64	4.65	2.51	3.02	3.17	1.37

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

3.2.2.2. Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)

La precisión brinda información sobre la cercanía de los resultados en diferentes momentos, realizados en las mismas circunstancias de operación. Este parámetro incluye, a la vez, la repetibilidad y la precisión intermedia. La repetibilidad mide la concordancia de datos sobre una misma muestra y un operador, con las mismas condiciones de equipo y tiempo. La precisión intermedia evalúa el cambio de algunos de estos factores, analista, equipamiento, laboratorio o tiempo (Rato y Rivera, 2014).

Para la repetibilidad se realizaron 8 muestras independientes de un mismo café tostado, se inyectaron en el HPLC en el mismo día y se determinó el promedio y la desviación estándar de la repetibilidad. Para la precisión intermedia se realizaron 10 muestras independientes del mismo café que se utilizó para la repetibilidad. La prueba se efectuó durante dos días diferentes de análisis en un lapso de una semana para cada determinación (factor tiempo). Además, se determinó el promedio, la desviación estándar de la precisión intermedia y el coeficiente de variación (C.V) (Örnemark y Magnusson, 2014).

El criterio de aceptación para la repetibilidad, según la norma alemana DIN 10767:2015-08, debe cumplir con que la diferencia absoluta entre dos resultados de análisis individuales independientes el uno del otro, que se obtuvo al utilizar el mismo método, en materiales de muestra idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo analista, con los mismos aparatos, con diferencias de tiempo cortas entre ellos, no superará el valor del límite de repetibilidad de los valores en más del 5 % de los casos, según el Cuadro 5.

Cuadro 5

Datos de parámetros de desempeño para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad de ácidos clorogénicos en una muestra de café (café tostado), según la norma alemana DIN 10767

Parámetro Estadístico	3-C QA	5-C QA	4-C QA	3-FQ A	5-FQ A	4-FQ A	3-C QL	4-C QL	3,4-di-C QA	3,5-di-C QA	4,5-di-C QA
	Repetibilidad										
Límite de Repetibilidad r , g/kg	0.2	0.29 6	0.24 3	0.04 8	0.11 3	0.07 1	0.08 5	0.07 5	0.058	0.062	0.052
Límite relativo de Repetibilidad r_{rel} , %	3.96	2.23	3.96	11.7 9	9.76	12.3 4	3.59	6.59	9.68	12.84	6.93

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

Para la precisión intermedia se utilizó el coeficiente de variación de Horwitz, el cual se compara con el CV de las determinaciones realizadas de la repetibilidad y se obtiene el parámetro de Horrat. Los resultados se compararon con los datos

reportados en el parámetro de desempeño. El criterio de aceptación declarado por la norma alemana DIN 10767 para el parámetro de coeficiente de variación de Horwitz-Thompson y el parámetro de Horrat se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6

Datos de parámetros de desempeño para la determinación de la precisión intermedia de ácidos clorogénicos en una muestra de café (café tostado), según la norma alemana DIN 10767

Parámetro Estadístico	3-CQ A	5-CQ A	4-CQ A	3-FQ A	5-FQ A	4-FQ A	3-C QL	4-C QL	3,4-di-C QA	3,5-di-C QA	4,5-di-C QA
	Reproducibilidad										
HORR AT	0.77	0.89	1.08	3.54	6.64	6.64	4.65	2.51	3.02	3.17	1.37

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

Para los cálculos del coeficiente de variación de Horwitz-Thompson y el parámetro de Horrat se aplicó la Ecuación 2 y la Ecuación 3, respectivamente.

$$\%CV_{Horwitz} = 2C^{-0,1505}$$

Ecuación 2

Cálculo del coeficiente de variación de Horwitz-Thompson

Donde:

%CV Horwitz: Coeficiente de variación de Horwitz para precisión intermedia.

C: Valor nominal del analito expresado como potencia.

$$P_{Horrat} = CV / \%CV_{Horwitz}$$

Ecuación 3

Cálculo del parámetro de Horrat

Donde:

P_{HORRAT} : Es el parámetro de Horrat.

CV: Coeficiente de variación de las determinaciones para precisión intermedia.

CV_H: Coeficiente de variación de Horwitz para precisión intermedia.

Fuente: Comisión del Codex Alimentarius (2009).

3.2.2.3. Veracidad (sesgo) y recuperación

La veracidad (sesgo) evalúa la exactitud que existe en el resultado obtenido con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado y el valor real aprobado (Faife y Corea, 2009). La recuperación de analito es un enriquecimiento de la muestra con una cantidad de solución estándar del analito de interés. Este procedimiento permite evaluar el porcentaje de recuperación del analito (Minsa, 2005).

La veracidad (sesgo) se evaluó a través de un material fortificado con el estándar de 5-CQA. Se analizaron 10 muestras de café tostado fortificadas con una concentración teórica de estándar 5-CQA y se calculó la concentración real obtenida para cada muestra, se obtuvo el valor del sesgo según la Ecuación 4.

$$s = x - x'$$

Ecuación 4 *Cálculo del sesgo*

Donde:

s: Sesgo.

x: Lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

x': Valor esperado o de referencia del estándar.

Para evaluar el sesgo se debe llevar a cabo una prueba *t*-student, en la que el $t_{calc} < t_{crit}$, el t_{calc} se calcula a partir de la Ecuación 5. El t_{crit} se busca en la tabla de la distribución *t*-student (Anexo 4), se determina para grados de libertad de $v = n-1$ y con un nivel de 95 % de confianza. Para una cola, si $t_{calc} < t_{crit}$ el promedio no es significativamente más pequeño que el valor de referencia y para dos colas, si $t_{calc} < t_{crit}$ los resultados cumplen, porque no existe diferencia significativa (Duffau *et al.*, 2010).

$$T_{cal} = \frac{(X' - X'')}{S \times \sqrt{n}}$$

Ecuación 5

Cálculo de la t- student observada para el sesgo

Donde:

t_{cal} : t observado o calculado porcentaje de recuperaciones relativas de adiciones.

X' : Valor esperado o referencia en concentración.

X'' : El promedio de los valores obtenidos en concentración.

S : Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación.

n : Número de lecturas o valores observados.

Para evaluar la recuperación se analizaron 10 muestras de café tostado por duplicado y a esas mismas muestras se efectuaron adiciones del analito de interés por duplicado. Posteriormente, se compararon los valores medios de las muestras adicionadas con las no adicionadas para evaluar la recuperación neta de la adición, para esto, se utilizó la Ecuación 6 (Magnusson y Örmemark, 2014).

$$R'(\%) = \frac{x' - x}{x \text{ adición}}$$

Ecuación 6

Cálculo de las recuperaciones relativas de adiciones

Donde:

R' (%): Porcentaje de recuperaciones relativas de adiciones.

x': Valor medio de las muestras adicionadas.

x: Valor medio de las muestras sin adición.

x añadida: Concentración añadida.

Fuente: Magnusson y Örnemark (2014).

El criterio de aceptación se basó en una prueba *t*-student, en el que el $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$, el t_{calc} se calcula a partir de la Ecuación 7. El t_{crit} se busca en la tabla de la distribución *t*-student (Anexo 4), se determina para grados de libertad de $v = n-1$, 2 colas y con un nivel de 95 % de confianza. Si $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$ los resultados se deben corregir porque existe diferencia significativa y $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ los resultados cumplen, porque no existe diferencia significativa (Duffau *et al.*, 2010).

$$T_{\text{cal}} = \frac{(100 - \%R)}{S \times \sqrt{n}}$$

Ecuación 7

Cálculo de la t- student observada para la recuperación

Donde:

t_{cal} : *t* observado o calculado porcentaje de recuperaciones relativas de adiciones.

R: El promedio de las recuperaciones en porcentaje.

S: Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación.

n: Número de lecturas o valores observados.

Fuente: Magnusson y Örnemark (2014).

Posteriormente, también se utilizó el criterio basado en la tabla de la AOAC (ver Anexo 5), la cual muestra el rango de recuperación aceptable según la concentración esperada de analito (Duffau *et al.*, 2010).

3.2.2.4. Linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación

Para la evaluación de estos parámetros se analizó y se reportó el promedio de 10 curvas de calibración del método para análisis de CQA en HPLC para café tostado, preparada según la Norma DIN 10767 para el estándar de 5-CQA (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).

La linealidad es la capacidad del método para análisis de CQA en HPLC para café tostado para generar resultados lineales que resultan proporcionales a la concentración del analito en el ámbito de trabajo establecido (Aguirre Ortega *et al.*, 2001). La sensibilidad corresponde a la pendiente de la curva de calibración, que indica el grado de respuesta de la señal del equipo con respecto a la concentración (Faife y Corea, 2009).

Para la evaluación de la linealidad, se llevó a cabo una comprobación estadística que comprende el cálculo de la línea de regresión por medio del método de mínimos cuadrados. La línea de regresión se representa con la Ecuación 8 (Skoog *et al.*, 2001).

$$y = mx + b$$

Ecuación 8

Cálculo de la línea de regresión

Donde:

y = Es la respuesta o señal (absorbancia) obtenida ante la concentración del analito.

M = pendiente de la línea de regresión, está relacionada con la sensibilidad del método (respuesta del método ante los cambios de concentración del analito). Si la pendiente aumenta la sensibilidad aumenta.

x = valor de la concentración del analito en términos de concentración.

B = el término independiente se define como la intersección de la línea de regresión con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no es diferente estadísticamente de cero de no haber sesgo.

Fuente: Skoog *et al.* (2001).

El método de mínimos cuadrados genera una línea de regresión que se ajusta mejor a los puntos de experimentación. Este método también genera la desviación estándar de la línea de regresión (S_r), la desviación estándar la pendiente (S_m) y la intersección en b (S_b). Asimismo, permite la evaluación del coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2) (Skoog *et al.*, 2001).

La relación que existe entre la variable (concentración de CGA) x y la variable y (Absorbancia de CGA) corresponde al coeficiente de correlación (r) y su valor recomendable es ≥ 0.999 (Aguirre *et al.*, 2001). El límite de detección es la mínima concentración del analito que puede detectarse, pero no cuantificarse específicamente, en un procedimiento analítico y con un nivel de confianza dado (Boqué, 2009).

El límite de cuantificación mide la capacidad del desempeño de un método analítico para la cuantificación mínima, exacta y precisa de un analito (Örnemark y Magnusson, 2014). Se aplicó la Ecuación 9 y la Ecuación 10 para el cálculo del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), respectivamente.

$$(LD = k \times Sb) / (m \times \sqrt{n})$$

Ecuación 9

Cálculo del límite de detección (LD)

$$(LC = k \times Sb) / (m \times \sqrt{n})$$

Ecuación 10

Cálculo del límite de cuantificación (LC)

Donde:

K = corresponde a la concentración equivalente a una señal de absorbancia igual a 3 desviaciones, la desviación estándar residual de la linealidad del sistema para el cálculo del límite de detección y 10 desviaciones para el cálculo del límite de cuantificación.

Sb = la desviación estándar de la línea de regresión se calcula a partir del método de mínimos cuadrados.

m = pendiente de la ecuación de la línea de regresión, ver Ecuación 5.

N = número de réplicas que se llevó a cabo el método de análisis, en este caso se realizó 3 veces.

Fuente: Skoog *et al.* (2001).

El laboratorio químico del Icafe cuenta con una hoja de cálculo para la validación de curvas de calibración, F-03-Icafe-PL-07v5 Validación Curvas Calibración. Esta se utilizó para validar la curva de validación del método para análisis de CQA en HPLC para café tostado (ver Anexo 2).

3.2.2.5. Estimación de la incertidumbre

La incertidumbre se define como el parámetro relacionado con el resultado de medición, que da información sobre la dispersión de este valor verdadero (Crubellti y Di Riso, 2009). Para evaluar la incertidumbre del método para análisis de CQA en HPLC para café tostado se utilizó la ecuación de Horwitz, ya que forma parte de los valores de desempeño estimados de la Norma DIN 10767. La norma también reporta datos de incertidumbre a partir desviación estándar de reproducibilidad (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).

