



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**Desarrollo de un método para cuantificar compuestos  
fenólicos en café por cromatografía de líquidos**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Autor:** Alvarez Pinta, Mishell Stefanie

**Director:** Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny

LOJA

2022



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2022

## Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 20 de mayo del 2022

Magister,  
Claudia Teresa Cruz Erazo  
**Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia**  
Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Desarrollo de un método para cuantificar compuestos fenólicos en café por cromatografía de líquidos realizado por Mishell Stefanie Alvarez Pinta ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de 3% coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, Ph.D.

C.I.: 1103596167

Correo electrónico: [jgfigueroa@utpl.edu.ec](mailto:jgfigueroa@utpl.edu.ec)

### **Declaración de autoría y cesión de derechos**

Yo, Mishell Stefanie Alvarez Pinta, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor(a) del Trabajo de Titulación denominado: Desarrollo de un método para cuantificar compuestos fenólicos en café por cromatografía de líquidos, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico, Importancia de la producción de café, Importancia del consumo del café sobre la salud del consumidor, Compuestos fenólicos presentes en el café, Análisis de compuestos fenólicos, Cromatografía de líquidos como herramientas para el análisis de compuestos fenólicos, Capítulo 2. Metodología de la investigación, Capítulo 3. Resultado y Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, Ph.D., director (a) del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....  
Autor: Mishell Stefanie Alvarez Pinta

C.I.: 1150209318

Correo electrónico: [msalvarez2@utpl.edu.ec](mailto:msalvarez2@utpl.edu.ec)

### **Dedicatoria**

El presente trabajo va dedicado de manera especial a mi querida abuelita Rosita que siempre me acompaña desde el cielo, a quien debo todo lo que soy, por sus cuidados y amor que demostró siempre, por creer que llegaría lejos y seguramente estaría orgullosa por este logro.

A mi mamá Mery, por brindarme su cariño, por su lucha y trabajo fue posible llegar a una de las tantas metas fijadas, por darme lo mejor y apoyarme en todo lo que ha podido.

A mi Hermanita Anahí, por ese cariño interminable, quien me ha inspirado en ser mejor persona y ser un ejemplo en su vida.

A mi amoroso Ronald, por ser un hombre maravilloso, por ser ese compañero y complemento que está en las buenas y malas, por su paciencia infinita y sobre todo por impulsar en mí a no rendirme, por siempre tenerme el desayuno para poder comenzar el día.

A mis gorditas Sammy, Dayra, Sofía, por ser ese motivo de salir adelante, cada esfuerzo ha valido la pena por ustedes.

## **Agradecimiento**

Agradezco a todos los docentes que han influenciado positivamente en mi formación profesional.

A Mgs. Natali Solano y María del Cisne Guamán, Ph.D. por el tiempo y esfuerzo invertidos en la asesoría del presente trabajo.

Finalmente quiero expresar mis más grande y sincero agradecimiento al Doctor Geovanny Figueroa, principal colaborador durante este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y paciencia permitió el desarrollo de este trabajo.

## Índice de Contenido

Carátula.....	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación .....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos .....	III
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de Contenido .....	VII
Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
Capítulo uno .....	5
Marco Teórico .....	5
1.1 Importancia de la producción del café .....	5
1.2 Importancia del consumo del café sobre la salud del consumidor .....	7
1.3 Compuestos fenólicos presentes en el café.....	9
1.4 Análisis de compuestos fenólicos .....	12
1.5 HPLC como herramientas para el análisis de compuestos fenólicos.....	13
Capítulo dos .....	16
Metodología.....	16
2.1 Reactivos y estándares .....	16
2.2 Equipo.....	16
2.3 Muestras de café .....	16
2.3.1 <i>Obtención de la muestra</i> .....	16
2.3.2 <i>Preparación de la muestra</i> .....	16
2.4 Determinaciones analíticas.....	17
2.4.1 <i>Optimización del gradiente de las fases móviles</i> .....	17
2.4.2 <i>Preparación de la curva de calibración</i> .....	17
2.4.3 <i>Precisión</i> .....	20
Capítulo tres .....	21
Resultados y discusión.....	21
3.1 Optimización del gradiente de las fases móviles.....	21
3.2 Linealidad del método .....	26
3.3 Precisión.....	31
3.4 Análisis estadístico .....	32
3.4.1 <i>Optimización mediante metodología de superficie de respuesta</i> .....	32
3.4.2 <i>Ecuación de regresión</i> .....	35
3.4.3 <i>Análisis de varianza</i> .....	35

<b>3.4.4 Optimización de extracción.....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>38</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>39</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>40</b>
<b>Apéndice .....</b>	<b>50</b>
<b>Apéndice A. Análisis de varianza para el ácido neoclorogénico. ....</b>	<b>50</b>
<b>Apéndice B. Análisis de varianza para el ácido clorogénico. ....</b>	<b>51</b>
<b>Apéndice C. Análisis de varianza para la cafeína.....</b>	<b>52</b>
<b>Apéndice D. Certificado de análisis de ácido gálico .....</b>	<b>53</b>
<b>Apéndice E. Certificado de análisis de ácido clorogénico .....</b>	<b>54</b>
<b>Apéndice F. Certificado de análisis de ácido cafeico .....</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice G. Certificado de análisis de ácido p-cumárico.....</b>	<b>56</b>
<b>Apéndice H. Certificado de análisis de cafeína .....</b>	<b>57</b>

#### Índice de Tablas

<b>Tabla 1. Acciones del café y sus componentes en el metabolismo de la glucosa .....</b>	<b>9</b>
<b>Tabla 2. Diseño Box-Behnken para la optimización de la extracción.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 3. Preparación de soluciones madre .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 4. Preparación de la solución de trabajo.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 5. Preparación de estándares .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 6. Concentraciones y coeficientes de variación de los diferentes compuestos.</b>	<b>31</b>

#### Índice de Figuras

<b>Figura 1. Estructura química del ácido clorogénico .....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2. Derivados del ácido clorogénico.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3. Cromatografía líquida de alta eficiencia .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4. Ensayo 1 .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5. Ensayo 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 6. Ensayo 3 .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 7. Ensayo 4.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8. Ensayo 5.....</b>	<b>25</b>

<b>Figura 9. Curva de calibración de cafeína .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 10. Curva de calibración de ácido clorogénico .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 11. Curva de calibración de ácido gálico.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 12. Curva de calibración de ácido cafeico.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 13. Curva de calibración de ácido p-cumárico .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 14. Gráfica de superficie de respuesta de ácido neoclorogénico .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta de ácido clorogénico.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta de cafeína .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 17. Gráfica de optimización de variables.....</b>	<b>37</b>

## Resumen

Se desarrolló un método para separar y cuantificar compuestos fenólicos presentes en el café, empleando la cromatografía líquida con un detector de arreglo de diodos y una columna C18. Se evaluaron diferentes condiciones de elución para obtener una resolución cromatográfica  $\geq 1.5$  entre los diferentes compuestos. Además, se evaluó la linealidad del método encontrando valores del coeficiente de determinación  $>0.99$  para cafeína, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido cafeico y ácido p-cumárico. Por otra parte, se evaluó la precisión obteniendo coeficientes de variación  $< 15\%$ . A continuación, se optimizó el método de extracción de cafeína, ácido neoclorogénico y ácido clorogénico a partir de café tostado. Las condiciones óptimas de extracción fueron  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 68 min y una concentración de 97% de agua en el solvente.

*Palabras clave:* café, compuestos fenólicos, cromatografía líquida.

### **Abstract**

A method was developed to separate and quantify phenolic compounds present in coffee, using liquid chromatography with a diode array detector and a C18 column. Different elution conditions were evaluated to obtain a chromatographic resolution  $\geq 1.5$  between the different compounds. In addition, the linearity of the method was evaluated, finding values of the determination coefficient  $>0.99$  for caffeine, chlorogenic acid, gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid. On the other hand, precision was evaluated, obtaining coefficients of variation  $<15\%$ . Next, the extraction method of caffeine, neochlorogenic acid and chlorogenic acid from roasted coffee was optimized. The optimal extraction conditions were  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 68 min and a concentration of 97% water in the solvent.

Keywords: coffee, phenolic compounds, liquid chromatography.

## Introducción

El café es el producto agrícola tropical más comercializado del mundo, cultivado en más de 50 países, en más de 11 millones de hectáreas. La producción de café es de gran importancia social, económica y ecológica en el Ecuador, ya que más del 4% de la población depende directamente de la producción de café para su sustento (Capa et al., 2015). Además, la ubicación geográfica y las condiciones climáticas del Ecuador, brindan condiciones idóneas para la producción de café. Se cultivan dos variedades, café arábigo y café robusta, en las tierras altas y bajas, respectivamente. Ecuador presenta mayor cantidad de café arábigo 62% y el 38% es robusta (Jiménez & Massa, 2015).

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo y es apreciado principalmente por su sabor y aroma. Los datos epidemiológicos y biológicos respaldan el papel potencial del café en la prevención de diversas enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos neurodegenerativos. Estos hallazgos han despertado el interés por caracterizar componentes bioactivos específicos que puedan utilizarse como agentes fisiológicamente activos (Ferruzzi, 2010).

Los granos de café son, sin duda, una fuente de componentes que han influido dentro de procesos metabólicos, estos componentes a menudo son alcaloides como la cafeína y la trigonelina, compuestos fenólicos en el que se destaca el ácido clorogénico y los diterpenos, presentando un gran potencial antioxidante (Frost & Logomarsino, 2012). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que juegan un papel de defensa y representan los fitoquímicos más estudiados debido a su actividad biológica (Murthy & Naidu, 2012).

Los objetivos este presente trabajo son, desarrollar un método cromatográfico que permita cuantificar la mayor cantidad de compuestos fenólicos en café, evaluar diferentes condiciones que permitan mejorar la resolución cromatográfica, establecer el rango lineal del método cromatográfico.

La presente investigación está estructurada en capítulos que contienen temas relevantes, el capítulo uno describe la importancia de la producción del café, importancia del

consumo del café sobre la salud del consumidor, compuestos fenólicos presentes en el café, análisis de los mismos, cromatografía de líquidos como herramientas para analizar estos compuestos. Capítulo dos explica la metodología empleada, finalmente el capítulo tres presenta los resultados obtenidos y la discusión para comparar con otros estudios.

## Capítulo uno

### Marco Teórico

#### 1.1 Importancia de la producción del café

La producción de café es una de las actividades agrícolas más importantes que se desarrolla tanto a nivel económico y social, este fenómeno agrícola se produce en toda Latinoamérica (Souza et al., 2019). Para su producción se destina aproximadamente 11 millones de hectáreas, se considera que esta actividad brinda trabajo alrededor de 25 millones de agricultores en su mayoría pequeños productores (Läderach et al., 2017).

Ecuador es productor, exportador y consumidor de *Coffea arabica* L. (arábica) y *Coffea canephora* (robusta). Las plantaciones están distribuidas en las cuatro regiones geopolíticas del país (Costa, Sierra, Amazonía y Región Insular), conformando sistemas productivos agroforestales cafetaleros, que son la opción tecnológica más viable para recuperar las costumbres y tradiciones de las familias campesinas cafetaleras (Ponce Vaca, Acuña Velázquez, et al., 2018).

En el país es importante en los siguientes aspectos: economía, sociedad, medio ambiente, instituciones y salud humana. Económicamente, es una fuente de divisas e ingresos para los productores de café. Socialmente, muchas nacionalidades y pueblos de las provincias ecuatorianas están involucrados en la cadena del café. Ambientalmente crece en sistemas agroforestales, en variedad de suelos y climas, contribuyendo a la conservación de la fauna y flora nativas; en lo institucional el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) ha impulsado gestiones para la reactivación de la caficultura para favorecer a las estructuras organizativas de los productores. En términos de salud humana, el consumo de café muestra una relación inversa con el riesgo de diabetes tipo 2, daño hepático y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Ponce Vaca, Orellana Suarez, et al., 2018).

Para la producción de cultivos es necesario varios requerimientos entre estos los factores ambientales que afectan directamente al crecimiento y la productividad entre ellos, destacan directamente la temperatura, la disponibilidad de agua, la intensidad del sol, el

viento, el tipo de suelo y la topografía de la tierra. En este sentido, la temperatura ideal para el cultivo de café arábica es de 18°C en el día y en la noche a 22°C, mientras que, para el café robusta la temperatura debe estar comprendida entre 22 y 28°C. Por otra parte, la disponibilidad de agua en sus diversas formas afecta al desarrollo del café, su precipitación anual suele ser de 1.400 a 2000 mm mientras que para la especie robusta es de 2000 a 2500 mm, a nivel de humedad suele destacarse con un buen desarrollo en ambientes de 60 a 75% de humedad, el viento es otro importante factor que afecta al cultivo, el mejor tipo de suelo suelen ser los aluviales y coluviales con textura se necesita una profundidad del suelo de al menos 2 m para el desarrollo, la topografía del terreno suele requerirse colinas ligeramente onduladas aunque existe una posibilidad de desarrollo en pendientes aunque su producción es más costosa (Krishnan, 2017).

El sector cafetalero del país ha sido uno de las materias prima más exportadas, alcanzando los 413 millones de dólares. El país produce y exporta café arábica y robusta. Sin embargo, en la última década ha sufrido una significativa pérdida en producción de café debido a la edad creciente de árboles productivos, brotes de plagas y enfermedades, la escasa modernización en los procesos de manufactura y el escaso desarrollo de nuevas variedades de café, además de determinarse precios inestables (Jácome & Garrido, 2017).

Cerca del 68% del café de exportación del Ecuador es arábico este se cultiva principalmente en las provincias de Loja y Manabí, mientras que el 32% es de tipo robusta que se produce generalmente en la Amazonía Ecuatoriana. En Loja se considera al café como su producto emblemático dentro de sus 16 cantones (Rojas 2019). Dada su ubicación geográfica se distingue al producto al ser ligeramente ácido y se han producido anualmente cerca de 130 mil sacos de 60kg en un área de aproximadamente 29 mil hectáreas. Este producto es muy apetecido dentro del mercado europeo y Norte Americano. A nivel social, ha permitido la generación de empleos que se presenta a nivel de su comercialización, transporte y exportación generando de esta manera sostenibilidad económica de miles de familias en la región (Rúas Araújo et al., 2016).

La provincia de Loja es reconocida a nivel nacional e internacional por su tradición cafetalera y la producción de un café de alta calidad, se le otorga un reconocimiento importante para el café de esta zona del país por sus condiciones agroclimáticas, los sistemas de producción y sus procesos especiales de siembra, cosecha y manejo post cosecha, varias veces ganador en el concurso Nacional Taza Dorada (turismo, 2018). Desde el 2007, Taza Dorada es el concurso más reconocido de Ecuador, premiando al mejor café del país, es organizado por la Asociación Nacional de Exportadores de Café (Anacafé) y cuenta con jueces extranjeros (Crónica, 2020). En él participan caficultores de diferentes provincias, además promueve la producción de cafés de calidad y su exhibición en todo el mundo, esto con la finalidad de atraer mercados internacionales, brindando a los productores de café la oportunidad de ingresar a los mercados más exigentes y mostrar sus diferentes variedades y procesos que garantizan la trazabilidad desde la finca hasta el consumidor final (Rikolto, 2019). En el 2020 cumplió su 14va edición del concurso y Loja sigue destacando al ganar el primer y segundo lugar, promoviendo el comercio del café sobre todo en compradores del continente asiático (Crónica, 2020).

## **1.2 Importancia del consumo del café sobre la salud del consumidor**

El café es una bebida que se obtiene de las semillas tostadas y molidas del fruto de la planta del café, tanto el grano en diferentes grados de madurez y la planta en sí es un producto natural, al consumirse sin azúcar podría enmarcarse dentro de las plantas medicinales, porque presenta muchas propiedades beneficiosas antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes (Puertas et al., 2013)

El café es una de las bebidas más populares y consumidas a nivel mundial, apreciado principalmente por su sabor y aroma (Samoggia & Riedel, 2019), se estima que al menos el 30% de la población mundial consume una taza de café al día, teniendo además un concepto generalizado del café como “estimulante” y “energizante” (Mesa et al., 2017).

La composición química del café incluye compuestos fenólicos como los ácidos clorogénicos, que son una fuente importante de antioxidantes en la dieta humana, alcaloides como la cafeína (1% de la composición total), la trigonelina que es precursora de la vitamina

B<sub>3</sub>, diterpenos son ácidos grasos como cafestol y kahweol, carbohidratos, lípidos, fibra soluble, vitaminas como niacina, minerales como el potasio y el magnesio (Affonso et al., 2016; Montagnana et al., 2012).

La cafeína es un alcaloide conocido también como 1,3,7-trimetilxantina, algunas personas lo catalogan como una droga natural y es muy beneficioso en dosis moderadas porque estimula el sistema nervioso central para proporcionar energía, lo que permite mantenerse alerta, es de rápida absorción, es metabolizada en el hígado por la isoenzima citocromo P-450 (Ramírez Prada, 2010), los estudios han demostrado que la cafeína mejora el rendimiento cognitivo, mejora el estado de alerta, los niveles de atención, la memoria a corto plazo y la capacidad de concentración (Rucci et al., 2011).

El consumo de café esporádico y moderado no presenta alteraciones y es beneficioso (O'Keefe et al., 2013), tiene efectos positivos sobre enfermedades neurodegenerativas evitando trastornos relacionados con la edad, deterioro cognitivo mental, demencia, Alzheimer, enfermedad de Parkinson (Colombo & Papetti, 2020). Datos epidemiológicos y biológicos apoyan un papel potencial del café en la prevención de varias enfermedades crónicas, trastornos cardiovasculares, diabetes (Morisco et al., 2014), presentando características antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas y anticancerígenas (Poole et al., 2017). Estos hallazgos han intensificado el interés en caracterización de componentes bioactivos específicos que pueden servir como agentes fisiológicamente activos (Ferruzzi, 2010).

A nivel plasmático se ha confirmado la disminución de la glucosa en ayunas, obtenido de esta manera una mayor sensibilidad a la insulina debido al aumento plasmático de adiponectina, en la Tabla 1 nos indica algunos beneficios (Natella & Scaccini, 2012).

**Tabla 1**

*Acciones del café y sus componentes en el metabolismo de la glucosa.*

<b>Componentes</b>	<b>Beneficios del café</b>
<b>Café descafeinado</b>	Mejor tolerancia a la glucosa. Permite la absorción de la glucosa. Incremento del glucagón.
<b>Cafeína</b>	Menor riesgo de diabetes mellitus. Reduce el almacenamiento de la glucosa.
<b>Ácido clorogénico</b>	Mejora el metabolismo de la glucosa. Reducir las respuestas a la insulina. Efectos antioxidantes. Inhibir la glucosa-6-fosfatasa. Mejora la distribución de minerales.
<b>Ácido quínico</b>	Aumenta la sensibilidad a la insulina.
<b>Trigonelina</b>	Mejora el metabolismo de la glucosa.

*Nota.* Adaptado de (Butt & Sultan, 2011)

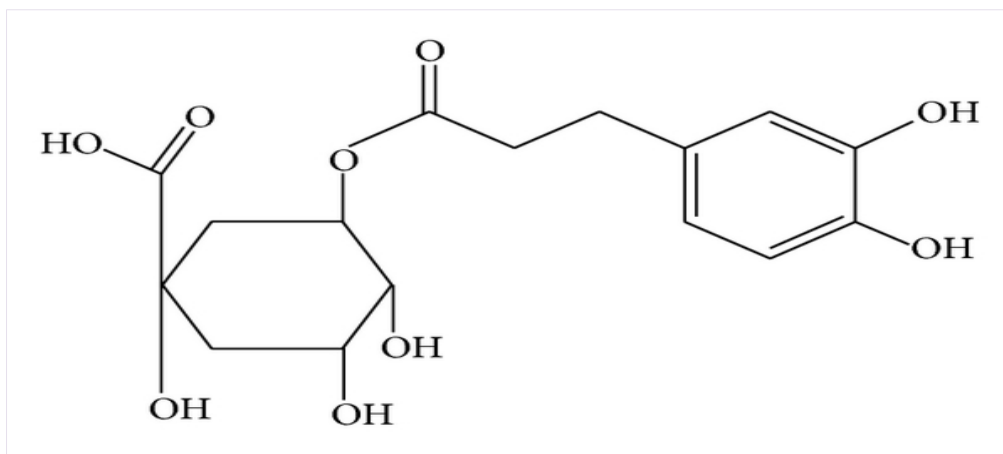
Existe algunas discrepancias sobre los beneficios del consumo de café sobre las enfermedades cardiovasculares (ECV) y la hipertensión (Chrysant, 2015), debido a diversos criterios, en bebedores frecuentes de café presentan una alteración hipertensiva, problemas cardiovasculares, alteraciones en el ritmo circadiano, no pueden conciliar el sueño (Mesas et al., 2011), pero pueden confundirse con factores de riesgo asociados con estilos de vida desfavorables como hábitos alimenticios, tabaquismo, el sobrepeso, además hay que considerar diferencias en la frecuencia de consumo de café y de sus características, como el tamaño de la taza, el tipo de grano, cantidades de azúcar, leche u otras sustancias (Leyva et al., 2021).

### **1.3 Compuestos fenólicos presentes en el café**

Los granos de café poseen una amplia variedad de compuestos fenólicos, su principal componente son los ácidos clorogénicos como se observa en la Figura 1, que se forma de la esterificación del ácido quínico y derivados de ácido trans-cinámico (ácido cafeico, p-cumárico y ferúlico) (Rostagno et al., 2015).

**Figura 1**

*Estructura química del ácido clorogénico*

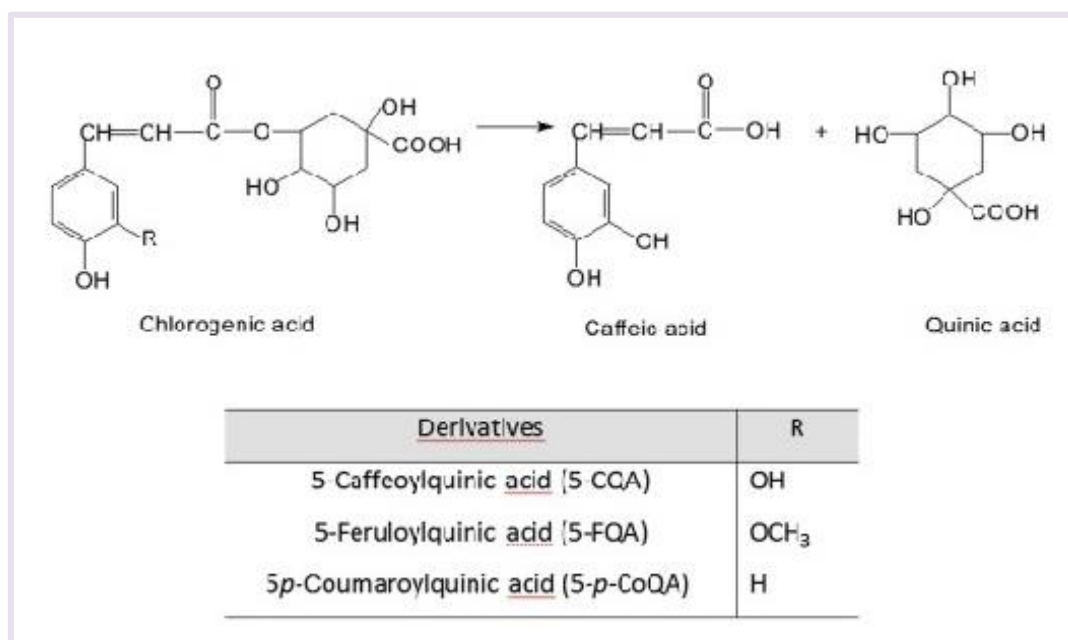


*Estructura química del ácido clorogénico [Imagen], Tomado de (Meng et al., 2013).*

Mediante la reacción del ácido clorogénico, se generan varios compuestos como cafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos, ácidos p-cumaroilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos Figura 2, lactonas de ácido cafeoilquínico, lactonas de ácido feruloilquínico generados durante el proceso de tostado (Monente et al., 2015).

**Figura 2**

*Derivados del ácido clorogénico.*



*Estructura química del ácido clorogénico y sus principales derivados [Imagen], Tomado de (Rostagno et al., 2015).*

El ácido clorogénico es un compuesto fenólico que se encuentra ampliamente distribuido en frutas, verduras y en el café, presenta características antioxidantes y antiapoptóticas (Gagliardini et al., 2017). Los ácidos clorogénicos del café son los responsables del aroma y la astringencia (Jeszka-Skowron et al., 2015).

Este componente es térmicamente inestable por lo que sufre degradación térmica en la etapa de tostado (Shan et al., 2014). En un periodo de 10 minutos de tostado (tueste medio) el café tiende a aumentar sus actividades antioxidantes, el café arábica presenta entre 70 y 200 mg de ácidos clorogénicos, mientras que el café robusta contiene entre 70 y 350 mg (Upadhyay & Mohan Rao, 2013). En tostado muy prolongados existirá una pérdida de ácido clorogénicos del 90% y un tueste más prolongado determinará una pérdida total del componente (Zawirska-Wojtasiak et al., 2014).

El ácido quínico durante el tostado genera  $\gamma$ -quinuro y el ácido siloquímico que es un isómero, además de los ácidos cinámicos (Wei & Tanokura, 2015). Asociados a un aumento

de amargor y una disminución de acidez y dulzor siendo determinantes los tiempos de tueste (Münchow et al., 2020).

#### **1.4 Análisis de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos o simplemente fenoles son metabolitos químicos derivados del metabolismo secundario de plantas, desempeñando diferentes funciones específicas en la supervivencia de las plantas como protección contra los rayos UV, insectos y patógenos, entre otros. Se pueden clasificar en tres grupos según el metabolito precursor del que se forman: (1) los terpenos fenólicos derivados del isopreno, (2) los ácidos hidroxibenzoicos (ácido 3-dehidroshikímico) y (3) los fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas o flavonoides (L -fenilalanina y L -tirosina) derivadas de las rutas del ácido shikímico y/o malónico (de Elguea-Culebras et al., 2022).

Los ácidos fenólicos son una de las otras clases fenólicas principales dentro del Reino Vegetal y ocurren en forma de ésteres, glucósidos o amidas, pero rara vez en forma libre. La variación en los ácidos fenólicos está en el número y ubicación de los grupos hidroxilo en el anillo aromático, tienen dos estructuras: ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Los derivados del ácido hidroxicinámico incluyen los ácidos ferúlico, cafeico, p-cumárico y sinápico, mientras que los derivados del ácido hidroxibenzoico consisten en ácido gálico, ácidos vanílico, siríngico y protocatequico (Khoddami et al., 2013).

El ácido clorogénico es uno de los polifenoles más abundantes en el café que al estar constituido por hidróxilos, ésteres cinámicos y ácido quínico conforman un gran complejo (Naveed et al., 2018). La estructura química del ácido clorogénico se compone de dos anillos un aromático A mientras que el B es un anillo alicíclico (Saqib et al., 2016). Debido a los isómeros, epímeros y las sustituciones en el anillo aromático se deriva una gran familia de ácidos clorogénicos siendo el más común el 5-O-cafeiol-quinico (5-CQA) (Díaz & Perdomo, 2015).

La mayoría de los fenoles vegetales se derivan del ácido tras-cinámico que se produce a través de la L-fenilalanina (Sengupta et al., 2018). Entre estos tenemos al ácido cafeico

(ácido 3,4-dihidroxicinámico) estos a su vez se dividen en monómeros de ácido cafeico, dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros de ácido cafeico superior (Hao et al., 2015).