Para laboratorios de ensayo que operan con la Norma ISO-17025, la ecuación de Horwitz es de mucha utilidad para evaluar el desempeño y el control de calidad de los análisis. Esto se debe a que se considera un criterio de aceptación y un constituyente importante de la incertidumbre en métodos de química analítica en la Unión Europea (Rivera y Rodríguez, 2010).

La ecuación de Horwitz (ver Ecuación 2) expresa la desviación estándar de la reproducibilidad como una función de la concentración de analitos. Por lo tanto, la incertidumbre de medición expandida se puede calcular con la Ecuación 9, con un nivel de confianza del 95 % (Rivera y Rodríguez, 2010).

Además, se calcula la incertidumbre expandida a partir de la desviación estándar de reproducibilidad según la Ecuación 10, de acuerdo con la Norma

Alemana DIN 10767. Los datos obtenidos y declarados por esta norma para el cálculo de la incertidumbre se observan en el Cuadro 7.

Cuadro 7

Datos de incertidumbre para la determinación de ácidos clorogénicos en café tostado, según la Norma Alemana DIN 10767

Parámetro Estadístico	3-C QA	5-C QA	4-C QA	3-FQ A	5-FQ A	4-FQ A	3-C QL	4-C QL	3,4-di-C QA	3,5-di-C QA	4,5-di-C QA
	Incertidumbre										
± 95 % - Nivel de confianza, g/kg	±0,103	±0,280	±0,175	±0,062	±0,189	±0,155	±0,363	±0,104	±0,072	±0,063	±0,037
Desviación estándar relativa de Horwitz, %	4.44	3.83	4.3	6.47	6.15	6.15	4.97	5.55	6.11	6.32	5.91

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

$$U' = 2 * \%CV \text{ Horwitz}$$

Ecuación 11

Cálculo de la incertidumbre de medición expandida según la ecuación de Horwitz

Donde:

% CV Horwitz= Coeficiente de variación de Horwitz para precisión intermedia. Ver Ecuación 2.

U'= incertidumbre de medición expandida.

Fuente: Rivera y Rodriguez (2010).

$$U = \frac{SR}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 12

Cálculo de la incertidumbre de medición expandida según desviación estándar de reproducibilidad en la Norma Alemana DIN 10767

Donde:

U: Incertidumbre de medición expandida.

SR: Desviación estándar reproducibilidad observada o experimental.

K: 2 factor de cobertura equivale a un nivel de confianza del 95 %.

Fuente: Deutsche Norm DIN 10767 (2015).

3.2.2.6. Especificidad

La especificidad es la capacidad del método de detectar y cuantificar el analito en presencia de impurezas o diferentes matrices (Magnusson y Örnemark, 2014). Para llevar a cabo la verificación de la especificidad se analizaron los cromatogramas del solvente (metanol: agua al 50 % v/v), del estándar disponible (5-CQA) y de la muestra de café tostado. Además, se realizaron 5 inyecciones de cada solución y se compararon entre sí (Faife y Corea, 2009).

3.2.2.7. Robustez

La robustez es la medida de la capacidad de un método analítico para enfrentar cambios en sus parámetros y seguir siendo fiable para su uso en la cuantificación de un analito (Duffau *et al.*, 2010). Esto se aplica a métodos que se hacen a lo interno del laboratorio, en el caso de métodos normalizados no es

necesario evaluar la robustez, pues ya se previó en la validación del método (Magnusson y Örnemark, 2014).

Cuando se inició esta práctica dirigida, en el año 2019, se trabajaba con el documento ECA-MC-PO01-G01-Guía para la validación de métodos del ECA. Sin embargo, este no mencionaba la evaluación de la robustez para la validación de un procedimiento normalizado no modificado (ECA, 2014).

Después de esto, el ECA actualizó sus documentos con respecto al cambio de versión de la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017 y publicó el documento Criterios para la evaluación y acreditación de laboratorios bajo la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017, con fecha de emisión 01/11/2019. Este documento sí menciona la evaluación de la robustez para validar un procedimiento normalizado no modificado (ECA, 2019).

Debido a los contratiempos que ocasionaron el deterioro temprano de la columna cromatográfica utilizada y la pandemia por COVID-19, no fue posible la evaluación del parámetro de robustez para el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado, de la norma alemana DIN 10767. Por lo tanto, este estudio, lo realizará el laboratorio químico después de esta práctica dirigida para cumplir con su objetivo de acreditación ante el ECA.

3.2.2.8. Falsos positivos o falsos negativos

La verificación de falsos positivos o falsos negativos corresponde a métodos cualitativos (Magnusson y Örnemark, 2014). El método para el análisis de CQA en HPLC que se utiliza en esta práctica dirigida se basa en la norma alemana DIN 10767:2015-08 Determinación del contenido de ácidos clorogénicos en café tostado y café soluble. El método de HPLC es cuantitativo, por lo que no corresponde a esta prueba.

3.3. Cuantificación del contenido de ácidos clorogénicos (CQA) por HPLC, en muestras de grano tostado de arábica (*Coffea*)

Toda la información se detalla en los siguientes apartados.

3.3.1. Origen y tipo de café tostado para la cuantificación con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado

La Unidad de Investigación de la Gerencia Técnica del Icafe se encarga del estudio y mejoramiento genético de las variedades de la especie *Coffea arábica* de Costa Rica. Por lo tanto, constantemente solicita análisis químicos para la caracterización del café que tienen en proyectos de investigación.

Este departamento facilitó al laboratorio químico 25 tipos de café en grano verde de la especie *Coffea arábica*, en cantidades de 100 g cada uno para cuantificación con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado de

esta práctica dirigida. Para esta sección a cada tipo de café se le llamará muestra. En el Cuadro 8 se observa la información de la localidad de las muestras y del tipo de altura del cultivo de café.

Cuadro 8

Muestras realizadas de café tostado molido analizadas por el método verificado para análisis de CQA en HPLC para café tostado

Código Muestra	Provincia	Cantón
M1	Guanacaste	Nandayure
M2	Cartago	Turrialba
M3	Guanacaste	Nandayure
M4	Cartago	Turrialba
M5	Cartago	Turrialba
M6	Alajuela	Grecia
M7	Alajuela	Grecia
M8	Alajuela	Grecia
M9	Alajuela	Grecia
M10	Cartago	Turrialba
M11	Alajuela	Grecia
M12	Alajuela	Alajuela
M13	Alajuela	Alajuela
M14	Puntarenas	Coto Brus
M15	Alajuela	Alajuela
M16	Alajuela	Alajuela
M17	Alajuela	Alajuela
M18	Alajuela	Grecia
M19	Alajuela	Grecia
M20	Alajuela	Grecia
M21	Alajuela	Alajuela

M22	Alajuela	Alajuela
M23	Alajuela	Alajuela
M24	Alajuela	Grecia
M25	Alajuela	Alajuela

3.3.2. Preparación previa de cada café para la cuantificación con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado

Para tostar los granos de café se utilizó un tostador de granos de café marca Probat, que tiene una capacidad de 130 g en 10 minutos para un tueste medio. Además, posee 2 tambores o cilindros de tostado y dos válvulas de temperatura (ver Anexo 4). El molino para moler granos de café tostado que se empleó es marca Bunn, modelo G3HDBLK, con capacidad máxima de 1 kg en 2 minutos y una capacidad mínima de 10 g (ver Anexo 4).

En estos equipos se llevó a cabo un tueste y una molienda medios, que son los niveles recomendados para conservar las propiedades organolépticas del café, según las recomendaciones del catador del Icafe (Icafe, 2014). El procedimiento de extracción para cada muestra de café tostado y molido se efectuó de la misma manera que en el punto 3.1.5 de este documento.

3.3.3. Cálculo de contenido de analito en las muestras de café de tostado de rutina con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado

El cálculo del contenido de CQA para cada duplicado independiente de cada tipo de café se llevó a cabo con el procedimiento descrito en el punto 3.1.7 de este documento.

3.3.4. Análisis de los resultados para las muestras de café recolectadas, con el método para análisis de CQA en HPLC para café tostado

Para los análisis estadísticos se tomaron los resultados de las concentraciones en g/kg obtenidas para cada ácido clorogénico individual de las 25 muestras de café tostado recabadas y se calculó el promedio, la desviación estándar, el valor mínimo y el valor máximo. Asimismo, se llevó a cabo un gráfico de distribución normal para cada ácido clorogénico.

3.3.5. Comparación de los resultados de las muestras de café tostado realizadas con los parámetros de desempeño que declara la norma alemana DIN 10767

Para verificar que las muestras cumplen con los parámetros de desempeño del método para análisis de CQA en HPLC para café tostado se prepararon duplicados individuales para cada muestra y así obtener la diferencia absoluta, la cual, se compara con el límite de repetibilidad que declara la norma alemana DIN

10767. Para esto, se graficaron las diferencias absolutas por cada ácido clorogénico y se comparó con el límite del Cuadro 2.

Capítulo IV. Ventajas y desventajas de la práctica dirigida

4.1. Ventajas

Durante la práctica dirigida se obtuvo la ventaja de asistir al laboratorio químico del Icafe los sábados y después de la jornada laboral para utilizar el equipo de HPLC, cuando normalmente se encuentra cerrado. Además, se tuvo acceso directo al director de la práctica dirigida para la evaluación y asesoramiento de todo el trabajo elaborado. También se tuvo disponibilidad de reactivos y materiales para los análisis químicos correspondientes, así como el tiempo y espacio para elaborar el trabajo escrito.

4.2. Desventajas

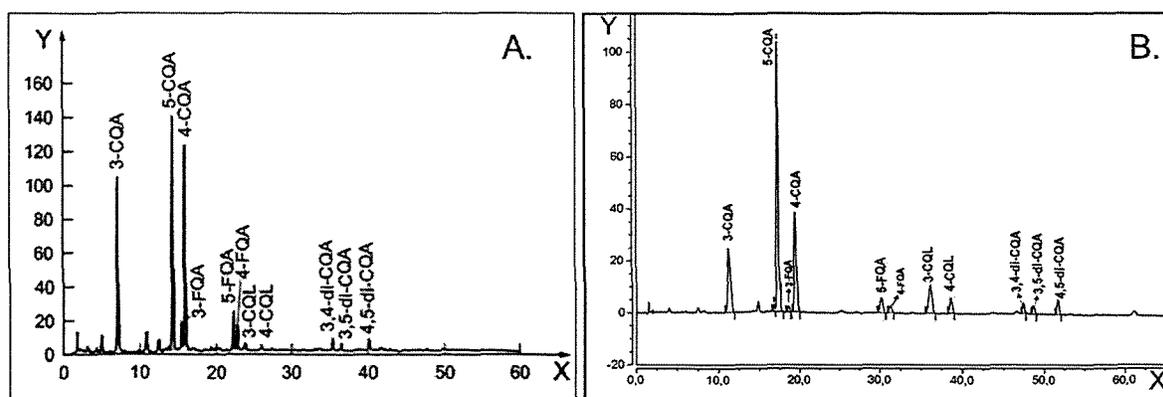
El laboratorio químico del Icafe cuenta con un solo equipo de HPLC, el cual se utiliza para diferentes análisis de calidad del café, entre ellos la determinación de azúcares individuales, ocratoxinas y cafeína en café verde y tostado. Estas determinaciones se hacen como servicio al cliente y son de rutina, por lo que son prioridad para el laboratorio. La verificación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC, requirió tiempo de extracción y análisis en el HPLC. Por este motivo, se trabajó los fines de semana para no intervenir con el tiempo de análisis de las otras determinaciones de rutina en el HPLC.

El laboratorio químico del Icafe estuvo en proceso de adquisición de consumibles del HPLC (como las guarda columnas y columnas cromatográficas), durante esta práctica dirigida. Sin embargo, no fue posible la compra, debido a que el método de adquisición de bienes y servicios cumple con un procedimiento de licitación por contar con fondos públicos, esto retrasa la obtención de materiales. Asimismo, la adquisición de más muestras de café frescas para llevar a cabo repeticiones de datos para el objetivo 3 de esta práctica no fue posible, por las afectaciones que causó la COVID -19 en las actividades del laboratorio químico del Icafe.