El ácido p-cumarínico también conocido como ácido 4-hidroxicinámico es un ácido fenilpropanoico que es sintetizado a partir de la vía metabólica del Shikimato, derivado de aminoácidos precursores como la tirosina y fenilalanina (Ferreira et al., 2019). Finalmente el ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) es un potente eliminador de radicales libres (Shivashankara et al., 2015). Siendo sintetizado al igual que el ácido p-cumarínico a partir de la tirosina y fenilalanina (Kim & Han, 2014).

Los isómeros del ácido feruloilquínico representan el 4% del contenido del ácido clorogénico de los cuales se ha identificado isómeros como el ácido 3-O-feruloilquínico 1, ácido 4-O-feruloilquínico 2 y ácido 5-O-feruloilquínico que son la base de la constitución de los ácidos cafeoilquínico (Dokli et al., 2013). Los ácidos p-cumaroilquínicos (pCoQA) presentan una baja incidencia de estos se pueden identificar cuatro isómeros 1-Op-cumaroilquínico, ácido 1,5-Op-cumaroilquínico, 3-Op-cumaroilquínico, 4-Op-cumaroilquínico (Gutiérrez et al., 2017). La síntesis de los ácidos dicafeoilquínicos se produce mediante la esterificación de ácido cafeico más ácido quínico y un segundo ácido cafeico (Sissi et al., 2020). Este presenta tres isómeros 3,4-dicafeoilquínicos, 3,5-dicafeoilquínicos y 4,5-dicafeoilquínicos (Loaiza-Campiño et al., 2020).

Las lactonas se sintetizan a partir del tostado del café en la pérdida de una molécula de agua del ácido quínico y enlace éster intramolecular (Kraehenbuehl et al., 2017). Los principales derivados son las lactonas del ácido feruloilquínico, las lactonas del ácido cafeoilquínico y en baja proporción la lactona del ácido p-cumaroilquínico contribuyen al sabor del café a pesar de sus bajas concentraciones (Jaiswal et al., 2014; Wei & Tanokura, 2015).

### **1.5 HPLC como herramientas para el análisis de compuestos fenólicos**

La historia de la cromatografía comenzó hace más de un siglo (Šesták et al., 2015). La cromatografía líquida de alto rendimiento se dio a conocer por primera vez en 1960 en

donde la técnica era capaz de alcanzar procesos de automatización, velocidad y alta sensibilidad (Snyder & Dolan, 2013).

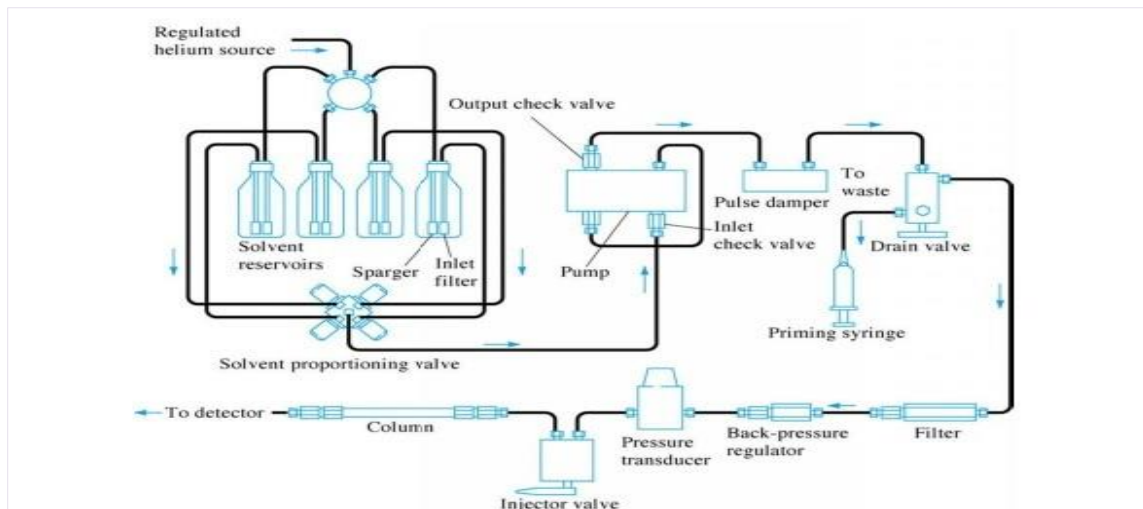
La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés), se la puede definir como una técnica de separación que permite identificar diferentes compuestos, esta se compone de dos fases, una móvil y otra estacionaria (Lozano-Sánchez et al., 2018).

La fase móvil compuesta por un solvente como hexano, acetato de etilo, en caso de estudios fenólicos se emplean agua, metanol, acetonitrilo, ácido  $\alpha$ - fosfórico y ácido fórmico, siendo esta la que mueve el analito a través de la columna, los analitos están presentes en el disolvente apropiado para inyectarlos en el sistema cromatográfico (Agrahari et al., 2013; Gini & Jeya Jothi, 2018). La bomba de HPLC distribuye la fase móvil a través del sistema, normalmente a un caudal de 0.4-1 ml/min de forma controlada y precisa (Reuhs, 2017).

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que se encuentra inmovilizado en el sólido, la fase estacionaria puede consistir de partículas (porosas o solidas), las paredes de un tubo o material fibroso (Matei et al., 2012). Una fase adecuada estacionaria debe presentar tres requisitos como ser incomprensible, insoluble en la fase móvil con un área superficial bien desarrollada y no interactuar irreversiblemente con el analito (Nesterenko & Palamareva, 2019). Al final del sistema encontraremos un detector en donde analiza la solución que se encuentra eluyendo de la columna la concentración del componente individual del analito es proporcional a la señal eléctrica (Sunil et al., 2018).

**Figura 3**

*Cromatografía líquida de alta eficiencia.*



*Desarrollo del método de HPLC [Imagen], Tomado de (Patil, 2017), (<https://n9.cl/egol>)*

## Capítulo dos

### Metodología

#### 2.1 Reactivos y estándares

Los disolventes utilizados para la cromatografía líquida de alta eficiencia fueron de grado HPLC, el agua, metanol se adquirió de Fisher Chemical, el ácido fórmico al 98% de Loba chemie. Los ácidos fenólicos: gálico ( $\geq 97.80$ ), clorogénico ( $\geq 95\%$ ), cafeico ( $\geq 98\%$ ), p-cumárico ( $\geq 98\%$ ), y el alcaloide cafeína ( $\geq 99.96\%$ ), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

#### 2.2 Equipo

Para el análisis de compuestos fenólicos se utilizó el cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000, Thermo Scientific (EE.UU.), acoplado a un espectrómetro de masas amaZon speed, con trampa de iones, Bruker. Se utilizó una columna C18 Accucore RP-MS (150x4.6 mm, tamaño de partícula 2.6  $\mu\text{m}$ ), una pre-columna, ambas de Thermo Scientific (EE.UU.). El equipo HPLC estuvo provisto de un detector de arreglo de diodos y se registró la absorbancia a una longitud de onda de 254 nm. Se empleó el sistema software Compass Data Analysis de Bruker para el manejo de datos.

#### 2.3 Muestras de café

##### 2.3.1 Obtención de la muestra

Se trabajó con café tostado y molido que se adquirió en un supermercado de la ciudad de Loja.

##### 2.3.2 Preparación de la muestra

Previo a la extracción se redujo el tamaño de partícula del café a un valor  $\leq 500 \mu\text{m}$ . Los ensayos de extracción de los compuestos fenólicos se realizaron mediante la tecnología asistida por ultrasonidos. Con la finalidad de optimizar el proceso de extracción, se utilizó la metodología de superficie de respuesta. En la Tabla 2, se presentan las distintas condiciones evaluadas con este propósito.

**Tabla 2**

*Diseño Box-Behnken para la optimización de la extracción.*

<b>Identificación</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (%)</b>
1	70	102.5	0
2	47.5	200	0
3	47.5	102.5	50
4	25	5	50
5	47.5	200	100
6	47.5	5	100
7	25	102.5	100
8	70	102.5	100
9	70	5	50
10	25	102.5	0
11	47.5	5	0
12	47.5	102.5	50
13	47.5	102.5	50
14	70	200	50
15	25	200	50

## **2.4 Determinaciones analíticas**

### **2.4.1 Optimización del gradiente de las fases móviles**

Los procesos de separación de los compuestos fenólicos del café se realizaron en el equipo de cromatografía de líquidos HPLC, con una combinación de solventes en la fase móvil se empleó agua (A) más 0.1% de ácido fórmico y metanol (B) en modo de elución en gradiente y una fase estacionaria contenida en una columna C18 de fase inversa. Se inyectó 20 µL de la muestra preparada. La columna se mantuvo a 25 °C.

### **2.4.2 Preparación de la curva de calibración**

A continuación, se detalla en la Tabla 3 la preparación de las soluciones madre de los ácidos gálico, clorogénico, cafeico, p-cumárico y el alcaloide cafeína.

**Tabla 3***Preparación de soluciones madre.*

Reactivo	Pureza (%)	Peso (mg)	Concentración		Aforo (µL)
			de solución madre (µg/mL)	Solvente	
Cafeína	99.96%	11.2	6577	H <sub>2</sub> O	1702
Ácido clorogénico	95%	10.1	9994	MeOH	960
Ácido cafeico	98%	10.1	9997	MeOH	990
Ácido p- cumárico	98%	23.3	19994	H <sub>2</sub> O	1142
Ácido gálico	97.80%	20.1	20018	MeOH	983

A partir de la solución madre se preparó la solución de trabajo. Para ello, en un frasco ámbar se colocó una alícuota de cada uno de las disoluciones realizadas, y se aforó con agua, como se detalla en la Tabla 4.

**Tabla 4***Preparación de la solución de trabajo.*

Reactivo	Concentración de solución		
	de trabajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aforo ( $\mu\text{L}$ )	Alícuota ( $\mu\text{L}$ )
Cafeína	1000	1000	160
Ácido clorogénico	500	1000	50
Ácido cafeico	500	1000	50
Ácido p-cumárico	250	1000	12.5
Ácido gálico	1000	1000	50
		Subtotal ( $\mu\text{L}$ )	322.5
		Agua ( $\mu\text{L}$ )	677.5

Al obtener la solución de trabajo se preparó los estándares, en la Tabla 5 se detallan los volúmenes correspondientes. Finalmente se procede a la inyección de estos estándares en el equipo HPLC para su posterior análisis.

**Tabla 5***Preparación de estándares.*

Concentración de estándares ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aforo ( $\mu\text{L}$ )	Alícuota ( $\mu\text{L}$ )	Agua ( $\mu\text{L}$ )
5	1000	5	995
20	1000	20	980
60	1000	60	940
80	1000	80	920
100	1000	100	900
120	1000	120	880

La identificación de los compuestos en los estándares se lleva a cabo de acuerdo a su relación masa carga. Se realizan cuatro inyecciones por repetibilidad, para poder obtener

las curvas de calibración de los estándares se necesitó el área y la concentración, estas curvas de calibración serán lineales con coeficientes de determinación superiores a 0.99. La concentración de cada componente en las muestras de café se calculó utilizando la ecuación de la mejor línea de ajuste trazada con el programa de Microsoft Excel 2010.

### **2.4.3 Precisión**

Se determinó la precisión en condiciones de repetibilidad aplicando el método cromatográfico del trabajo de investigación, se realizó la inyección en el equipo HPLC cuatro veces de los estándares preparados anteriormente, se tomó de ellos las concentraciones de 5, 25, 75 ug/mL. La repetibilidad se evaluó mediante el coeficiente de variación.

### **2.5 Análisis estadístico**

Se realizó en el software estadístico MINITAB 16.0 (EE. UU.) el análisis de los datos experimentales, empleando una metodología de superficie de respuesta (RSM), un análisis de regresión, se evaluaron los coeficientes de regresión a través del análisis de varianza, se determinaron los valores de probabilidad y falta de ajuste.

## Capítulo tres

### Resultados y discusión

En el análisis de compuestos fenólicos, se ha utilizado ampliamente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) junto con espectrometría de masas (MS), debido principalmente a la rapidez de sus resultados y la eficiencia de detección es alta. También, aumenta la productividad al analizar los compuestos deseados, ya que el sistema mejora la relación señal-ruido y minimiza efectos de la matriz de muestra, incluida la supresión de iones (Cheng et al., 2019).

La gran diversidad de compuestos fenólicos, con diferentes polaridades y tamaños que comprenden desde compuestos fenólicos simples como los ácidos fenólicos hasta oligómeros como procianidinas y taninos condensados que se pueden identificar, ha permitido desarrollar importantes técnicas analíticas para la separación, detección e identificación de estructuras fenólicas, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) es una de las más importantes y ha sido una de las pioneras para la determinación de estructuras (Rosa et al., 2019).

#### 3.1 Optimización del gradiente de las fases móviles

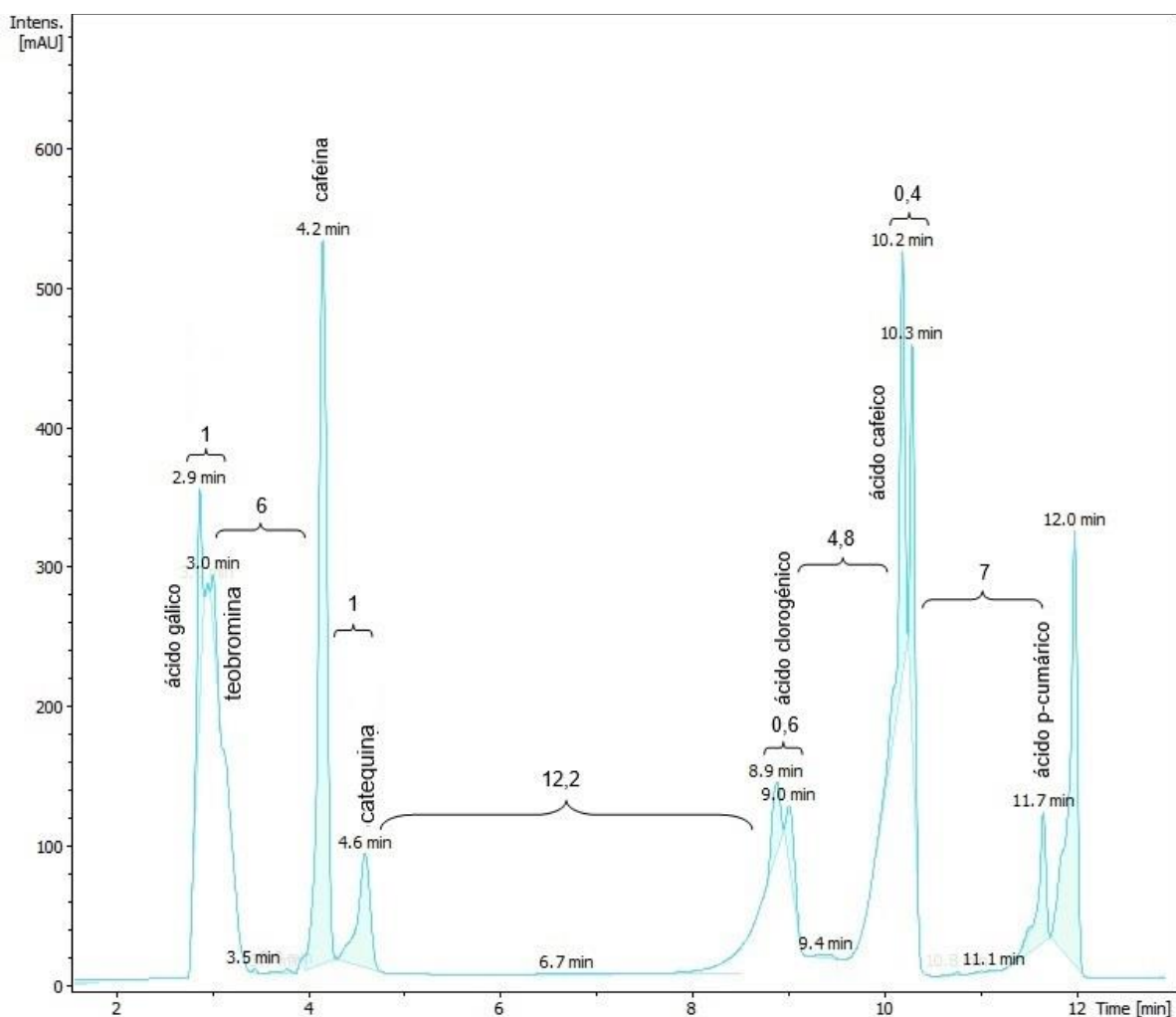
Según Volonté y Quiroga (2013), para poder obtener una resolución óptima se deben cumplir ciertas condiciones en una separación cromatográfica como tiempo de retención, selectividad y eficiencia. El tiempo de retención se mide en minutos, es el tiempo que transcurre desde su inyección en el equipo. En la selectividad los compuestos deben ser retenidos en tiempos diferentes y finalmente la eficiencia, donde los picos cromatográficos deben ser lo suficientemente estrechos y evitando la superposición. Además, nos indica que el valor de una buena resolución debe ser  $\geq 1.5$ .

En la Figura 4, se presenta el primer ensayo realizado con las siguientes condiciones: con un flujo de 0.5 mL/min, el solvente B que es el metanol comienza con un 10% en 0 min, se mantiene en 10% en un tiempo de 3.5 min, sube a un 40% en un tiempo de 10 min, se mantiene en 40% hasta los 14 min y sube finalmente a 100% a los 18 min. Con estas condiciones, en el siguiente cromatograma se evidencia la coelución de dos compuestos

entre el ácido gálico y teobromina presentes en un solo pico cromatográfico, estas condiciones no son las mejores porque además de lo mencionado se observa que para el ácido clorogénico se presenta un pico fragmentado, esto ocurre de igual manera para ácido cafeico y ácido p-cumárico. No hay una buena separación de los compuestos, no tiene una alta selectividad porque no posee un pico definido angosto y un ancho de base pequeña. Además, la resolución no es buena porque debe ser  $\geq 1.5$ .

**Figura 4**

*Ensayo 1.*

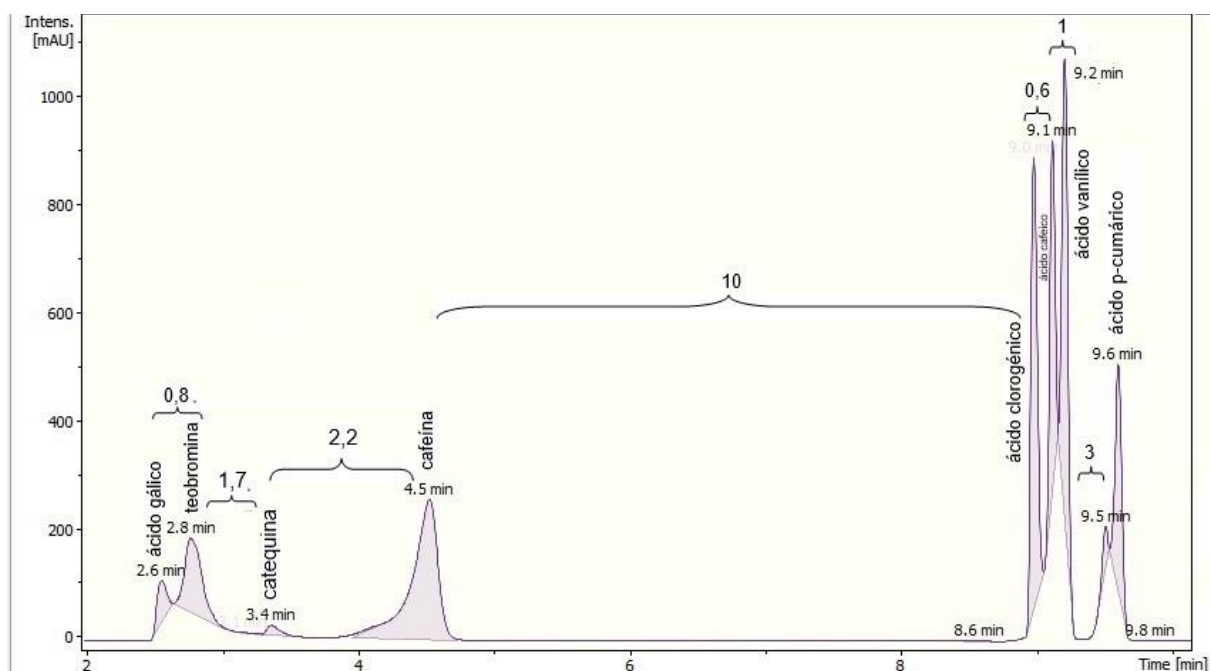


La Figura 5 corresponde al segundo ensayo que se realizó con las siguientes condiciones: con un flujo de 0.6 mL/min, el solvente B que es el metanol comienza con un 5% en 0 min, se mantiene en 5% por 5 min, luego se incrementa hasta un 40% a los 6 min, se

mantiene en 40% a los 12 min y sube finalmente a 80% en 15 min. En este cromatograma se puede apreciar que no son las condiciones adecuadas para tener una buena separación, se evidencia una superposición entre ácido clorogénico con el ácido cafeico y ácido vanílico, dando la apariencia de un solo pico cromatográfico, el ácido p-cumárico presenta un pico fragmentado, debido a esto se decide hacer otro ensayo para poder separarlos y se pueda tener una buena resolución.

**Figura 5**

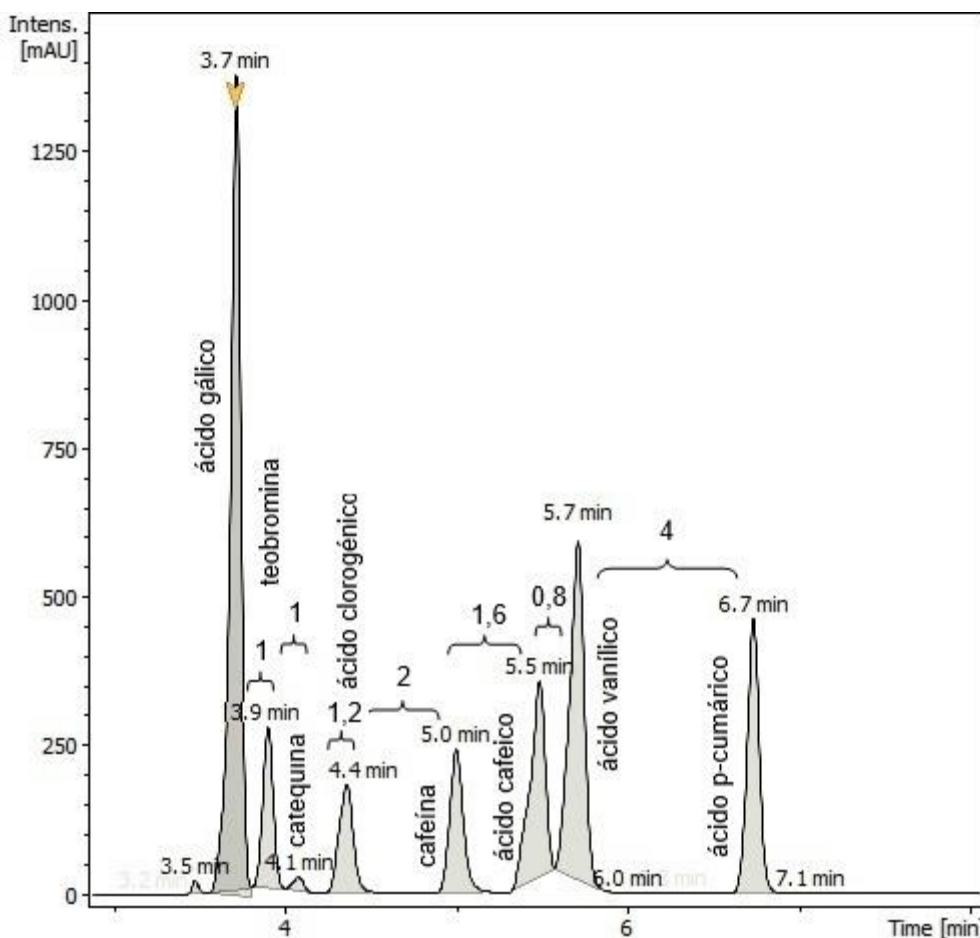
*Ensayo 2.*



La siguiente Figura 6, en el tercer ensayo realizado donde se modificó las condiciones: con un flujo de 0.6 mL/min, el solvente B que es el metanol comienza con un 0% en 0 min, empieza a subir a 40% en un tiempo de 0.5 min, se mantiene en 40% a los 2.5 min, sube a 50% a los 3 min, se mantiene en 50% a los 8 min, sube a 70% a los 9 min, se mantiene en 70% a los 10min para comenzar a descender a 0% a los 12 min y así terminar en 0% a los 25 min. En este ensayo se fue modificando las condiciones para poder lograr una mejor separación y resolución, aquí se puede apreciar una mejor separación de los compuestos, pero hay el inconveniente entre el ácido cafeico y ácido vanílico con una resolución de 0.8, sus bases anchas están unidas y por ende no hay una buena selectividad.

Figura 6

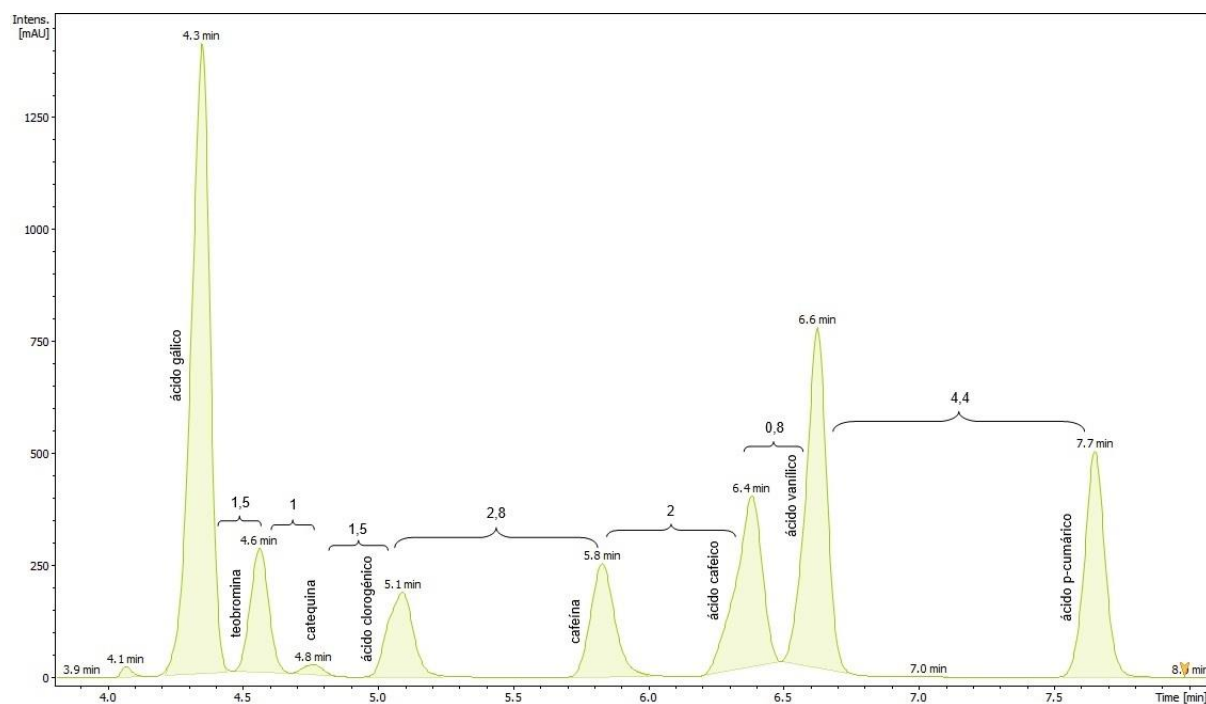
Ensayo 3.