Capítulo V. Resultados y discusión

5.1. Resultados para comparar el orden de elución de los compuestos de ácidos clorogénicos reportados por la norma alemana DIN 10767

El resultado obtenido en la comparación del cromatograma de HPLC que presenta la Norma DIN 10767 y el cromatograma obtenido en la optimización de la metodología es satisfactorio para una muestra de café tostado. Esto porque el orden de elución de cada ácido clorogénico concuerda adecuadamente, ya que se utilizaron las condiciones cromatográficas propuestas por la norma. En la Figura 9 se observan los dos cromatogramas.



A. Cromatograma Norma Alemana DIN 17067

B. Cromatograma obtenido en la optimización del método.

Y. Absorbancia de longitud de ultravioleta.

X. Tiempo de lectura de análisis.

Figura 9

Comparación de cromatogramas del análisis de ácidos clorogénicos en HPLC

Fuente: A. Deutsche norm DIN 10767, 2015, B. Software Thermo Scientific Dionex Chromeleon 7, Versión 7.2 S. R 4.

Esta comparación de cromatogramas de HPLC evidencia que las condiciones cromatográficas que la norma DIN 10767 recomienda son reproducibles para la optimización del método normalizado, para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC.

5.2. Resultados para la optimización del método normalizado para análisis de ácidos clorogénicos (CGA) en café *coffea arabica*, mediante HPLC

Los resultados se presentan a continuación.

5.2.1. Prueba de idoneidad para el sistema cromatográfico de HPLC

Para la prueba de idoneidad del sistema, se obtuvo que la repetibilidad de las áreas de los picos cromatográficos estuvo menor al 2 % y el número de platos teóricos fue mayor al 2000. El factor de asimetría fue menor al criterio de *no mayor a 2* y la resolución es cero porque solo se valoró el estándar 5-CQA. Los datos se basaron en 10 inyecciones independientes del estándar 5-CQA. Estos límites se fundamentan en las especificaciones de la farmacopea americana para la evaluación de sistemas cromatográficos de HPLC (Sanabria *et al.*, 2017; Sierra y Gómez, 2014) (ver Cuadro 9).

Cuadro 9

Resultados de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico HPLC

Prueba de Idoneidad	Estándar 5-CQA	Criterio de Aceptación*
Repetibilidad de áreas	0,7	< 2%
Número de platos teóricos	69604	> 2000
Factor de Asimetría	1,17	< 1,5
Resolución	0	> 1,5

*Criterio de aceptación según la farmacopea americana (Formulario Nacional, USP 35 21. NF 30, The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2012, p. 285).

5.2.2. Prueba de idoneidad para el método de análisis de HPLC

En el Cuadro 10 se observan los datos obtenidos para la prueba de idoneidad del método de análisis del HPLC. Los datos se basaron en 10 extracciones independientes de un mismo café tostado, cada extracción se inyectó una vez en el mismo día. La repetibilidad de las absorbancias de cada ácido clorogénico estuvo menor al 2 % y el número de platos teóricos fue mayor al 2000. El factor de asimetría fue menor al criterio de *no mayor a 2* y la resolución fue mayor a 2 para todos los ácidos, excepto para el ácido 3-FQA y el 5-FQA fue de 2 igual al criterio de aceptación según las especificaciones de la farmacopea americana para la evaluación de sistemas cromatográficos de HPLC (Sanabria *et al.*, 2017; Sierra y Gómez, 2014).

Cuadro 10

Resultados de la prueba de idoneidad para la optimización del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de Coffea arabica, mediante HPLC

Ácido Clorogénico	Parámetro de Idoneidad			
	Repetibilidad de áreas *	Platos teóricos	Factor de Asimetría	Resolución
3-CQA	0,33	5876	1,3	12
5-CQA	0,78	30407	1,4	3
3-FQA	0,04	28933	1,2	2
4-CQA	0,37	26287	1,3	20
5-FQA	0,07	39284	1,2	2
4-FQA	0,04	48302	1,4	8
3-CQL	0,13	53959	1,2	4
4-CQL	0,10	80736	1,3	18
3,4-di-CQA	0,05	171697	1,5	3
3,5-di-CQA	0,05	175398	1,4	7
4,5-di-CQA	0,07	213514	1,3	0

Los parámetros de idoneidad cumplen con las especificaciones basados en Farmacopea de los Estados Unidos de América (Formulario Nacional, USP 35 21.NF 30, The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2012, p. 285), los cuales se describen a continuación:

*: Desviación de las áreas < 2 %

** : Platos teóricos > 2000

***: Factor de asimetría < 1,5

****: Resolución de picos < 1,5

Los resultados del Cuadro 8 y el Cuadro 9 para la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico y del método de análisis, muestran que son idóneos para llevar a cabo la verificación del método normalizado para análisis individual de

ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC.

Estos datos cumplen con los criterios establecidos en la Farmacopea América USP, que se utilizan para la validación y verificación de métodos cromatográficos de HPLC. Esto garantizó que se obtuvo una línea base estable y cromatogramas con picos en el tiempo de retención, altura, ancho y simetría esperado. Lo anterior es ideal para la aplicación del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC, en el laboratorio químico del Icafe (Faife y Corea, 2009).

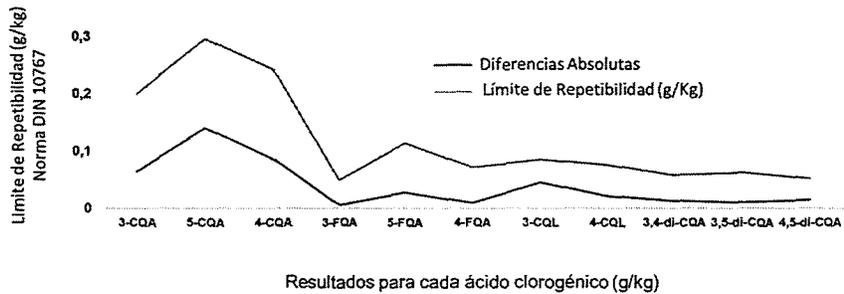
5.3. Resultados de la verificación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC según criterios del ECA-MC-C18 con la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017

Los resultados se presentan a continuación.

5.3.1. Resultados para la verificación de los parámetros de desempeño de la norma alemana DIN 10767

Los resultados para la verificación de la repetibilidad estuvieron por debajo de los parámetros de desempeño de la norma alemana DIN 10767 para todos los ácidos clorogénicos. Para esto se realizaron 6 muestras de café tostado por

duplicados extraídos independientes y se calculó la diferencia absoluta entre las réplicas de cada muestra (ver Figura 10).



■: Criterios de aceptación para la repetibilidad según la Norma Alemana DIN 10767 para cada ácido clorogénico

■: Diferencia absoluta entre los duplicados independientes para cada ácido clorogénico.

Figura 10

Comparación del límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 10767 y las diferencias absolutas de muestras de café tostado

De acuerdo con lo anterior, se cumple con el parámetro de desempeño para la repetibilidad que propone la norma alemana 10767. Este debe cumplir con que la diferencia absoluta entre duplicados independientes efectuadas a cada muestra de café tostado no debe superar el valor del límite de reproducibilidad en un 5 % del total de muestras analizadas.

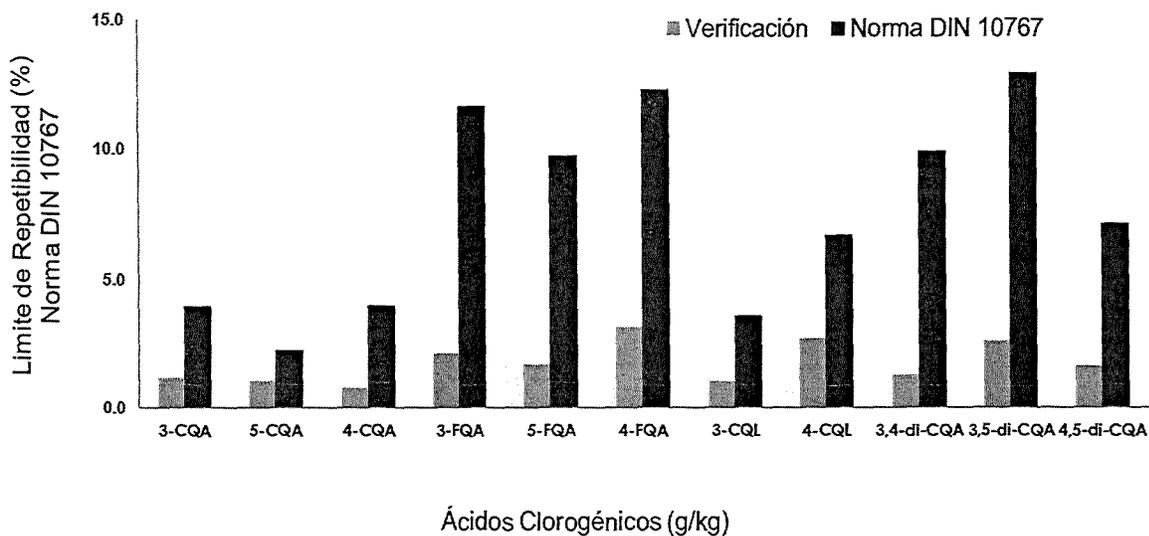
La implementación de este método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC según criterios del ECA-MC-C18 con la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017 en el laboratorio químico del Icafe, es importante para el sistema de acreditación. Esto

porque ayudará ampliar el alcance de la acreditación y ofrecerá más prestigio al laboratorio.

5.3.2. Verificación de precisión en términos de repetibilidad

En cuanto a los resultados de la verificación de la repetibilidad, el ácido 5-CQA y siete del resto de los ácidos clorogénicos cumplen con el criterio de aceptación, el cual debe ser menor al 2 % de variación. Sin embargo, los tres ácidos restantes 3-FQA, 4-FQA, 4-CQL y 3,5-di-CQA no cumplen con el criterio de aceptación menor al 2 % de variación.

Los datos mostrados se basaron en 10 extracciones independientes de un mismo café tostado, cada extracción se inyectó una vez en el mismo día. A partir de esto, se grafican los datos de la repetibilidad calculada a partir del coeficiente de variación para cada ácido clorogénico y se compara con el Límite Relativo de Repetibilidad r_{rel} , (%) del Cuadro 5. El Anexo 7 muestra las mediciones individuales realizadas para cada réplica y los valores de los promedios de las réplicas. En la Figura 11 se representan los datos en un gráfico.



■: Datos obtenidos de repetibilidad para el cálculo del límite de repetibilidad de cada ácido clorogénico.

■: Datos del Límite Relativo de Repetibilidad rrel, (%) reportados por la Norma DIN 10767.

Figura 11

Repetibilidad del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (*Coffea*), mediante HPLC

La verificación de la repetibilidad indica que el sistema cromatográfico es capaz de producir resultados precisos para los valores de ácidos 3-CQA, 5-CQA, 4-CQA, 3-FQA, 5-FQA, 4-FQA, 4-CQL, 3-CQL, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA. Además, que los datos de repetibilidad obtenidos para cada ácido clorogénico (calculados como ácido 5-CQA), son menores que el límite relativo de repetibilidad reportado por la Norma DIN 10767, según el Cuadro 4 (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).

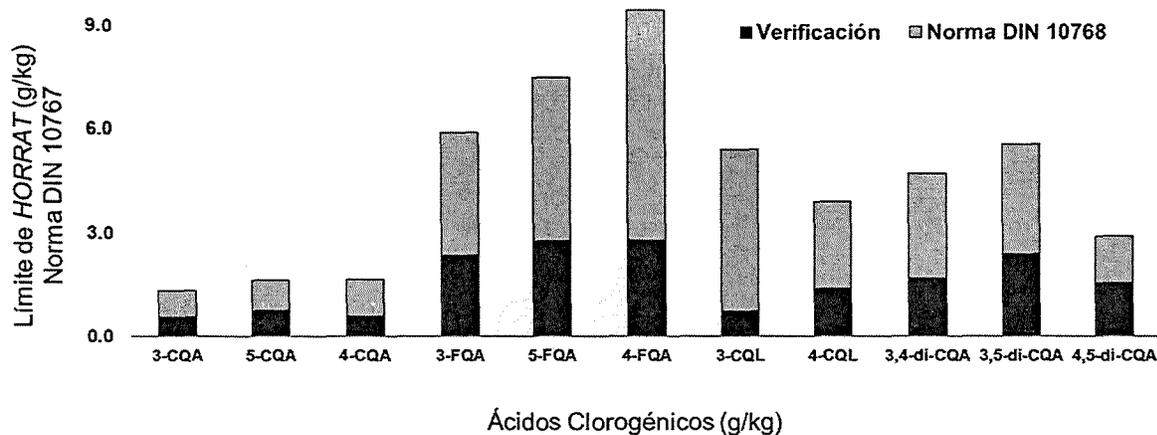
Por lo tanto, la precisión del laboratorio es aceptable en condiciones de repetibilidad, utilizando el mismo método, operador y equipo de análisis para una

misma muestra de café tostado analizada independientemente varias veces (Duffau *et al.*, 2010).

5.3.3. Verificación de la precisión en términos de precisión intermedia

En cuanto a los resultados de la verificación de la precisión intermedia, el ácido 5-CQA y el resto de los ácidos clorogénicos cumplen con el criterio de aceptación para Horrat, reportado por la Norma DIN 10767. En la Figura 12 se observan los resultados para la precisión intermedia. Los datos se basaron en 10 extracciones independientes de un mismo café tostado, durante tres días diferentes, cada extracción se inyectó una vez en el mismo día.

Asimismo, se calculó y graficó el P Horrat para cada ácido clorogénico, el cual se obtuvo según el procedimiento descrito en el punto 3.2.2.2 y se comparó con el Horrat de la Norma DIN 10767. En el Anexo 8 se muestran las mediciones individuales realizadas para cada réplica.



■: Datos obtenidos de repetibilidad para el cálculo del límite de repetibilidad de cada ácido clorogénico.

▒: Datos Horrat reportados por la Norma DIN 10767.

Figura 12

Resultados de precisión intermedia del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (*Coffea*), mediante HPLC

La verificación de la precisión intermedia indica que el sistema cromatográfico es capaz de producir resultados precisos para los valores de ácidos 3-CQA, 5-CQA, 4-CQA, 3-FQA, 5-FQA, 4-FQA, 4-CQL, 3-CQL, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA. Esto destaca que el método para determinación de ácidos clorogénicos es reproducible en intervalos largos de tiempo.

5.3.4. Resultados de la verificación de la veracidad (sesgo) y la recuperación

En el Cuadro 11 se observan los resultados de la verificación de la veracidad (sesgo). Esta se llevó a cabo con 10 muestras de café tostado fortificadas con una concentración de referencia de estándar de ácido 5-CQA.

Cuadro 11

Resultados de la prueba t-student de evaluación del sesgo para el ácido 5-CQA del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de Coffea arabica, mediante HPLC

Número de réplica u observación (n)	Resultado de la observación (mg/L)
1	38.61
2	38.28
3	39.29
4	42.87
5	40.25
6	36.86
7	36.57
8	36.32
9	41.24
10	35.65
Valor de esperado o referencia:	38.90 mg/L
Nivel de confianza (%) para llevar a cabo la prueba:	95
Resultados estadísticos	
Promedio:	38.59 mg/L
Desviación estándar:	2.35 mg/L
Número de observaciones:	10

Tcalculado	0.41
Valor de $t_{critico}$ a una cola	1.83
Valor de $t_{critico}$ a dos colas	2.26

Tcrítico: Valor obtenido de la tabla de distribución de t-student, se determina para grados de libertad de $v = n-1$, 1 y 2 colas y con un nivel de 95 % de confianza (ver Anexo 4).

La prueba de *t*-student para el análisis de una cola determinó que el promedio de las 10 muestras de café tostado analizadas no es significativamente más pequeño que el valor esperado o de referencia, ($t_{cal} 0.41 < t_{crit} 1.83$). Para el análisis de dos colas se concluye que no existe diferencia significativa entre el promedio y el valor esperado o de referencia ($t_{cal} 0.41 < t_{crit} 2.26$). El sesgo obtenido para la determinación del ácido 5-CQA es aceptable, por lo tanto, la veracidad es aceptable.

Para los resultados de la verificación de la recuperación del ácido 5-CQA se obtuvo un valor mínimo de 90.1 % y un máximo de 107.2 %, con un promedio de 97,7 y una desviación estándar de 4,7. En la Figura 13 se aprecian los resultados de recuperación y en el Cuadro 10 se observan los datos obtenidos para la prueba basada en la tabla de recuperación de la AOAC y la prueba *t*-student. Los datos se basaron en 10 cafés tostados que se extrajeron con y sin adición de estándar.



■ Representa el 100 % de recuperación.

Porcentajes de recuperación obtenidos.

Figura 13

Veracidad y recuperación del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC

En el Cuadro 12 se observan los datos obtenidos para la verificación de los criterios de aceptación de la veracidad y la recuperación. Se realizaron 10 recuperaciones y se obtuvo el promedio para comparar con la tabla recuperación AOAC y también se calculó la desviación estándar de las desviaciones para obtener el t_{cal} para la prueba *t*-student.

Cuadro 12

Valores obtenidos para las pruebas de verificación del parámetro de recuperación para el ácido 5-CQA del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC

Valor Numérico Obtenido	Criterio de Aceptación	Prueba Realizada
97.70 %	90 %-107 %	Tabla Recuperación AOAC

$$t_{\text{cal}} 1,542 < t_{\text{crit}} 2,262 *$$

$$t_{\text{cal}} < t_{\text{crit}}$$

prueba *t*-student

*Valor obtenido de la tabla de distribución de *t*-student, se determina para grados de libertad de $v = n-1$, 2 colas y con un nivel de 95 % de confianza (ver Anexo 4).

Fuente: Elaboración propia con base en información de Duffau *et al.* (2010).

El estudio de la recuperación para el ácido 5-CQA en el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (*Coffea*), mediante HPLC, ayudó a determinar el grado de coincidencia del valor obtenido con el valor real aceptado. Esto permitió observar el rendimiento del método analítico en cuanto a la extracción y la cantidad de ácido 5-CQA existente en la muestra de café tostado para un promedio de 97.70 %. Lo anterior cumple los criterios de aceptación propuestos según la literatura para la validación de métodos analíticos (Duffau *et al.*, 2010).

5.3.5. Verificación de la linealidad, el límite de detección y el límite de cuantificación

En los resultados de la verificación de la linealidad para el ácido 5-CQA, el coeficiente de correlación fue de 0,9999, los límites de detección y cuantificación fueron respectivamente 1,38 mg/L y 4,61 mg/L, los datos se muestran en el Cuadro 13. Los valores obtenidos son el promedio de 10 curvas de calibración del estándar 5-CQA. En la Figura 14 se muestra la curva de calibración que se obtuvo en esta verificación.

Cuadro 13

Resultados de los parámetros que definen la linealidad del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (*Coffea*), mediante HPLC

Parámetro	Símbolo	Promedio (mg/L)
Límite de Detección	LD	1,38
Límite de Cuantificación	LC	4,61
Coefficiente de Correlación	r ²	0,999
Pendiente	m	0,493
Intercepto	b	0,179

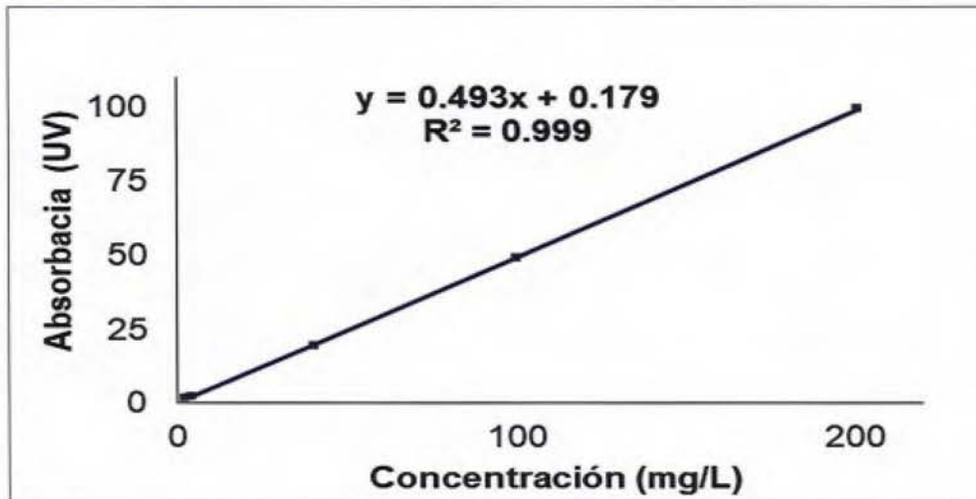


Figura 14

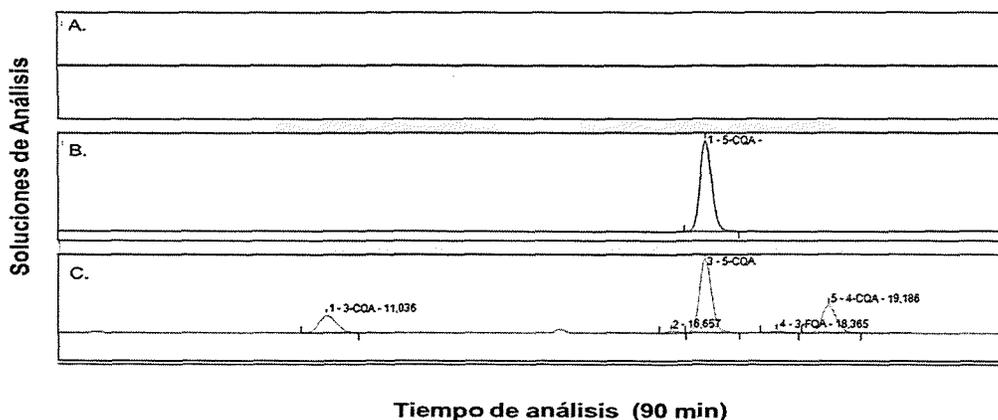
Representación gráfica de la curva de calibración para el estándar 5-CQA, se basó en el promedio de 10 curvas de calibración

La prueba de linealidad garantiza que el método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC, está en capacidad de dar resultados instrumentales proporcionales a la cantidad de cada uno de los ácidos clorogénicos en el café. Por lo tanto, no se necesita ningún ajuste.

La determinación del límite de cuantificación y detección para el Laboratorio Químico del Icafe es indispensable para indicar al cliente hasta dónde se puede detectar y cuantificar el ácido 5-CQA. En este caso la detección es de 1,38 mg/L y la cuantificación es de 4,61 mg/L, fuera de estos límites el laboratorio puede reportar un resultado como no detectable o no cuantificable.

5.3.6. Resultados de la verificación de la especificidad

Las pruebas realizadas para evaluar la especificidad del sistema demuestran que el método es capaz de detectar y cuantificar el ácido 5-CQA sin ninguna interferencia (Örnemark y Magnusson, 2014). Además, se compararon de los cromatogramas del solvente, estándar y muestras del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *coffea arabica* mediante HPLC para el ácido 5-CQA (ver Figura 15).



- A. Cromatograma con solo el solvente del método, agua y metanol en una proporción 50:50.
- B. Cromatograma utilizando el estándar ácido 5-CQA.