En el cuarto ensayo, Figura 7, después de haber realizado algunos cambios para obtener definitivamente las mejores condiciones de rampa tenemos: con un flujo de 0.5 mL/min, el solvente B que es el metanol comienza con un 0% en 0 min, comienza a subir a 40% en un tiempo de 0.5 min, se mantiene en 40% a los 2.5 min, sube a 50% a los 3 min, se mantiene en 50% a los 8 min, vuelve a subir a 70% a los 9 min, se mantiene en 70% a los 12 min para comenzar a descender a 0% a los 14 min y así terminar en 0% a los 17 min. En esta gráfica se debe resaltar que existe una mejor separación y una buena resolución de los compuestos que en los ensayos realizados con anterioridad, aunque aún no se logra separar definitivamente las bases anchas de los ácidos cafeico y vanílico, como se puede ver tiene una resolución de 0.8.

Figura 7

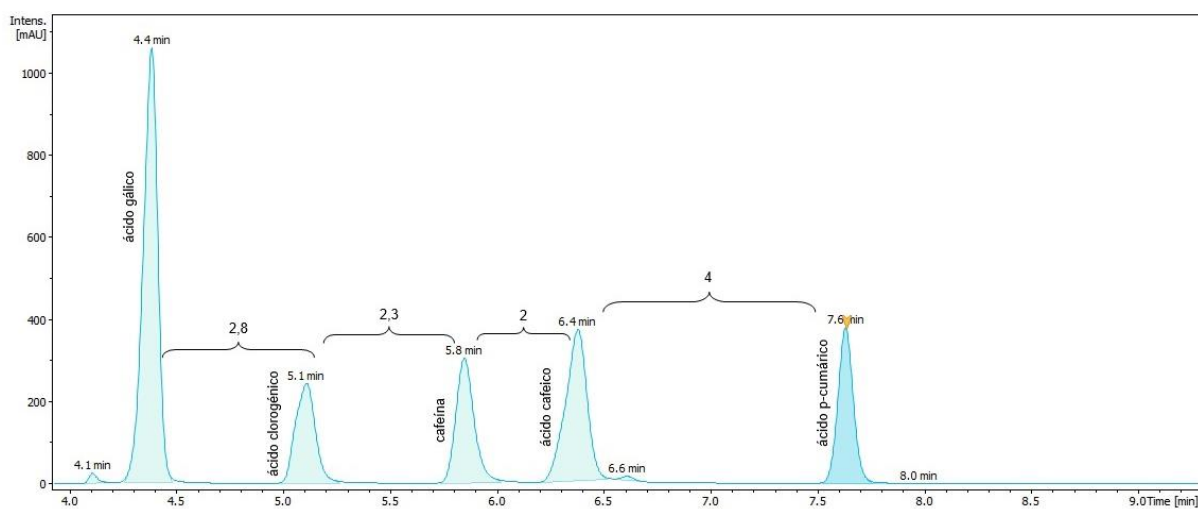
Ensayo 4.



Finalmente, el ensayo 5, Figura 8, con las condiciones del cromatograma antes mencionado, se pudo obtener compuestos que fueron de interés, como el ácido gálico, ácido clorogénico, cafeína, ácido cafeico y ácido p-cumárico, evidenciando una separación y una buena resolución de picos cromatográficos.

Figura 8

Ensayo 5.



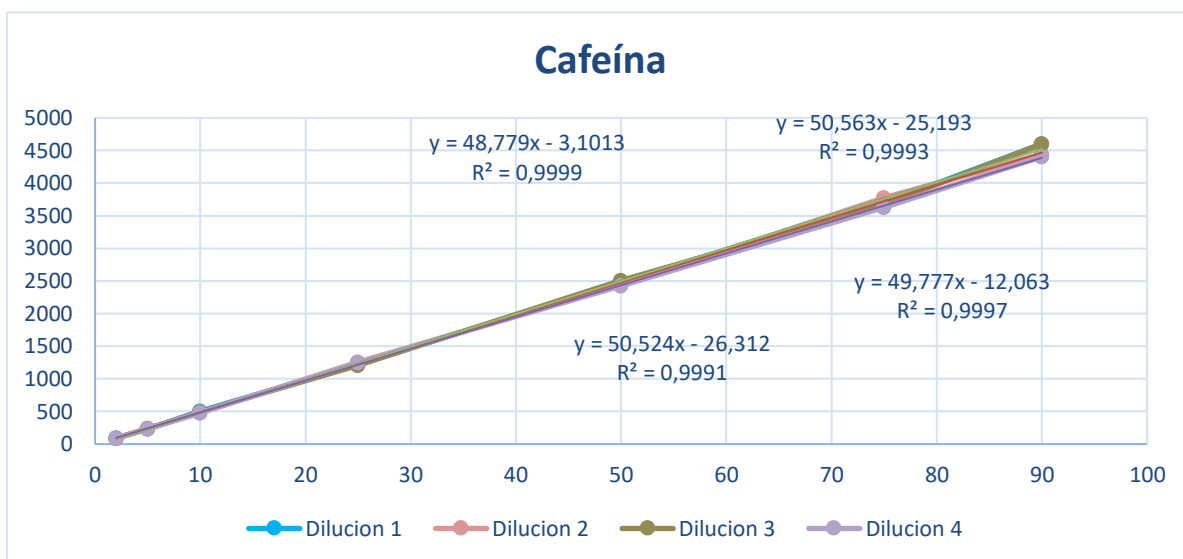
### 3.2 Linealidad del método

La linealidad para Kruve, Rebane, Kipper, Oldekop, Evard, Herodes, Leito (2015) es definida como la capacidad del método para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra y se construye un gráfico de calibración para verificar la linealidad de los resultados. En cuanto a la comprobación de la linealidad de un método, es necesario señalar los parámetros de coeficiente de correlación (R) o coeficiente de determinación ( $R^2$ ) donde deben ser  $\geq 0.99$  así lo menciona Gumustas, Kurbanoglu, Uslu, Ozkan (2013). Los coeficientes  $R^2$  con valores cercanos a 1, hacen alusión que los modelos utilizados pueden servir para predecir las variables de respuesta, según Gómez, Ortiz, Gallego, Echeverri (2021).

En el presente estudio se encontró un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para la cafeína con una media de 0.9995 con una desviación estándar de 0.000365 y un coeficiente de variación de 0.036533%, pudo darse tras probar cuatro diferentes concentraciones del analito, esta información se puede evidenciar en la siguiente Figura 9. En una investigación realizada por Russo, Dugo, Fanali, Dugo, Zoccali, Mondello y De Gara (2018) se obtuvieron valores ( $R^2$ ) de 0.998 que es un valor muy similar al obtenido en este trabajo, por otra parte, en otro estudio realizado por Pokhrel, Shrestha, Rijal, Rai (2016) indicaron un valor de 0.9928, este valor sigue siendo inferior e indicándonos que es superior al que se obtuvo en el presente trabajo.

Figura 9

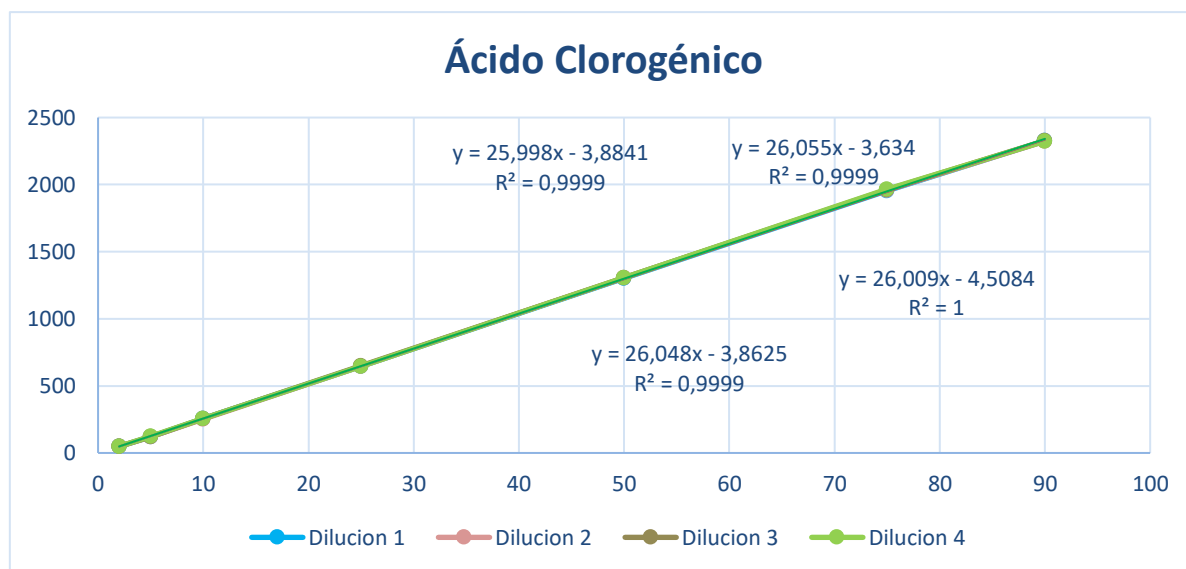
Curva de calibración de cafeína.



En el caso del ácido clorogénico, los valores de  $R^2$  que se obtuvieron fueron: una media de 0.9999 con una desviación estándar de  $5^{-0,5}$  y un coeficiente de variación de 5.0%, para el cual se estableció el gráfico que se evidencia con la Figura 10, en donde se detalla su linealidad. Ramón, Gómez, Rosales, León, Madrid (2019) en su estudio sobre identificación y cuantificación de polifenoles detallan que el  $R^2$  calculado, alcanzó un valor de 0.992, mientras que en un estudio análogo realizado por Mendes, Pereira, Arantes, Glória, Nunes, Passos, Oliveira (2020) se determinó un valor de 0.9937; valores que nos indican que en ambas investigaciones los datos obtenidos son inferiores al que se obtuvo en el presente estudio.

Figura 10

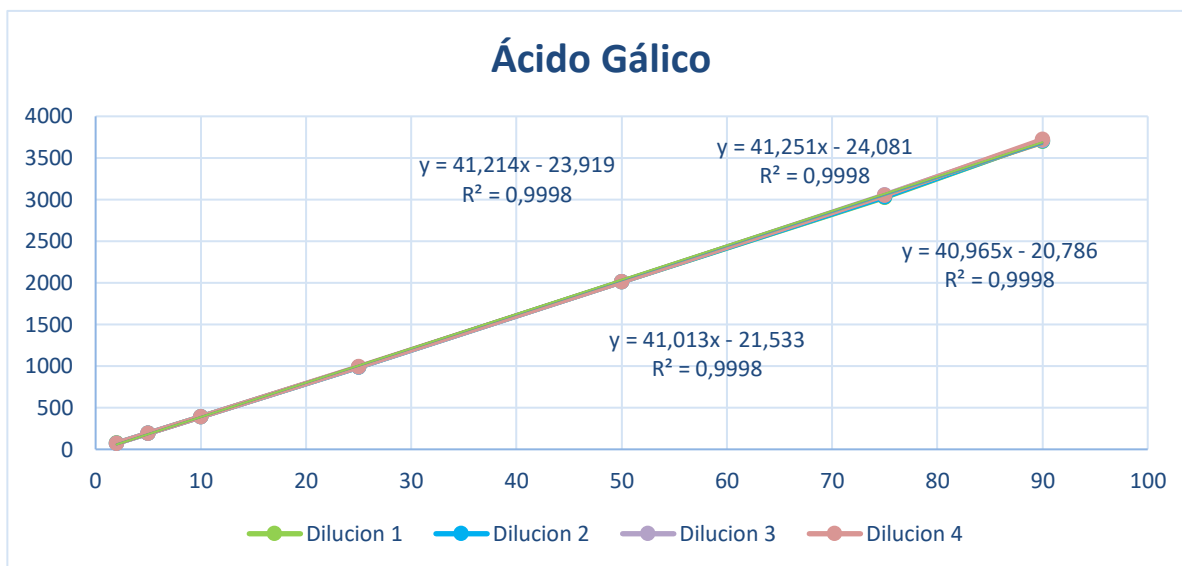
Curva de calibración de ácido clorogénico.



Referente al análisis del ácido gálico, en  $R^2$  se obtuvo como media un valor de 0.9998 con una desviación estándar de 0 y un coeficiente de variación de 0%, compuesto que tiene una buena linealidad, pudiéndosela observar en la Figura 11. Según el estudio que llevó a cabo Ramón, Gómez, Rosales, León, Madrid (2019) el ácido gálico en  $R^2$  tiene un valor de 0.988, mientras que en la investigación desarrollada por Arabi, Ghaedi, Ostovan (2017) su  $R^2 = 0.986$  y en el análisis realizado por Kardani, Gurav, Solanki, Patel, Patel (2013) se cuantificaron valores de 0.9994. De los tres estudios anteriormente en mención, se puede observar la varianza en cuanto al trabajo presentado, estos resultan inferiores al valor que se obtuvo en la presente.