C. Cromatograma inyectando una muestra de café tostado.

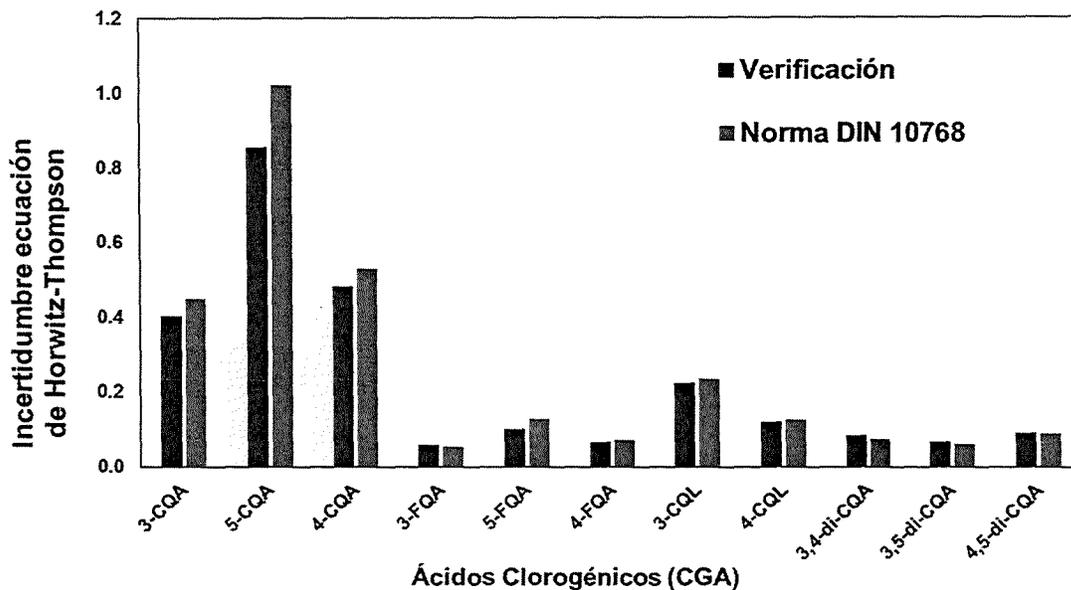
Figura 15

Prueba de verificación de la especificidad del método

La prueba de especificidad mostró que el sistema cromatográfico tiene la capacidad de ser selectivo en el análisis del analito sin presencia de interferencias que afecte el resultado, esto se observa en la Figura 12. Por lo tanto, para el método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC, no existen interferencias significativas que afecten en la matriz que se utiliza (Faife y Corea, 2009).

5.3.7. Resultados de la verificación de la incertidumbre

Los resultados de la verificación de la incertidumbre expandida según la ecuación de Horwitz-Thompson fueron satisfactorios, esto porque se encuentran entre los datos de incertidumbre reportada por la norma alemana DIN 10767. Los datos se representan en la Figura 16.



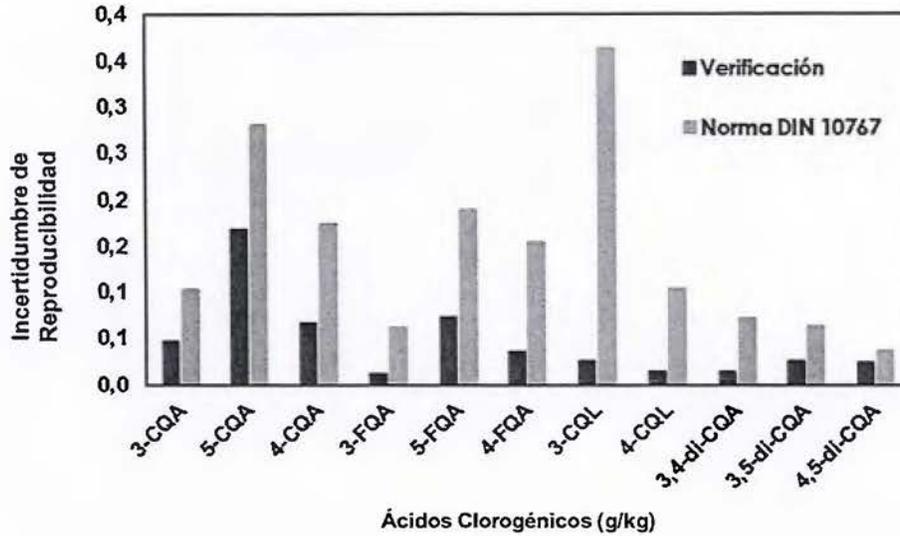
Verificación realizada para la incertidumbre a partir de la ecuación de Horwitz, para el desarrollo del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (*Coffea*) mediante HPLC.

■ Incertidumbres a partir de la ecuación de Horwitz reportadas por la norma alemana DIN 10767.

Figura 16

Comparación de los resultados de incertidumbre según la ecuación de Horwitz-Thompson obtenidos y los resultados de incertidumbre reportados por la norma alemana DIN 10767

En cuanto a los resultados de la verificación de la incertidumbre expandida, según la desviación estándar de reproducibilidad también fueron satisfactorios, esto porque se encuentran entre los datos de incertidumbre reportados por la Norma Alemana DIN 10767. Los datos se representan en la Figura 17.



■ : Verificación de la incertidumbre a partir de la desviación estándar de reproducibilidad realizada para el desarrollo del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de arábica (*Coffea*) mediante HPLC.

■ : Incertidumbres a partir de la desviación estándar de reproducibilidad reportadas por la norma alemana DIN 10767

Figura 17

Comparación de los resultados de incertidumbre obtenidos según la desviación estándar de reproducibilidad y los resultados de incertidumbre reportados por la norma alemana DIN 10767

Asimismo, se llevó a cabo una verificación de la incertidumbre del método normalizado para el análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC (ISO 17025). Este método es parte normalizado (norma alemana 10767), por lo que el cálculo de la incertidumbre ya está previsto (Örnemark y Magnusson, 2014).

La norma alemana 10767 especifica dos cálculos diferentes de la incertidumbre, los cuales se detallaron en la Figura 16 y la Figura 17. Los valores

de incertidumbre obtenidos para esta práctica dirigida son aceptables, porque están por debajo de los valores reportados por la norma.

5.4. Resultados para la cuantificación de muestras recabadas con el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *coffea arabica*, mediante HPLC

Los resultados se muestran a continuación.

5.4.1. Cuantificación de muestras café en grano tostado

Los valores obtenidos para la cuantificación de ácidos clorogénicos en 25 muestras de café en grano tostado estuvieron entre 8,15 y 13,75 g/kg del ácido 5-CQA, con un promedio de 11,31 g/kg de 5QA y con el valor más alto de desviación estándar (1,51), en comparación con los otros clorogénicos. Los datos obtenidos para el valor mínimo o máximo se calcularon para observar el rango de concentraciones para cada ácido clorogénico. En el Cuadro 14 se detallan los resultados para los otros ácidos y en el Anexo 11 se observan todos los valores obtenidos de la cuantificación de cada ácido.

Cuadro 14

Cálculo de la media, desviación estándar, el valor mínimo y máximo para cada ácido clorogénico cuantificados en 25 muestras de rutina de café tostado molido

Ácido Clorogénico	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
5-CQA	11,31	1,51	8,15	13,75
4-CQA	5,26	0,74	3,82	6,50

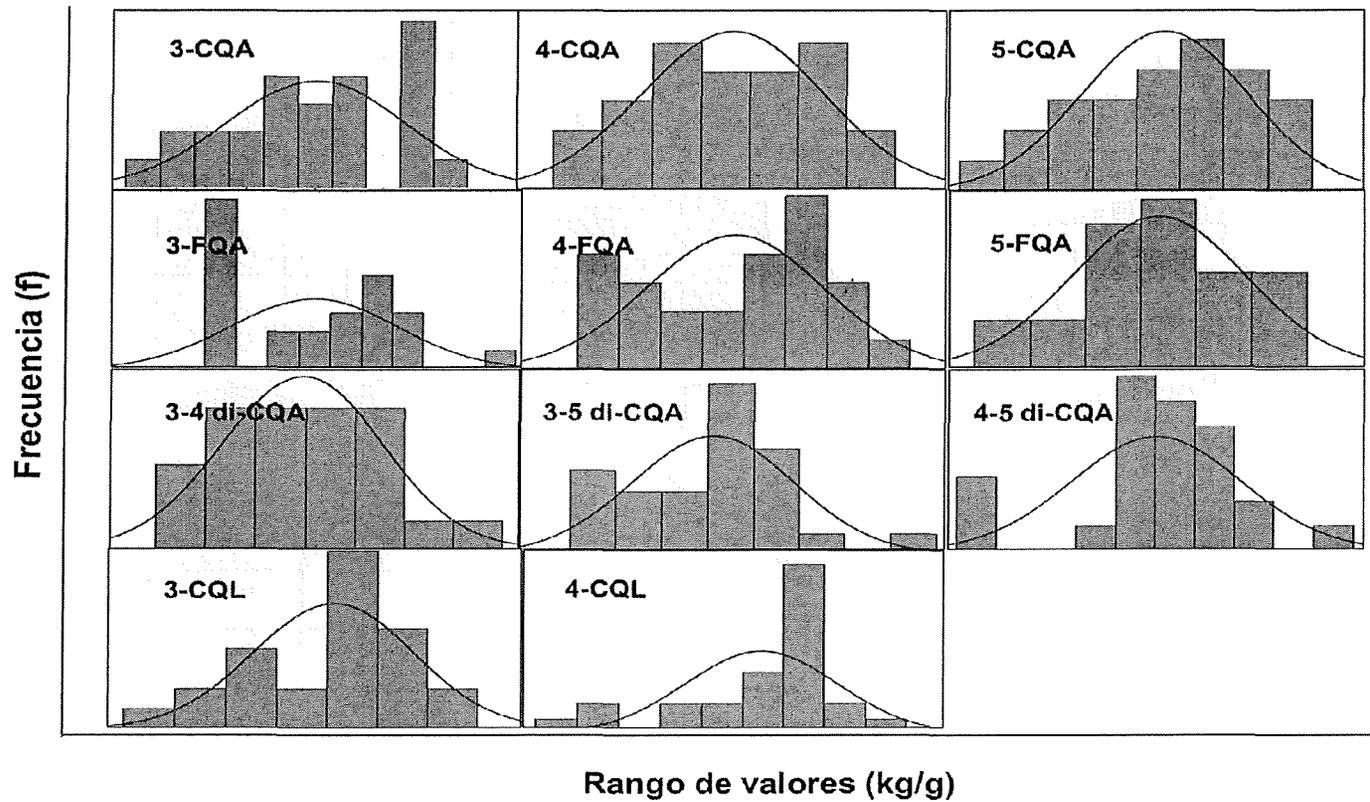
3-CQA	4,01	0,65	2,79	5,05
3-FQA	0,15	0,13	0,00	0,44
5-FQA	0,77	0,32	0,13	1,24
4-FQA	0,26	0,17	0,00	0,56
3-CQL	2,13	0,32	1,30	2,52
4-CQL	0,74	0,28	0,03	1,18
3,4-di-CQA	0,24	0,16	0,00	0,63
3,5-di-CQA	0,21	0,14	0,00	0,59
4,5-di-CQA	0,45	0,22	0,00	0,90

5.4.2. Análisis estadístico de la cuantificación de muestras de café en grano tostado

En la Figura 18 se muestran los resultados en el estudio de distribución normal realizado para cada ácido clorogénico. En el análisis de las 25 muestras recabadas de café tostado *Coffea arábica*, el ácido con mayor concentración es el ácido 5-CQA, el cual representa el 44 % aproximadamente de la suma de todos los ácidos y es el compuesto más representativo en el grano de café.

A continuación, los ácidos 4-CQA y 3-CQA presentan el 21 % y 16 % aproximadamente, de manera respectiva, ya que son isómeros del ácido 5-CQA que se forman durante este proceso. El ácido 3-CQL representa el 8 % de la concentración del total de ácidos clorogénicos, esto sucede por el proceso de tueste del café, lo que provoca que los CGA se hidrolicen y se transformen en quinolactonas de ácidos clorogénicos (Marín y Puerta, 2008).

El resto de los ácidos clorogénicos 3-FQA, 5-FQA, 4-FQA, 4-CQL, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA presentan concentraciones por debajo del 1 g/kg y rangos de valores más pequeños en comparación con 5-CQA, 4-CQA, 3-CQA y 3 -CQL. Este comportamiento también se observa en los datos reportados por la norma alemana DIN 10767 (Deutsche Norm DIN 10767, 2015).



█ Frecuencia de valores según el rango para cada ácido clorogénico

█ Distribución normal de cada ácido clorogénico.