Figura 11

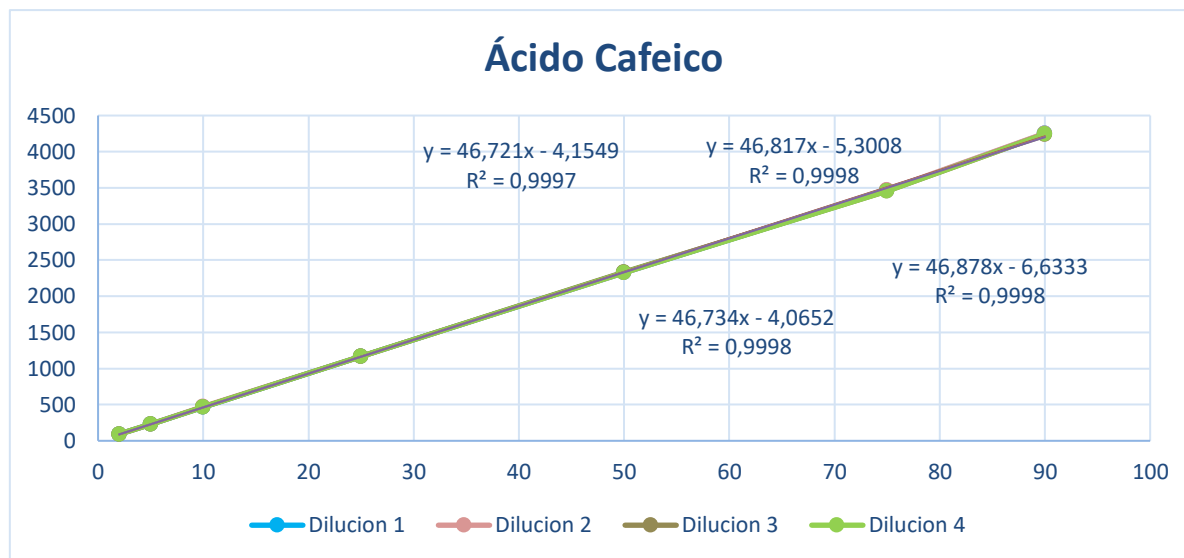
Curva de calibración de ácido gálico.



Por otro lado, al revisar los valores obtenidos en la media para ácido cafeico es 0.9997 con una desviación estándar de  $5^{-0.5}$  y un coeficiente de variación de 5.0%, al compararlo con la linealidad presentada en el estudio de Cao, Liu, Cheng, Gao, Wang, Zheng (2011) se contempla una pequeña diferencia con 0.9995, este valor se aproxima al trabajo expuesto, sin embargo, ya que el presente trabajo al tener un  $R^2$  mayor presenta una mejor linealidad, tal y como se puede ver en la Figura 12. En un estudio realizado por Chaowuttikul, Palanuvej, Ruangrunsi (2020) el  $R^2$  del ácido cafeico tiene un valor de 1, valor superior al obtenido en el presente estudio, en este caso los valores obtenidos se encuentran ligeramente por debajo, aunque se mantiene dentro del rango de aceptación para el mismo.

Figura 12

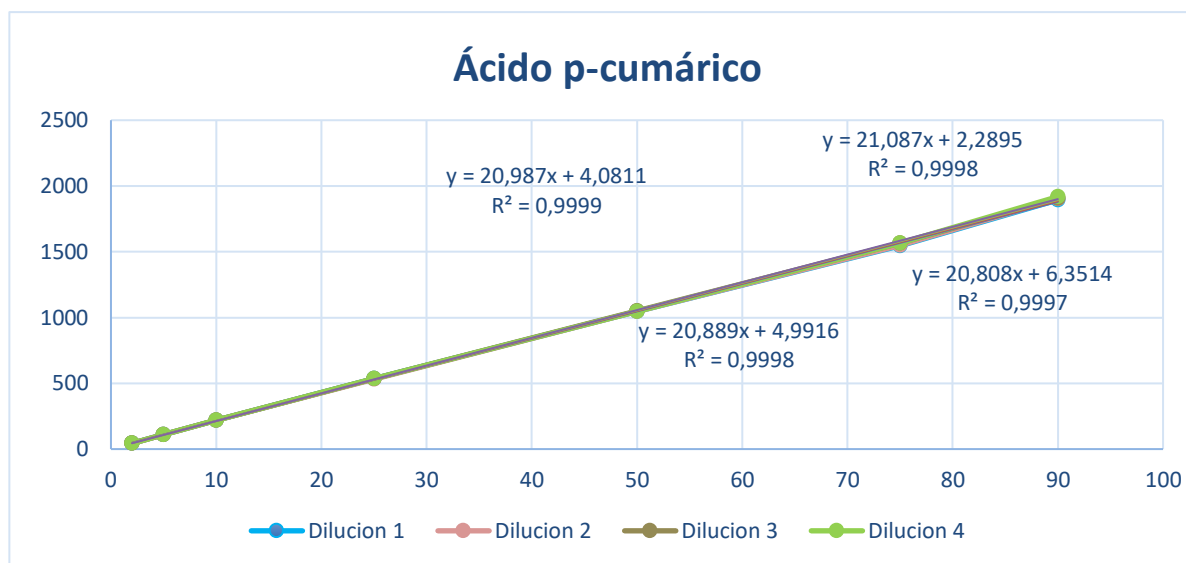
Curva de calibración de ácido cafeico.



El ácido p-cumárico presenta un valor de media 0.9998 con una desviación estándar de  $8.1^{-0.5}$  y un coeficiente de variación 0.008166% los resultados exhibieron una buena linealidad que se puede visualizar en la Figura 13. El valor en la investigación de Ramón, Gómez, Rosales, León, Madrid (2019) para este parámetro es de 0.984, según el estudio de Karthikeyan, Devadasu y Srinivasa (2015) señalan un valor de 0.9991; en comparación con los estudios en mención ambos valores son inferiores comparados con el obtenido en este trabajo.

Figura 13

Curva de calibración de ácido p-cumárico



### 3.3 Precisión

La precisión del presente trabajo se evaluó inyectando los estándares preparados anteriormente, en cuatro repeticiones, arrojando los siguientes coeficientes de variación que se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6

Concentraciones y coeficientes de variación de los diferentes compuestos.

C (µg/mL)	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	Ácido gálico	Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Cafeína	Ácido p-cumárico
5	0.1333109	0.3230938	0.1528546	2.0855957	0.1390501
25	0.2483018	0.2546882	0.0931918	1.6844581	0.2284449
75	0.5415721	0.2859951	0.1879224	1.6367277	0.6406087

Santos, Alkmim, Silva, Mendes, Correa, Dibai (2013), definen la precisión como el grado de concordancia entre las indicaciones o medidas obtenidas mediante medidas

repetidas en el mismo o similares objetos, bajo condiciones específicas. Los estudios de precisión evalúan la dispersión de los resultados de pruebas independientes y repetidas de la misma muestra, similares o soluciones analíticas de referencia analizadas en condiciones definidas. La precisión se puede expresar numéricamente como la desviación estándar relativa (RSD%) o coeficiente de variación (CV%). Para Krueve, Rebane, Kipper, Oldekop, Evard, Herodes, Ravio, Leito (2015), la precisión describe el grado de concordancia entre los valores obtenidos al repetir mediciones en objetos iguales o similares bajo ciertas condiciones específicas. Además, indica que existe criterios de aceptación dentro de un 15% de coeficiente de variación, aunque no siempre será fácil, ya que debe adaptarse a una aplicación específica donde los métodos deben ser adecuados para el propósito.

Los valores de los coeficientes de variación obtenidos en este trabajo de investigación son inferiores al 15%, podemos decir que se encuentra dentro del criterio de aceptación que se menciona anteriormente.

### **3.4 Análisis estadístico**

#### ***3.4.1 Optimización mediante metodología de superficie de respuesta***

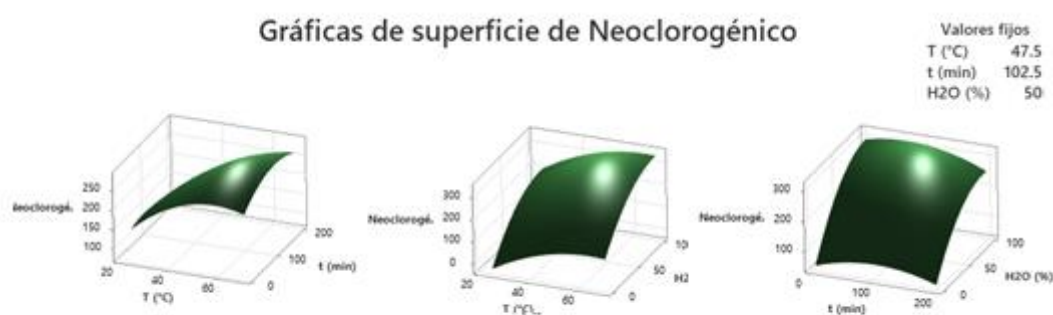
La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que se utilizan para desarrollar, mejorar y optimizar procesos en los que la respuesta de interés se ve afectada por múltiples variables, con el objetivo de optimizar la respuesta (Getachew & Chun, 2016). En el presente trabajo de investigación se empleó el diseño experimental Box-Behnken, usando el software MINITAB 16.0, ocupando tres niveles alta, central, baja (1, 0, -1) para cada una de las variables independientes (temperatura, tiempo y concentración de H<sub>2</sub>O), y la variable dependiente o de respuesta, fue la concentración de cafeína, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico. De un total de 15 experimentos se analizaron los valores para cada uno de ellos, usando el diseño experimental Box-Behnken. Se generaron gráficas de superficies de respuesta entre 'temperatura frente a tiempo', 'temperatura frente a concentración de agua' y 'tiempo frente a concentración de

agua' versus la concentración de ácido neoclorogénico (Figura 14), ácido clorogénico (Figura 15) y cafeína (Figura 16).

En la Figura 14 expuesta se observa la influencia de las variables de extracción en cuanto al contenido de ácido neoclorogénico, por medio de RSM. La gráfica nos indica que hay un incremento de ácido neoclorogénico cuando interactúan la temperatura versus concentración de agua. Al-Dhabi, Ponmurugan, Jenathan (2017) en su investigación de Desarrollo y validación de la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de residuos de café molido, emplean una temperatura de 30 - 50 °C afirmando que la temperatura es un factor clave en la extracción de estos isómeros de ácidos clorogénicos, porque una temperatura más alta puede aumentar el rendimiento de la extracción o a su vez promover la degradación de algunos compuestos.

**Figura 14**

*Gráfica de superficie de respuesta de ácido neoclorogénico.*

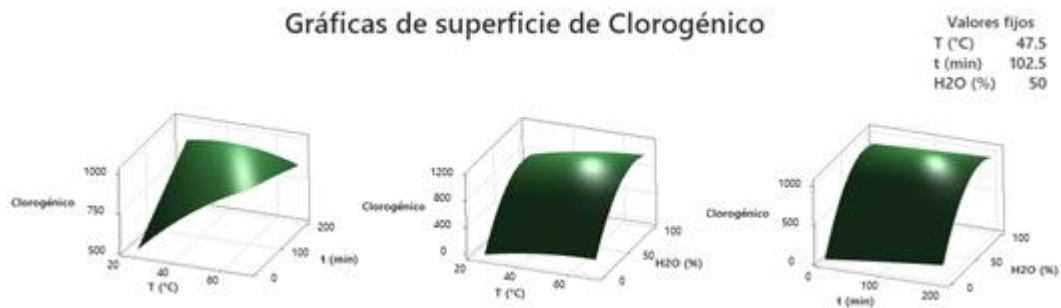


En la Figura 15, se puede observar que hay un incremento de ácido clorogénico en la interacción de la temperatura y la concentración de agua en el disolvente, se evidencia la relevancia de la temperatura. Upadhyay, Ramalakshmi y Rao (2012) en su trabajo de extracción asistida por microondas de ácidos clorogénicos de granos de café verde, comentaron que las condiciones óptimas de extracción empleadas son a una temperatura de 50 °C y agua como solvente de elección. Wianowska y Gil (2019) en su investigación de Avances recientes en procedimientos de extracción y análisis de ácidos clorogénicos

naturales, menciona que los ácidos clorogénicos al estar expuestos a temperatura muy elevadas, en presencia de agua se pueden degradar con mayor facilidad ya que los ácidos clorogénicos son inestables químicamente.

**Figura 15**

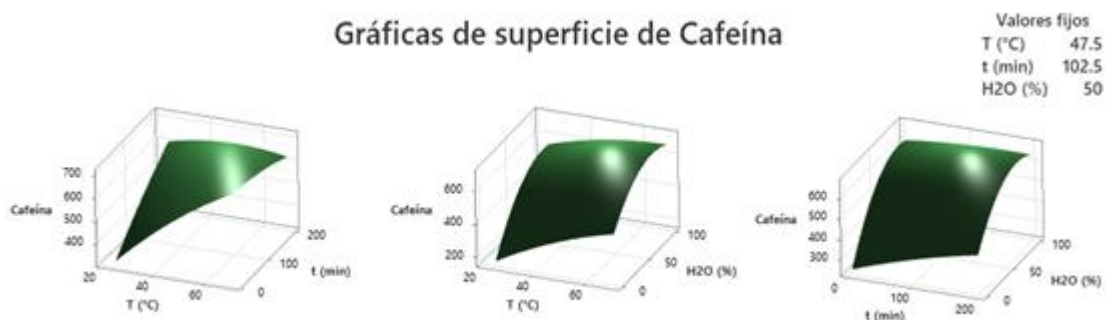
*Gráfica de superficie de respuesta de ácido clorogénico.*



En la Figura 16 hay un incremento de cafeína al interactuar la temperatura, el tiempo, concentración de agua. Para Córdoba, Alduenda, Moreno, Ruíz (2020) las temperaturas más altas conducen a una mayor degradación y una mayor liberación de compuestos volátiles y el tiempo de interacción entre el agua y el café molido tostado (tiempo de extracción) es un factor clave para la extracción de compuestos relacionados con el sabor y la calidad del café.

**Figura 16**

*Gráfica de superficie de respuesta de cafeína.*



### 3.4.2 Ecuación de regresión

Una vez obtenidas las respuestas del Box- Behnken, se utilizó tres ecuaciones de regresión, para neoclorogénico, clorogénico y cafeína, estas poseen una función polinomial de segundo orden basada en una metodología de superficie de respuesta (RSM). En el presente trabajo de investigación tenemos los coeficientes de determinación (R2) 89.73%, 95.11%, 92.39%, valores que son aceptables así lo menciona Ramón, Gómez, Rosales, León, Madrid (2019), para mostrar la confiabilidad de las ecuaciones los coeficientes de determinación (R2) están entre 0.720 y 0.999.