Figura 18

Distribución para cada ácido clorogénico cuantificados en 25 muestras recabadas de café tostado molido

5.4.3. Diferencias absolutas de los duplicados de cada muestra de café en grano tostado para cada ácido individual comparado con el límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 10767

Las diferencias absolutas de los duplicados de las muestras de café en grano tostado en la cuantificación de ácidos clorogénicos no cumplen en algunos casos con el límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 10767 (ver Figura 19). Según la norma se debe cumplir con que la diferencia absoluta entre duplicados independientes efectuadas a cada muestra de café tostado no debe superar el valor del límite de reproducibilidad en un 5 % del total de muestras analizadas. Sin embargo, más del 5 % de las 25 muestras analizadas no cumplen con este parámetro de desempeño.

Por lo tanto, se considera muy estricto este criterio de la norma alemana DIN 10767 y el laboratorio químico del Icafe se basará en el estudio que se llevó a cabo en el punto 5.3.2 de la verificación de precisión en términos de repetibilidad. Al finalizar las 25 muestras de café tostado se deseaba analizar más muestras, pero la columna cromatográfica comenzó a presentar ineficacia y síntomas de que estaba sucia. En el momento de llevar a cabo la práctica dirigida el laboratorio químico del Icafe no contaba con un guarda columna.

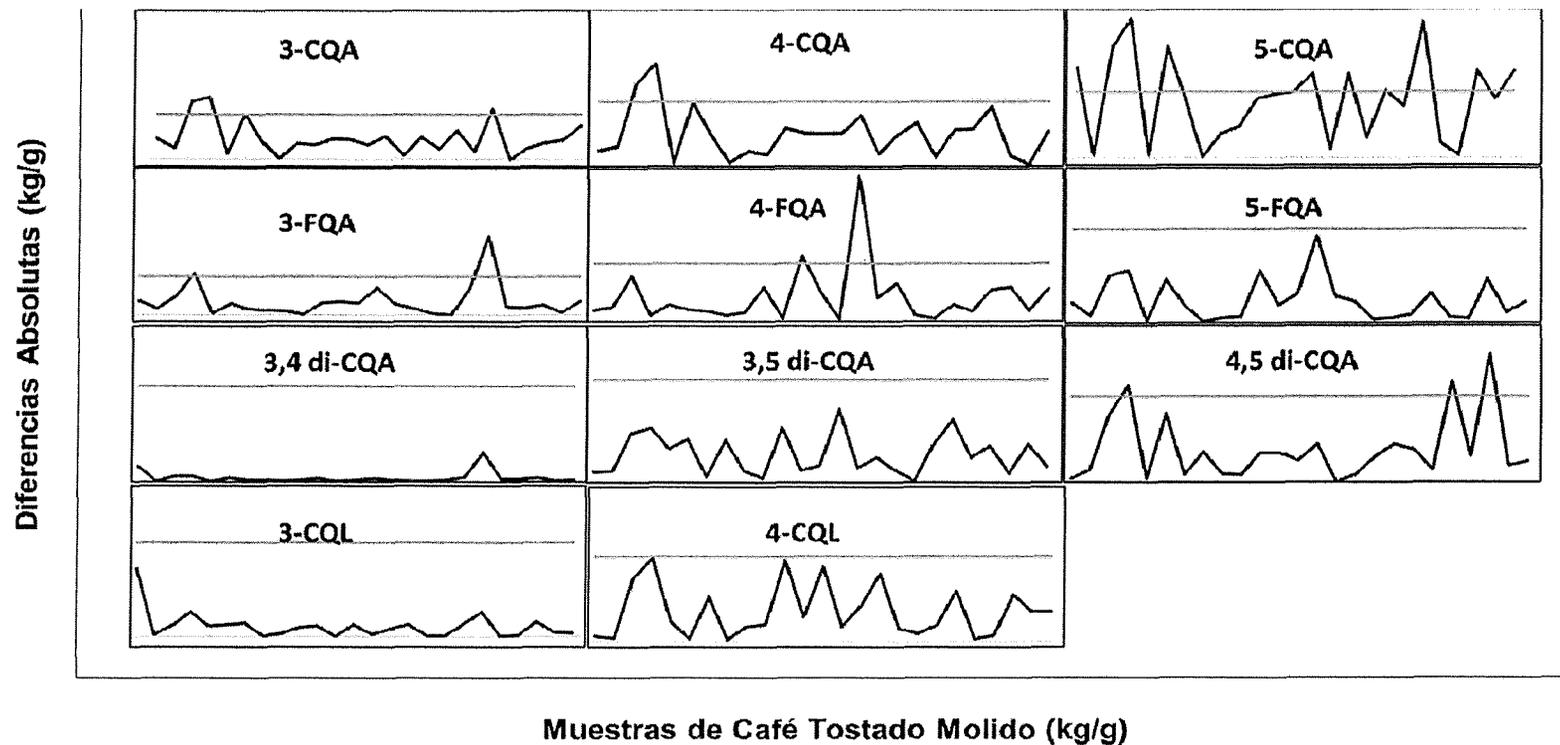
Un guarda sirve para proteger la columna cromatográfica de componentes de las muestras que pueden ser retenidos por la fase estacionaria de la columna

cromatográfica como los compuestos hidrofóbicos. Esto afecta el rendimiento y eficiencia de la columna (Thermo Scientific, 2010).

Los componentes del café, como las grasas, proteínas, etc., pueden afectar la eficiencia de la columna, si no se lleva a cabo un manejo adecuado de la muestra antes de inyectarse al HPLC (Carral, 2011). Se utilizaron filtros de membrana de 45 μm , sin embargo, estos se saturan bastante rápido. Como se mencionó, se siguió el procedimiento de la norma alemana DIN 10767, el cual no provee ningún tratamiento previo de limpieza de la muestra (Deutsche Norm DIN 10767).

Como se explicó en el apartado 4.2 de este documento, no fue posible adquirir una nueva columna cromatográfica durante la elaboración de esta práctica dirigida. Tampoco se efectuó una limpieza inmediata debido a la falta de reactivo de metanol grado HPLC. Cuando se logró obtener el reactivo de metanol, se llevó a cabo el proceso de limpieza, la columna se instaló en sentido inverso y se lavó con metanol a un flujo de 0,2 ml durante toda la noche (Phenomenex, 2010).

Sin embargo, no se analizaron nuevamente las muestras de café tostado pendientes, ya que se envejecieron durante el tiempo que la columna cromatográfica estuvo fuera de funcionamiento y no fue posible para el laboratorio químico adquirir más muestras frescas. Por esto, se procedió a trabajar con solo el grupo de 25 muestras.



■ Diferencias absolutas para el duplicado cada una de las muestras de café tostado.

---: Límite de repetibilidad para cada ácido clorogénico.

Figura 19

Comparación del límite de repetibilidad de la norma alemana DIN 1076 para cada ácido clorogénico y las diferencias absolutas de muestras de café tostado

Capítulo VI. Conclusiones

Al finalizar la investigación se obtuvieron resultados satisfactorios que permitieron optimizar el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*. Esto mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, de manera que las condiciones de este se aplicaron como lo recomienda la norma alemana DIN 10767.

La optimización del método no lanzó ningún cambio significativo en la aplicación del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*. Asimismo, se llevó a cabo la verificación del método normalizado para el ácido 5-CQA y se comprobó que cumple con los criterios de veracidad (sesgo), precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación, sensibilidad (pendiente), especificidad, recuperación y estimación de la incertidumbre, descritos en el ECA-MC-C18, en la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017. El criterio de robustez queda pendiente para su análisis posterior fuera de esta práctica dirigida.

Por otra parte, se llevó a cabo la verificación de los parámetros de precisión (repetibilidad y presión intermedia) e incertidumbre para los ácidos 3-CQA, 4-CQA, 3-FQA, 5-FQA, 4-FQA, 4-CQL, 3-CQL, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA, calculados como ácido 5 CQA. Estos se describen en el ECA-MC-C18, en la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017.

Además, se cuantificó el contenido de ácidos clorogénicos de muestras de café en grano tostado, recibidas en el laboratorio químico del Icafe del periodo 2019-2020, con el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café en grano tostado de *Coffea arabica*. La determinación de cada ácido se calculó por medio de los coeficientes de extinción de cada compuesto con respecto al Ácido 5-CQA.

Por último, se concluye que los resultados en la cuantificación de ácidos clorogénicos presentan mayor concentración para los ácidos 5-CQA, 4-CQA y 3-CQA. El ácido 5-CQA es el principal en concentración en los granos de café, el tueste del café provoca que aumente la concentración de los isómeros 4-CQA y 3-CQA, también provoca la formación de los compuestos 3-CQL y 4-CQL, los cuales presentaron concentraciones considerables.

Capítulo VII. Recomendaciones

Se recomienda adquirir los estándares de los ácidos clorogénicos que no se verificaron en este estudio y llevar a cabo la verificación del análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*. Esto mediante HPLC para la matriz en el grano de café en verde para esos compuestos.

Se aconseja llevar a cabo la verificación del método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*. Esto mediante HPLC para la matriz en el grano de café en verde, ya que es otra necesidad que tiene el laboratorio químico del Icafe.

Se recomienda efectuar una cuantificación de las concentraciones de los ácidos clorogénicos individuales en café verde y de café tostado para comparar las diferencias de los resultados debidas al tueste en el grano de café.

Se aconseja adquirir una precolumna o guarda columna para el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*, mediante HPLC, ya que los otros componentes del café obstruyen la columna con el paso del tiempo. Por lo tanto, es preferible considerar algún procedimiento de limpieza de la muestra o dilución antes de inyectarla al HPLC y validar nuevamente el método.

Se recomienda utilizar el método normalizado para análisis individual de ácidos clorogénicos (CGA) en café de grano tostado de *Coffea arabica*. Esto mediante HPLC para el estudio de variedades y orígenes de café.

Referencias bibliográficas

- Aguirre, L., García, J., García, T., Illera, M., Lizondo, M. y Lluch, A. M. (2001). *Validación de métodos analíticos*. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. <https://es.scribd.com/doc/79379169/Validacion-de-Metodos-Analiticos-Asociacion-Espanola-de-Farmaceuticos-de-la-Industria>
- AOAC Internacional. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. George, W. Latimer (ed.). Rockville, Maryland: AOAC Internacional. 350(1957).
- Bekedam, E. K. (2008). *Coffee brew melanoidins*. Structural and Functional Properties of Brown-Colored Coffee Compounds, 2–15. <http://library.wur.nl/WebQuery/wda/1883928>
- Bisht, S. y S. S., S. (2010). Coffea arabica: A wonder gift to medical science. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 1(1), 58. <https://doi.org/10.4103/2229-5119.73595>
- Boqué, R. (2009). *El límite de detección de un método analítico*. <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/lod.pdf>
- Carral, E. M. (2011). *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales* (Vol. 1).

Comisión del Codex Alimentarius. (2009). *Directrices sobre el establecimiento de criterios sobre los métodos para la identificación de métodos analíticos relevantes*.

Cropley, V., Croft, R., Silber, B., Neale, C., Scholey, A., Stough, C. y Schmitt, J. (2012). Does coffee enriched with chlorogenic acids improve mood and cognition after acute administration in healthy elderly? A pilot study. *Psychopharmacology*, 219(3), 737–749.
<https://doi.org/10.1007/s00213-011-2395-0>

Crubellti, R. O. y Di Riso, C. D. (2009). *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbres en medidas químicas*.

Dawidowicz, A. L. y Typek, R. (2017). Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process. *European Food Research and Technology*, 243(3), 379–390. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2751-8>

Deutsche Norm DIN 10767. (2015).

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M. y Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos*.

ECA. (2014). *Guía para la validación de métodos*.

ECA. (2019). *Criterios para evaluación y acreditación de laboratorios bajo la norma INTE-ISO/IEC 17025:2017*. 1–17.

Erk, T., Hauser, J., Williamson, G., Renouf, M., Steiling, H., Dionisi, F. y Richling, E. (2014). Structure-and dose-absorption relationships of coffee polyphenols. *BioFactors*, 40(1), 103–112. <https://doi.org/10.1002/biof.1101>

Escarramán, A., Romero, J. M., Almonte, I., Ribeyre, F., Aguilar, P., Jiménez, H., Causse, A., Olivares, F. y Batista, I. (2007). *Determinación de los Atributos de Calidad del Café en Zonas Productoras de la República Dominicana* (p. 98).