#### *Neoclorogénico*

$$\begin{aligned}
 &= -224 + 9.74 T (\text{°C}) + 0.21 t (\text{min}) + 4.81 H2O (\%) - 0.0856 T (\text{°C}) * T (\text{°C}) \\
 &- 0.00367 t (\text{min}) * t (\text{min}) - 0.0248 H2O (\%) * H2O (\%) \\
 &+ 0.0112 T (\text{°C}) * t (\text{min}) + 0.0033 T (\text{°C}) * H2O (\%) \\
 &- 0.00214 t (\text{min}) * H2O (\%)
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Clorogénico} &= -658 + 19.2 T (\text{°C}) + 3.78 t (\text{min}) + 21.55 H2O (\%) - 0.094 T (\text{°C}) * T (\text{°C}) \\
 &- 0.00051 t (\text{min}) * t (\text{min}) - 0.1372 H2O (\%) * H2O (\%) \\
 &- 0.0601 T (\text{°C}) * t (\text{min}) + 0.0130 T (\text{°C}) * H2O (\%) - 0.0050 t (\text{min}) * H2O (\%)
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Cafeína} &= -386 + 15.99 T (\text{°C}) + 3.10 t (\text{min}) + 10.06 H2O (\%) - 0.0584 T (\text{°C}) * T (\text{°C}) \\
 &- 0.00139 t (\text{min}) * t (\text{min}) - 0.0470 H2O (\%) * H2O (\%) \\
 &- 0.0410 T (\text{°C}) * t (\text{min}) - 0.0367 T (\text{°C}) * H2O (\%) \\
 &- 0.00717 t (\text{min}) * H2O (\%)
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

### 3.4.3 Análisis de varianza

En la presente investigación se realizaron análisis de varianza utilizando el software Minitab 16.0, para evaluar la significación estadística. Los datos experimentales se analizaron con varios análisis estadísticos descriptivos, como el valor de p, falta de ajuste, con el fin de evaluar la significancia estadística del modelo desarrollado.

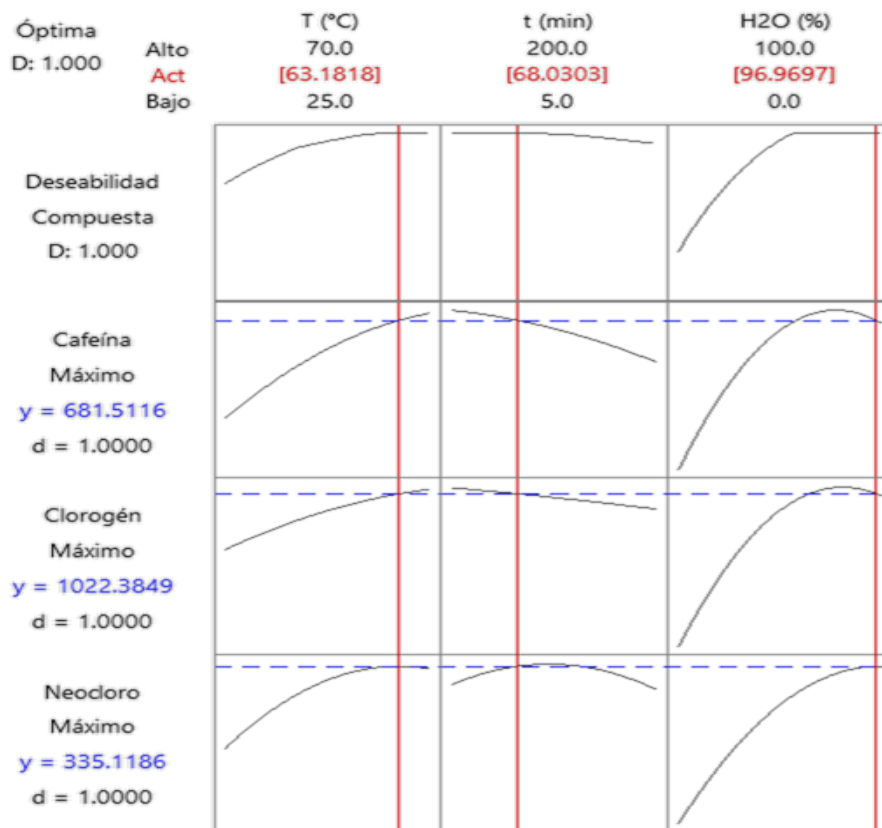
En la Tabla 7, incluida en el apéndice A, se muestran los valores de los parámetros que se ajustan a los datos experimentales correspondiente al ácido neoclorogénico. En la Tabla 8, apéndice B se detallan los valores de ácido clorogénico; y finalmente en la Tabla 9, apéndice C se evidencia los valores para cafeína. Todos los valores de  $p$  son menores a 0.05 ( $p < 0.05$ ), con una falta de ajuste superior a 0.05 ( $p > 0.05$ ). En la investigación de Buratti, Barbanera, Lascaro, Cotana (2018) menciona que  $p$ -valor es significativo cuando es menor a 0.05 y para aceptar el modelo se debe verificar mediante la falta de ajuste con valor de  $p$  superior a 0.05, lo que confirma que los modelos de esta investigación son estadísticamente significativos.

#### **3.4.4 Optimización de extracción**

A medida que aumenta la cantidad de agua y la temperatura se eleva, la obtención del ácido clorogénico, ácido neoclorogénico y cafeína, se dilucida en una extracción total, tal y como se observa en la Figura 17 que se encuentra a continuación. En este trabajo de investigación los valores obtenidos en la optimización de extracción para cafeína, ácido neoclorogénico y ácido clorogénico son: temperatura de 63 °C, un tiempo de extracción de 68 min y un porcentaje de H<sub>2</sub>O de 97%.

Figura 17

Gráfica de optimización de variables.



Según el estudio de Upadhyay, Ramalakshmi y Rao (2012) en su trabajo de ciencia Extracción asistida por microondas de ácidos clorogénicos de granos de café verde, el solvente de elección para ácido clorogénico y cafeína es el agua, al tener un mayor rendimiento de extracción al ser comparado con otros como etanol y metanol, el agua tiene una polaridad y una constante dieléctrica más alta que el alcohol, además nos indica que para que se dé la extractibilidad del solvente va depender de la solubilidad de cada compuesto.

### **Conclusiones**

Se logró desarrollar un método que permite separar compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y alcaloides como la cafeína. Además, se obtuvo una buena linealidad con un coeficiente de determinación  $R^2 \geq 0.99$ , para ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y cafeína. La precisión en condiciones de repetibilidad para los compuestos mencionados es adecuada con un coeficiente de variación inferior al 15%. Finalmente, se optimizó el método de extracción de cafeína, ácido neoclorogénico y ácido clorogénico a partir de café tostado, alcanzó los mejores resultados con una temperatura de 63 °C, tiempo de extracción de 68 min y como solvente una mezcla de etanol agua con una relación de 4:96.

## Recomendaciones

Para futuros trabajos de investigación se recomienda, separar y cuantificar los compuestos polifenólicos 3,4-dicafeoilquínicos, 3,5- dicafeoilquinicos y 4,5 dicafeoilquinicos isómeros presentes del ácido cafeico y ácido ferúlico que son de gran relevancia y están presentes en el café, pero que no se pudieron incluir en este estudio, debido a la no disponibilidad de los estándares respectivos de estos analitos. Además, con los métodos de extracción y análisis desarrollados en este trabajo, se recomienda hacer estudios sobre el efecto del proceso de fermentación sobre la concentración de compuestos polifenólicos y cafeína.

## Referencias

- Affonso, R. C. L., Voytena, A. P. L., Fanan, S., Pitz, H., Coelho, D. S., Horstmann, A. L., . . . Varela, L. A. C. (2016). Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica* L.) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Agrahari, V., Bajpai, M., & Nanda, S. (2013). Essential concepts of mobile phase selection for reversed phase HPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6(5), 459-464.
- Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 206-213.
- Arabi, M., Ghaedi, M., & Ostovan, A. (2017). Synthesis and application of in-situ molecularly imprinted silica monolithic in pipette-tip solid-phase microextraction for the separation and determination of gallic acid in orange juice samples. *Journal of chromatography B*, 1048, 102-110.
- Buratti, C., Barbanera, M., Lascaro, E., & Cotana, F. (2018). Optimization of torrefaction conditions of coffee industry residues using desirability function approach. *Waste management*, 73, 523-534.
- Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2011). Coffee and its consumption: benefits and risks. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 363-373.
- Cao, W., Liu, H.-F., Cheng, N., Gao, H., Wang, B.-N., & Zheng, J.-B. (2011). LC with electrochemical detection for analysis of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester in propolis. *Chromatographia*, 73(3-4), 411-414.
- Capa, D., Pérez, J., & Masaguer, A. (2015). Unsustainability of recommended fertilization rates for coffee monoculture due to high N<sub>2</sub>O emissions. *Agronomy for sustainable development*, 35(4), 1551-1559.
- Chaowuttikul, C., Palanuvej, C., & Ruangrunsi, N. (2020). Quantification of chlorogenic acid, rosmarinic acid, and caffeic acid contents in selected Thai medicinal plants using RP-HPLC-DAD. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56.

- Cheng, I. C. C., Li, R. K., Leung, G. P. H., Li, S. L., Kong, M., Lao, L. X., . . . Rong, J. H. (2019). Application of UPLC-MS/MS to simultaneously detect four bioactive compounds in the tumour-shrinking decoction (FM1523) for uterine fibroids treatment. *Phytochemical Analysis*, 30(4), 447-455.
- Chrysant, S. G. (2015). Coffee consumption and cardiovascular health. In: Elsevier.
- Colombo, R., & Papetti, A. (2020). An outlook on the role of decaffeinated coffee in neurodegenerative diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(5), 760-779.
- Cordoba, N., Fernandez-Alduenda, M., Moreno, F. L., & Ruiz, Y. (2020). Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 45-60.
- Crónica. (2020). *Loja obtuvo el primer y segundo lugar de la Taza Dorada 2020*. <https://cronica.com.ec/2020/10/24/loja-obtuvo-el-primer-y-segundo-lugar-de-la-taza-dorada-2020/>
- de Elguea-Culebras, G. O., Bravo, E. M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market—A review. *Industrial Crops and Products*, 175, 114261.
- Díaz, A. L., & Perdomo, A. M. (2015). Caracterización físico-química y sensorial de dos variedades de café (*Coffea arabica*) del occidente de Honduras.
- Dokli, I., Navarini, L., & Hameršak, Z. (2013). Syntheses of 3-, 4-, and 5-O-feruloylquinic acids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 24(13-14), 785-790.
- Ferreira, P. S., Victorelli, F. D., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2019). A review of analytical methods for p-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. *Critical reviews in analytical chemistry*, 49(1), 21-31.
- Ferruzzi, M. G. (2010). The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & behavior*, 100(1), 33-41.

- Frost, N. J., & Logomarsino, J. V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 819-830.
- Gagliardini, E., Benigni, A., & Perico, N. (2017). Pharmacological induction of kidney regeneration. In *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration* (pp. 1025-1037). Elsevier.
- Getachew, A. T., & Chun, B.-S. (2016). Optimization of coffee oil flavor encapsulation using response surface methodology. *LWT*, 70, 126-134.
- Gini, T., & Jeya Jothi, G. (2018). Column chromatography and HPLC analysis of phenolic compounds in the fractions of *Salvinia molesta mitchell*. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 197-203.
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76(21), 1365-1427.
- Gutiérrez, A. L., Berti, F., Navarini, L., Monteiro, A., Resmini, M., & Forzato, C. (2017). Synthesis of p-coumaroylquinic acids and analysis of their interconversion. *Tetrahedron: Asymmetry*, 28(3), 419-427.
- Gómez, C. R., Ortiz, A., Gallego, C., & Echeverri, L. F. (2021). Validación de curvas de calibración por NIRS para la predicción de compuestos químicos de café almendra. *Revista Cenicafé*, 72(2), e72204-e72204.
- Hao, D. C., Gu, X., Xiao, P., & Hao, D. (2015). Phytochemical and biological research of *Salvia medicinal resources*. *Medicinal plants*, 14, 587-639.
- Jaiswal, R., Matei, M. F., Subedi, P., & Kuhnert, N. (2014). Does roasted coffee contain chlorogenic acid lactones or/and cinnamoylshikimate esters? *Food research international*, 61, 214-227.
- Jeon, J.-S., Kim, H.-T., Jeong, I.-H., Hong, S.-R., Oh, M.-S., Park, K.-H., . . . Abd El-Aty, A. M. (2017). Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *Journal of Chromatography B*, 1064, 115-123.

- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grześkowiak, A., & Grześkowiak, T. (2015). Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research and Technology*, 240(1), 19-31.
- Jiménez, A., & Massa, P. (2015). Producción de café y variables climáticas: El caso de Espíndola, Ecuador. *Economía*, 40(40), 117-137.
- Jácome, A. R., & Garrido, A. (2017). A Real Option Analysis applied to the production of Arabica and Robusta Coffee in Ecuador. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), e0104.
- Kardani, K., Gurav, N., Solanki, B., Patel, P., & Patel, B. (2013). RP-HPLC method development and validation of gallic acid in polyherbal tablet formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(5), 37.
- Karthikeyan, R., Devadasu, C., & Srinivasa Babu, P. (2015). Isolation, characterization, and RP-HPLC estimation of P-coumaric acid from methanolic extract of durva grass (*Cynodon dactylon* Linn.)(Pers.). *International journal of analytical chemistry*, 2015.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kim, D., & Han, G. D. (2014). Fermented rice bran attenuates oxidative stress. In *Wheat and rice in disease prevention and health* (pp. 467-480). Elsevier.
- Kraehenbuehl, K., Page-Zoerkler, N., Mauroux, O., Gartenmann, K., Blank, I., & Bel-Rhliid, R. (2017). Selective enzymatic hydrolysis of chlorogenic acid lactones in a model system and in a coffee extract. Application to reduction of coffee bitterness. *Food chemistry*, 218, 9-14.
- Krishnan, S. (2017). Sustainable coffee production. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*.
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., . . . Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica chimica acta*, 870, 8-28.