Faife, A. y Corea, K. (2009). *Validación del Método analítico por cromatografía líquida de alta presión para la cuantificación de mupirocina 2 % ungüento en Laboratorio Ceguel en el periodo comprendido de mayo a noviembre*.

Farah, A. y Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23–36. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>.

Farah, A. y Duarte, G. (2014). *Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids from Coffee*. In *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00087-5>

Faraldos, M. y Goberna, C. (2009). *Técnicas de análisis y caracterización de*

materiales. <http://ebookcentral.proquest.com>

García, D. M. B. A. y Yusá. (2016). *1. introducción a la técnica de HPLC* (Issue 2016, pp. 5–11).

Gloess, A. N., Schönbacher, B., Klopprogge, B., D'Ambrosio, L., Chatelain, K., Bongartz, A., Strittmatter, A., Rast, M. y Yeretizian, C. (2013). *Comparison of nine common coffee extraction methods: Instrumental and sensory analysis. European Food Research and Technology*, 236(4), 607–627.
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-1917-x>

Gotteland, M. y de Pablo, V., S. (2007). *Algunas Verdades Sobre El Café Some Trues Concerning the Coffee*. 34.

Gouthamchandra, K., Sudeep, H. V., Venkatesh, B. J. y Shyam Prasad, K. (2017). Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 147–153.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.001>

Gras, L., Maestre, S. E. y Mora, J. (2005). *Introducción a la experimentación en química analítica*. Publicaciones de La Universidad de Alicante.

Grujić, N., Rakić, B., Šefer, E., Rakić, D., Nedeljković, I., Kladar, N. y Božin, B. (2015). Determination of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) as one of the major

classes of chlorogenic acid in commercial tea and coffee samples.

Vojnosanitetski Pregled, 72(11), 1018–1023.

<https://doi.org/10.2298/VSP130915096G>

Icafe. (1993). *Evolución de la caficultura costarricense situación actual*.

Icafe. (2014). *Protocolo Análisis-Físico-Sensorial del Café*.

Icafe. (2015). Icafe-MC-01v1 Manual Calidad Laboratorio Químico.

Icafe. (2015). *Sitio Oficial-Icafe*. Historia Del Café de Costa Rica.

Jeszka, M., Stanisz, E. y De Peña, M. P. (2016). Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee.

LWT - Food Science and Technology, 73, 243–250.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.018>

Jeszka, M., Zgoła, A. y Grześkowiak, T. (2014). Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee.

European Food Research and Technology, 240(1), 19–31.

<https://doi.org/10.1007/s00217-014-2356-z>

Jiménez, M. (2010). *Análisis comparativo de la certificación CAFE Practices de Starbucks en Coopetarrazú RL*. (Instituto Tecnológico de Costa Rica).

<http://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/3967>

- Leroy, T., Ribeyre, F., Bertrand, B., Charmetant, P., Dufour, M., Marraccini, P. y Pot, D. (2006). *Genetics of coffee quality*. 18(1), 229–242.
- Ludwig, I. A., Paz de Peña, M., Concepción, C. y Alan, C. (2013). Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota. *BioFactors*, 39(6), 623–632. <https://doi.org/10.1002/biof.1124>
- Marín, C. y Puerta, G. I. (2008). Contenido de Ácidos Clorogénicos en Granos de *Coffea Arabica* y *C. Canephora*, según el desarrollo del fruto. *Cenicafé*, 59(1), 7–28.
- Mills, C. E., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R. y Spencer, J. P. E. (2013). The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141(4), 3335–3340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.014>
- Moldoveanu, S. C. y David, V. (2013). *HPLC Analysis*. In *Essentials in Modern HPLC Separations*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385013-3.00009-4>
- Moreira, I., Scheel, G. L., Hatumura, P. H. y Scarminio, I. S. (2014). *Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em Coffea arabica*. 37(1), 39–43.
- Naegele, E. (2016). *Determination of Chlorogenic Acid in Coffee Products According to DIN 10767*. Agilent Technologies.

- Narita, Y. e Inouye, K. (2014). *Chlorogenic Acids from Coffee*. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 189–199). *Elsevier Inc.*
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00021-8>
- Nuhu, A. A. (2014). *Bioactive Micronutrients in Coffee: Recent Analytical Approaches for Characterization and Quantification*. *ISRN Nutrition*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/384230>
- Örnemark, U. y Magnusson, B. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2.^a ed.). www.eurachem.org.
- Phenomenex. (2010). *Guía de cuidado de columnas: cómo limpiar una columna de HPLC*. 4–6.
- Puerta, G. (2011). Composición química de una taza de café. *Avances En Química*, 414, 1–12.
http://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/avances_tecnicos/publicaciones_avt0414composicion_quimica_de_una_taza_de_cafe
- Quirós, L. (1998). *Manual de Recomendaciones para el Cultivo del Café*. Instituto del café de Costa Rica.
- Rato, K. y Rivera, T. (2014). *Validación del método analítico de cuantificación de ibuprofeno en tabletas de 600 mg por cromatografía líquida de alta*

resolución.

Research World Coffee. (2016). *Las variedades de café de Mesoamérica y el Caribe*. 33.

file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Variedades_de_Cafe_de_Mesoamerica_y_el_Caribe_20160609.pdf

Rivera, C. A. y Rodríguez, M. del, R. (2010). *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006*. 1–8.

Sanabria, L. M., Martínez, J. A. y Baena, Y. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 202–219.

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67956>

Shan, Y., Jin, X., Cheng, Y. y Yan, W. (2017). Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2028–2040. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1230746>

Sierra, N. y Gómez, G. (2014). *Desarrollo y validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de piperacilina sódica y tazobactam sódico en inyectables para uso humano*.

43(1), 5–21.

Sierra, N., Rojas, J. H., Cuadra, Y., Sisa, A. y Castro, G. (2007). Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y en inyectables de uso veterinario. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(4), 623–630. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322007000400016>

Skoog, D., West, D., Holler, F. y Crouch, S. (2001). *Química analítica*.

Solís, L. D. y Herrera, C. H. (2005). Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café. *Agronomía Costarricense*, 29(2), 99–107.

Suárez, M. L., Taillefer, W., López, E. M., González, O., Villeneuve, P. y Figueroa, M. C. (2013). Antibacterial activity and antifungal and anti-mycotoxigenic activities against *aspergillus flavus* and *a. ochraceus* of green coffee chlorogenic acids and dodecyl chlorogenates. *Journal of Food Safety*, 33(3), 360–368. <https://doi.org/10.1111/jfs.12060>

Thermo Fisher Scientific. (2012). *UltiMate 3000 Series Variable Wavelength Detectors VWD-3100 and VWD-3400RS*. 1.6(4820.7451).

Thermo Fisher Scientific. (2013). *UltiMate 3000 Series WPS-3000 Autosamplers*

(SL, TBSL, RS, TBRS, TXRS). 1.7(4828.2250).

Watanabe, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., Kajihara, Y. y Saito, I. (2006). The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 28(5), 439–449.
<https://doi.org/10.1080/10641960600798655>

Zanin, R. C., Corso, M. P., Kitzberger, C. S. G., Scholz, M. B. dos, S. y Benassi, M. de, T. (2016). Good cup quality roasted coffees show wide variation in chlorogenic acids content. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 480–483. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.012>

Anexos

Anexo 1



ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN Y CERTIFICADO DE ACREDITACIÓN	Código N°: ECA-MP-P03-F01	Página: 3 de 5
	Fecha de entrada en Agencia: 2020.12.17	Versión: 07

Ensayos Químicos:			
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-05: Demanda Química de Oxígeno, digestión húmeda	LD: 6 mg/L LC: 20 mg/L	Modificado a partir de: SMEWW-APHA-AWWA-WEF.5220D. Colorimetría
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-06: Demanda Bioquímica de Oxígeno	LD: 5 mg/L LC: 17 mg/L	SMEWW-APHA-AWWA-WEF.5210D. Respirométrico Conforme al Reglamento de Vertidos y Reuso No. 33601-MINAE-S.A. R 2019-III-07
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-08: Grasas y Aceites, Extracción líquido-líquido	(1-300) mg/L	SMEWW-APHA-AWWA-WEF.5520B. Gravimetría Conforme al Reglamento de Vertidos y Reuso No. 33601-MINAE-S.A. R 2019-III-07
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-10: Sustancias Activas al Azul de Metileno, extracción líquido-líquido	LD: 0.20 mg/L LC: 0.67 mg/L	SMEWW-APHA-AWWA-WEF.5540C. Colorimetría Conforme al Reglamento de Vertidos y Reuso No. 33601-MINAE-S.A. R 2019-III-07

Los términos LD y LC se refieren a *Limite de Detección* y *Limite de Cuantificación*, respectivamente.

**Se refieren a actividades que se realizan tanto en instalaciones fijas como en campo o en las instalaciones del cliente

Actividades que se realizan únicamente en el campo o en las instalaciones del cliente.

Matriz/Producto a ensayar	Código interno del laboratorio, análisis o propiedad medir y tratamiento de muestra	LD y LC o ámbito de trabajo, según corresponda	Referencia al método normalizado y técnica usada
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-01: Muestreo Simple	NA	SMEWW-APHA-AWWA-WEF.1060B. Volumétrico Conforme al reglamento de Vertidos y Reuso No. 33601-MINAE-S.A. R 2019-III-07
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-01: Muestreo compuesto a partir de submuestras de volumen constante o proporcional al caudal	NA	SMEWW-APHA-AWWA-WEF.1060B. Volumétrico Conforme al reglamento de Vertidos y Reuso No. 33601-MINAE-S.A. R 2019-III-07
Aguas y aguas residuales	ICAFE-IA-02: Caudal	NA	SMEWW-APHA-AWWA-WEF.1060. Volumétrico Conforme al reglamento de Vertidos y Reuso No. 33601-MINAE-S.A. R 2019-III-07

Los términos LD y LC se refieren a *Limite de Detección* y *Limite de Cuantificación*, respectivamente.

Esta publicación contiene el alcance que actualmente se encuentra ACREDITADO ante el ECA, para este Organismo de Evaluación de la Conformidad, únicamente para los ítems aquí descritos

Verificar los cambios sobre el alcance y la condición de acreditado en
www.eca.or.cr

ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN Y CERTIFICADO DE ACREDITACIÓN	Código N° : ECA-MP-P09-F01	Páginas: 4 de 5
	Fecha de entrada en vigencia: 2020.12.17	Versión: 07

Fecha	Modificación
2021.01.06	Se modifica el alcance de acreditación debido a la transición a la norma INTE-ISO/IEC 17025:2017. Además, se actualiza el documento a versión 06 y para el método de ensayo ICAFE-IA-05 se cambia el método normalizado por método modificado.
01.08.2017	Se modifica en el alcance el ámbito de medición de la temperatura.
20.04.2017	Se modifica alcance debido al proceso de evaluación de 2017. Se actualiza año de la norma
28.02.2017	Se modifica en el alcance el LD para el ensayo de Sólidos Suspendidos Totales
19.12.2016	Se actualiza alcance según ECA-MP-P04-I04
12.01.2016	Se actualiza referencia del alcance ECA-MP-P09-F01 V03
24.02.2015	Se actualiza referencia del alcance ECA-MP-P09-F01 V02
23.10.2014	Se actualiza referencia del alcance ECA-MP-P09-F01 V01
28.07.2014	Se modifica la columna de Especificación, referencia al método y técnica usada, para todo el alcance acreditado. Se modifica el ámbito de trabajo para el Ensayo Químico de Agua y Aguas Residuales - Determinación de Demanda Química de Oxígeno
26.03.2013	Se modifica el número de versión de los métodos de referencia
07.03.2013	Modificación de alcance en el ámbito de trabajo para el ensayo de aguas y aguas residuales u pH.

Ampliar esta tabla de ser necesario

Esta publicación contiene el alcance que actualmente se encuentra ACREDITADO ante el ECA, para este Organismo de Evaluación de la Conformidad, únicamente para los ítems aquí descritos

Verificar los cambios sobre el alcance y la condición de acreditado en www.eca.or.cr

Anexo 2



Validación de
Curvas de Calibración

Consecutivo: (Fecha análisis)

Longitud de onda (nm)

Lote:

Referencia a datos originales:

Datos para la curva de calibración

Cafeína mg/L	Absorbancia
0.0000	0.00000
0.0000	0.00000
0.0000	0.00000
0.0000	0.00000
0.0000	0.00000
0.0000	0.00000

Datos procesados

Pendiente (m)	#DIV/0!
intercepto (b)	#DIV/0!
S_{yy}	0.00
$s (s_{xx})$	#DIV/0!
y promedio:	0.000
Número de pares (x, y):	5
S_{xx}	0
S_{yy}	0
S_{xy}	#DIV/0!
s_{xx}	#DIV/0!
s_{yy}	#DIV/0!

Alcance de la curva de calibración:

Fecha de preparación:

Elaborado por:



Parámetros de desempeño de la curva

Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación (r)	#DIV/0!
Coefficiente de determinación (r ²)	#DIV/0!
Límite de detección (mg/L):	#DIV/0!
Límite de cuantificación (mg/L):	#DIV/0!
Sensibilidad:	#DIV/0!

Anexo 3

Cromatógrafo líquido de alta resolución, HPLC

Marca: Termo Scientific/Dionex



Anexo 4

Tabla de distribución t-Student

2 colas		80%	90%	95%	98%	99%
$\alpha/2$	ν	0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015
1 cola		90%	95%	97.5%	99%	99.5%
α	ν	0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015
1	1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞		1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M. y Sandoval, S (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.

Anexo 5

Tabla de recuperación

ANALITO	UNIDAD	RECUPERACIÓN ESTIMADO (%)
100	100%	98 - 102
10	10%	98 - 102
1	1%	97 - 103
0,1	0,10%	95 - 105
0,01	100 ppm	90 - 107
0,001	10 ppm	80 - 110
0,0001	1 ppm	80 - 110
0,00001	100 ppb	80 - 110
0,000001	10 ppb	60 - 115
0,0000001	1 ppb	40 - 120

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M. y Sandoval, S (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.

Anexo 6

Equipo de tueste y molienda de café del Icafe



Equipo a

Equipo b

Equipo a. Molino para granos de café tostado, marca Bunn.

Equipo b. Tostador de granos de café marca Probat.

Anexo 7

Resultados de verificación de repetibilidad del método de análisis de CGA en café tostado mediante HPLC en g/kg

Réplicas	3-C QA	5-C QA	4-C QA	3-FQ A	5-FQ A	4-FQ A	3-C QL	4-C QL	3,4-di-C QA	3,5-di-C QA	4,5-di-C QA
1	4.28	10.6 1	5.34	0.33	0.78	0.42	2.08	0.91	0.57	0.42	0.65
2	4.26	10.4 0	5.32	0.35	0.78	0.41	2.09	0.92	0.56	0.40	0.65
3	4.29	10.5 0	5.32	0.34	0.77	0.42	2.09	0.93	0.58	0.43	0.66
4	4.27	10.5 7	5.36	0.33	0.81	0.43	2.09	0.00	0.57	0.42	0.66
5	4.31	10.5 9	5.34	0.35	0.78	0.40	2.10	*	0.57	0.43	0.66
6	4.38	10.7 0	5.42	0.35	0.79	0.42	2.08	0.91	0.58	0.43	0.68
7	4.35	10.7 0	5.37	0.34	0.77	0.41	2.06	0.90	0.57	0.43	0.67
8	4.32	10.5 9	5.34	0.35	0.77	0.40	2.09	0.92	0.57	0.42	0.66
9	4.38	10.7 6	5.42	0.35	0.77	0.40	2.14	0.94	0.58	0.44	0.68
10	4.24	10.4 9	5.32	0.35	0.78	0.39	2.09	0.89	0.56	0.43	0.66
X (g/kg)	4.31	10.5 9	5.36	0.34	0.78	0.41	2.09	0.81	0.57	0.42	0.66
ð	0.05	0.11	0.04	0.01	0.01	0.01	0.02	0.31	0.01	0.01	0.01
ð %	1.13	1.03	0.75	2.10	1.68	3.13	1.00	37.5 4	1.25	2.57	1.61

X (g/kg): promedio de las réplicas en unidades de gramos sobre kilogramos para cada ácido clorogénico.

ð: Desviación estándar de las réplicas para cada ácido clorogénico.

δ %: Desviación estándar en porcentaje de las réplicas para cada ácido clorogénico.

*: Dato eliminado con una prueba Q.

Prueba Q

Prueba Q para eliminar datos discordantes (perdidos). Nivel de confianza 95 %	
n	Valores obtenidos
1	0.91
2	0.92
3	0.93
4	1.07
5	0.98
6	0.91
7	0.90
8	0.92
9	0.94
10	0.89

Resultados del análisis (prueba estadística)

Dato discordante (dato por eliminarse):	1.07
Valor del dato más cercano al dato discordante:	0.98
Valor máximo:	1.07
Valor mínimo:	0.89
Nivel de confianza para la prueba (%):	95
Número de observaciones:	10
Q calculado:	0.53
Q crítico (de la tabla):	0.47
Resultado de la prueba:	El dato puede eliminarse.

Anexo 8

Resultados de verificación de precisión intermedia del método de análisis de CGA en café tostado mediante HPLC en g/kg

	Análisis Día 1										Análisis Día 2										Análisis Día 3									
C G A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	
3- C Q A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
5- C Q A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4- C Q A	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
3- F Q A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5- F Q A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4- F Q A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3- C Q L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
4- C Q L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	*	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Anexo 9

Resultados de la veracidad y recuperación del ácido clorogénico 5-cqa para el método de análisis de CGA en café tostado mediante HPLC

#	Valor medio de concentraciones (mg/L)	Concentración Teórica Adicionada (mg/L)	Promedio de adiciones (mg/L)	Recuperación %
1	29,550	20,406	48,965	95,15
2	18,318	38,665	55,885	97,16
3	28,386	38,475	65,978	97,71
4	26,328	38,570	64,134	98,02
5	56,383	20,406	76,649	99,31
6	32,297	19,285	51,456	99,34
7	44,525	41,800	86,209	99,72
8	27,539	20,406	48,138	100,94
9	14,416	38,570	55,763	107,20
10	30,893	20,406	52,835	107,53

Cn teórica: Concentración del analito 5-CQA en mg/L, adicionada a las muestras analizadas.

Cn real o recuperada: Concentración recuperada del analito 5-CQA en mg/L, en las muestras analizadas.

Anexo 10

Resultados de diferencias absolutas de réplicas con parámetro de desempeño de repetibilidad en g/kg

Ácido Clorogénico	3-C QA	5-C QA	4-C QA	3-F QA	5-F QA	4-F QA	3-C QL	4-C QL	3,4-di-CQA	3,5-di-CQA	4,5-di-CQA
<i>r</i>	0,20	0,30	0,24	0,05	0,11	0,07	0,09	0,08	0,06	0,06	0,05
# Muestra	Diferencias Absolutas de Réplicas										
1	0,03	0,11	0,05	0,00	0,03	0,00	0,03	0,01	0,01	0,00	0,01
2	0,02	0,05	0,03	0,00	0,03	0,00	0,04	0,05	0,00	0,00	0,01
3	0,09	0,24	0,12	0,01	0,04	0,02	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01
4	0,04	0,14	0,07	0,01	0,02	0,03	0,14	0,04	0,00	0,00	0,00
5	0,01	0,03	0,02	0,00	0,01	0,01	0,07	0,00	0,00	0,01	0,01
6	0,18	0,27	0,21	0,01	0,03	0,02	0,04	0,02	0,02	0,01	0,03

r: límite de repetibilidad según la Tabla 3 de la norma alemana DIN 10767.

Anexo 11

Comparación de resultados de diferencias absolutas de réplicas con el parámetro de desempeño de reproducibilidad en g/kg

	3-CQ A	5-CQ A	3-FQA	4-CQ A	5-FQA	4-FQA	3-CQL	4-CQL	3,4-di- CQA	3,5-di- CQA	4,5-di- CQA
R	0,48	1,26	0,26	0,80	0,84	0,66	1,52	0,44	0,31	0,27	0,17
D	X	≠	X	≠	X	≠	X	≠	X	≠	X
í											
a											
1	2, 0, 7, 0, 0, 0, 3, 0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,1	5 0 4 4 0 0 4 0 3 2 0 2 7 0 5 0 0 1 0 0 0 1 4	9 1 9 2 0 9 8 6 3 6 0 2 2 7 1 4 0 2 0 7 0								
2	2, 0, 7, 0, 0, 0, 3, 0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,0	5 1 0 2 0 0 4 1 5 0 2 0 7 1 5 2 1 0 0 0 0 2 7	8 8 6 9 9 6 2 9 9 4 2 4 9 1 4 6 2 5 7 6 3								
3	2, 0, 7, 0, 0, 0, 3, 0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,2	7 1 3 1 1 1 6 1 6 3 2 2 9 1 8 2 1 1 1 1 1 3 0	6 7 6 3 5 5 2 3 3 1 7 7 0 8 0 9 7 7 2 2 0								

R: límite de reproducibilidad según la Tabla 3 de la norma alemana DIN 10767 en g/kg. X: promedio de los duplicados independientes de cada día. ≠: diferencia absoluta en g/kg entre el promedio del día 1 y 2, 2 y 3 y 1 y 3 respectivamente.

Anexo 12

Resultados obtenidos para las muestras de café tostado analizadas en g/kg

	3-CQ A		5-CQA*		4-CQ A		3-FQA		4-FQA		5-FQA		3-CQL		4-CQL		3,4-di- CQA		3,5-di- CQA		4,5-di- CQA	
M 1	3,09	3,18	9,90	9,40	4,10	4,17	0,00	0,00	0,03	0,04	0,03	0,05	2,04	2,01	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02
M 2	3,95	4,00	12,37	12,38	5,23	5,31	0,08	0,09	0,26	0,28	0,90	1,00	2,05	2,05	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,03
M 3	3,94	4,20	11,10	11,59	5,17	5,48	0,00	0,02	0,09	0,04	0,05	0,00	2,06	2,06	0,06	0,02	0,03	0,06	0,07	0,00	0,03	0,03
M 4	3,74	3,64	10,10	10,71	4,42	4,81	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,09	1,05	1,07	0,05	0,03	0,05	0,08	0,04	0,07	0,03	0,09
M 5	3,70	3,72	10,94	10,92	4,91	4,93	0,01	0,01	0,03	0,05	0,08	0,08	2,00	2,00	0,06	0,06	0,01	0,01	0,00	0,00	0,03	0,03
M 6	4,78	4,58	12,13	11,64	6,07	5,83	0,02	0,04	0,03	0,03	0,08	0,03	2,03	2,03	0,09	0,09	0,05	0,05	0,04	0,03	0,07	0,07
M 7	4,83	4,91	12,57	12,84	6,17	6,22	0,02	0,02	0,03	0,03	0,08	0,08	2,03	2,04	0,09	0,00	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05	0,06
M 8	4,33	4,33	11,60	11,59	5,55	5,57	0,01	0,01	0,03	0,03	0,08	0,05	2,04	2,01	0,09	0,07	0,03	0,01	0,02	0,05	0,00	0,01
M 9	4,84	4,77	12,65	12,54	6,11	6,13	0,02	0,02	0,04	0,04	0,01	0,01	1,08	1,09	0,07	0,07	0,04	0,04	0,03	0,03	0,06	0,06
M 10	5,09	5,02	13,68	13,82	6,47	6,52	0,04	0,04	0,05	0,05	0,00	0,00	2,04	2,05	1,01	1,01	0,06	0,06	0,05	0,05	0,08	0,09
M 11	2,91	3,01	8,01	8,28	3,76	3,88	0,09	0,00	0,03	0,04	0,07	0,04	2,03	2,02	0,08	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,04	0,04

M	2,	2,	9,	9,	3,	3,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	1,	1,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,
2	8	7	39	00	9	7	0	0	0	0	1	1	6	6	2	1	0	0	0	0	0	0
5	7	2			2	6	0	0	0	0	7	5	7	4	1	8	0	0	0	0	0	0

*Ácido principal en concentración de los granos de café.