- Leyva, B. G., Armas, M. T. D., Cabodevilla, R. C. V., & Cruz, M. A. M. (2021). Efectos del consumo de café sobre la salud. *Medisur*, 19(3), 492-502.
- Loaiza-Campiño, I., Villegas-Hincapié, A., Arana, V., & Posada, H. (2020). Characterization of chlorogenic acids (CGA) and nine isomers in an F2 population derived from *Coffea arabica* L. *Agronomía Colombiana*, 38(1), 19-28.
- Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. (2018). Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In *Modern Techniques for Food Authentication* (pp. 459-526). Elsevier.
- Läderach, P., Ramirez-Villegas, J., Navarro-Racines, C., Zelaya, C., Martinez-Valle, A., & Jarvis, A. (2017). Climate change adaptation of coffee production in space and time. *Climatic Change*, 141(1), 47-62.
- Matei, V., Comănescu, I., & Borcea, A.-F. (2012). *Stationary phases*. IntechOpen.
- Mendes, N. S., Pereira, S. M., Arantes, M. B., Glória, L. L., Nunes, C. R., Passos, M. d. S., . . . Oliveira, D. B. (2020). Bioanalytical method validation for the quantification of the chlorogenic acid in *Capsicum baccatum* through High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD). *Food chemistry*, 325, 126929.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013.
- Mesa, N. Y., Medrano, J., Martínez, M. L., Grave de Peralta, M., & Cabrera, Y. (2017). Efecto anticariogénico del café. *Correo Científico Médico*, 21(3), 888-898.
- Mesas, A. E., Leon-Muñoz, L. M., Rodriguez-Artalejo, F., & Lopez-Garcia, E. (2011). The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 94(4), 1113-1126.
- Monente, C., Ludwig, I. A., Irigoyen, A., De Peña, M.-P., & Cid, C. (2015). Assessment of total (free and bound) phenolic compounds in spent coffee extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(17), 4327-4334.

- Montagnana, M., Favaloro, E. J., & Lippi, G. (2012). Coffee intake and cardiovascular disease: virtue does not take center stage. *Seminars in thrombosis and hemostasis*,
- Morisco, F., Lembo, V., Mazzone, G., Camera, S., & Caporaso, N. (2014). Coffee and liver health. *Journal of clinical gastroenterology*, *48*, S87-S90.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(3), 897-903.
- Münchow, M., Alstrup, J., Steen, I., & Giacalone, D. (2020). Roasting conditions and coffee flavor: A multi-study empirical investigation. *Beverages*, *6*(2), 29.
- Natella, F., & Scaccini, C. (2012). Role of coffee in modulation of diabetes risk. *Nutrition reviews*, *70*(4), 207-217.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., . . . Modarresi-Ghazani, F. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 67-74.
- Nesterenko, P. N., & Palamareva, M. D. (2019). Liquid chromatography| Principles. In *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 231-237).
- O'Keefe, J. H., Bhatti, S. K., Patil, H. R., DiNicolantonio, J. J., Lucan, S. C., & Lavie, C. J. (2013). Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*, *62*(12), 1043-1051.
- Patil, M. P. N. (2017). HPLC Method Development—A Review. *Journal of Pharmaceutical Research and Education*, *1*(2), 243-260.
- Pokhrel, P., Shrestha, S., Rijal, S. K., & Rai, K. P. (2016). A simple HPLC Method for the Determination of Caffeine Content in Tea and Coffee. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, *9*, 74-78.
- Ponce Vaca, L. A., Acuña Velázquez, I. R., Proaño Ponce, W. P., & Orellana Suárez, K. D. (2018). El sistema agroforestal cafetalero. Su importancia para la seguridad

- agroalimentaria y nutricional en Ecuador. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 6(1), 116-129.
- Ponce Vaca, L. A., Orellana Suarez, K. D., Acuña Velásquez, I. R., Alfonso Alemán, J. L., & Fuentes Figueroa, T. (2018). Situación de la caficultura ecuatoriana: perspectivas. *Revista Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina*, 6(1), 307-325.
- Poole, R., Kennedy, O. J., Roderick, P., Fallowfield, J. A., Hayes, P. C., & Parkes, J. (2017). Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *bmj*, 359.
- Puertas, M., Villegas, P., & Rojano, B. (2013). Borra de café colombiano (*Coffea arabica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres in vitro. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 469-478.
- Ramírez-Aristizabal, L., Ortiz, A., & Ospina-Ocampo, L. (2016). Determinación de compuestos fenólicos (catequinas, cafeína, ácidos orgánicos) en té verde (*camellia sinensis*) usando cromatografía líquida de alta resolución/Determination of phenolic compounds (catechins, caffeine, organic acid) of green tea (*camellia sinensis*) using high performance liquid chromatography resolution. *Vitae*, 23, S245.
- Ramírez Prada, D. M. (2010). Café, cafeína vs. salud revisión de los efectos del consumo de café en la salud. *Universidad y Salud*, 12(1), 156-167.
- Ramón-Gonçalves, M., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M., & Madrid, Y. (2019). Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. In (Vol. 96).
- Reuhs, B. L. (2017). High-performance liquid chromatography. In *Food analysis* (pp. 213-226). Springer.
- Rikolto. (2019). *Taza Dorada: Abriendo nuevos mercados*. <https://latinoamerica.rikolto.org/es/noticias/taza-dorada-abriendo-nuevos-mercados>
- Rojas, D. E. (2019). La ruta agroturística del café en Loja. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 4(8), 3-22.

- Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E., & García-Fajardo, J. A. (2019). Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22.
- Rostagno, M. A., Celeghini, R. M., Debien, I. C., Nogueira, G. C., & Meireles, M. A. A. (2015). Phenolic compounds in coffee compared to other beverages. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 137-142). Elsevier.
- Rucci, S., Bonuccelli, A., Angelini, F., Negro, M., & Marzatico, F. (2011). Caffeina: alleata o nemica. *Rivista della Società Italiana di Medicina Generale [revista en internet]*, 5.
- Russo, M., Dugo, P., Fanali, C., Dugo, L., Zoccali, M., Mondello, L., & De Gara, L. (2018). Use of an online extraction technique coupled to liquid chromatography for determination of caffeine in coffee, tea, and cocoa. *Food analytical methods*, 11(10), 2637-2644.
- Rúas Araújo, J., Puentes Rivera, I., & Crespo Pereira, V. (2016). Neurociencias aplicadas a la comunicación política: Análisis de carteles electorales con Eye-Tracking. De los medios y la comunicación de las organizaciones a las redes de valor,
- Samoggia, A., & Riedel, B. (2019). Consumers' perceptions of coffee health benefits and motives for coffee consumption and purchasing. *Nutrients*, 11(3), 653.
- Santos, J. C. F., Alkmim Filho, J. F. d., Silva, D. V. R. d., Mendes, L. C., Corrêa, J. A., & Dibai, W. L. S. (2013). Avaliação da precisão e aplicação de método para determinação de impurezas do café torrado e moído.
- Saqib, M., Iqbal, S., Mahmood, A., & Akram, R. (2016). Theoretical investigation for exploring the antioxidant potential of chlorogenic acid: a density functional theory study. *International Journal of Food Properties*, 19(4), 745-751.
- Sengupta, G., Gaurav, A., & Tiwari, S. (2018). Substituting medicinal plants through drug synthesis. In *Synthesis of Medicinal Agents from Plants* (pp. 47-74). Elsevier.
- Shan, J., Suzuki, T., Suhandy, D., Ogawa, Y., & Kondo, N. (2014). Chlorogenic acid (CGA) determination in roasted coffee beans by Near Infrared (NIR) spectroscopy. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 7(4), 139-142.

- Shivashankara, A. R., Venkatesh, S., Bhat, H. P., Palatty, P. L., & Baliga, M. S. (2015). Can phytochemicals be effective in preventing ethanol-induced hepatotoxicity in the geriatric population? An evidence-based revisit. In *Foods and dietary supplements in the prevention and treatment of disease in older adults* (pp. 163-170). Elsevier.
- Sissi, M., Guillaume, L., Duriot, L., Delporte, M., Menin, B., Michel, C., . . . Bygdell, J. (2020). A GDSL lipase-like from *Ipomoea batatas* catalyzes efficient production of 3, 5-diCQA when expressed in *Pichia pastoris*. *Communications biology*, 3(1), 1-13.
- Snyder, L. R., & Dolan, J. W. (2013). Milestones in the development of liquid chromatography. In *Liquid chromatography* (pp. 1-17). Elsevier.
- Souza, B., Vázquez, L. L., & Marucci, R. C. (2019). *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity*. Springer Nature.
- Sunil, A., Anju, G., & Rajat, V. (2018). HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 6(5), 143-146.
- turismo, M. d. (2018). *Loja un destino cafetalero por excelencia* <https://www.turismo.gob.ec/loja-un-destino-cafetalero-por-excelencia/>
- Upadhyay, R., & Mohan Rao, L. J. (2013). An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(9), 968-984.
- Upadhyay, R., Ramalakshmi, K., & Rao, L. J. M. (2012). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chemistry*, 130(1), 184-188.
- Volonté, M. G., & Quiroga, P. (2013). Análisis farmacéutico. *Series: Libros de Cátedra*.
- Wei, F., & Tanokura, M. (2015). Chemical changes in the components of coffee beans during roasting. In *Coffee in health and disease prevention* (pp. 83-91). Elsevier.
- Wianowska, D., & Gil, M. (2019). Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 273-302.

Zawirska-Wojtasiak, R., Wojtowicz, E., Przygoński, K., & Olkowicz, M. (2014). Chlorogenic acid in raw materials for the production of chicory coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(10), 2118-2123.

Šesták, J., Moravcová, D., & Kahle, V. (2015). Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1421, 2-17.

## Apéndice

### Apéndice A. Análisis de varianza para el ácido neoclorogénico.

**Tabla 7**

*Análisis de varianza para el ácido neoclorogénico.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	9	164186	18243	4.85	0.048
Lineal	3	138796	46265	12.30	0.010
T (°C)	1	34581	34581	9.20	0.029
t (min)	1	980	980	0.26	0.631
H2O (%)	1	103235	103235	27.45	0.003
Cuadrado	3	22478	7493	1.99	0.234
T (°C) *T (°C)	1	6942	6942	1.85	0.232
t (min)*t (min)	1	4488	4488	1.19	0.324
H2O (%)*H2O (%)	1	14153	14153	3.76	0.110
Interacción de 2 factores	3	2911	970	0.26	0.853
T (°C) *t (min)	1	2419	2419	0.64	0.459
T (°C) *H2O (%)	1	55	55	0.01	0.908
t (min)*H2O (%)	1	437	437	0.12	0.747
Error	5	18802	3760		
Falta de ajuste	3	14523	4841	2.26	0.321
Error puro	2	4279	2139		
Total	14	182987			

## Apéndice B. Análisis de varianza para el ácido clorogénico.

**Tabla 8**

*Análisis de varianza para el ácido clorogénico.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	9	1886503	209611	10.80	0.009
Lineal	3	1375919	458640	23.63	0.002
T (°C)	1	91027	91027	4.69	0.083
t (min)	1	24920	24920	1.28	0.309
H2O (%)	1	1259972	1259972	64.92	0.000
Cuadrado	3	437845	145948	7.52	0.027
T (°C) *T (°C)	1	8389	8389	0.43	0.540
t (min)*t (min)	1	88	88	0.00	0.949
H2O (%)*H2O (%)	1	434183	434183	22.37	0.005
Interacción de factores	2	72739	24246	1.25	0.385
T (°C) *t (min)	1	69466	69466	3.58	0.117
T (°C) *H2O (%)	1	856	856	0.04	0.842
t (min)*H2O (%)	1	2417	2417	0.12	0.739
Error	5	97042	19408		
Falta de ajuste	3	42680	14227	0.52	0.708
Error puro	2	54362	27181		
Total	14	1983546			

### Apéndice C. Análisis de varianza para la cafeína.

**Tabla 9**

*Análisis de varianza para la cafeína.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	9	361701	40189	6.74	0.025
Lineal	3	265111	88370	14.83	0.006
T (°C)	1	78820	78820	13.23	0.015
t (min)	1	20040	20040	3.36	0.126
H2O (%)	1	166250	166250	27.90	0.003
Cuadrado	3	52553	17518	2.94	0.138
T (°C) *T (°C)	1	3222	3222	0.54	0.495
t (min)*t (min)	1	642	642	0.11	0.756
H2O (%)*H2O (%)	1	50964	50964	8.55	0.033
Interacción de factores	2 3	44037	14679	2.46	0.178
T (°C) *t (min)	1	32327	32327	5.42	0.067
T (°C) *H2O (%)	1	6829	6829	1.15	0.333
t (min)*H2O (%)	1	4881	4881	0.82	0.407
Error	5	29797	5959		
Falta de ajuste	3	9680	3227	0.32	0.815
Error puro	2	20118	10059		
Total	14	391498			

## Apéndice D. Certificado de análisis de ácido gálico

Sigma-Aldrich

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

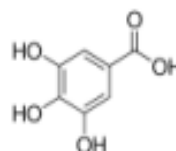
Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Certificate of Analysis

Product Name:

Gallic acid - 97.5-102.5% (titration)

Product Number: G7384  
 Batch Number: SLCJ6385  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 149-91-7  
 MDL Number: MFCD00002510  
 Formula: C7H6O5  
 Formula Weight: 170.12 g/mol  
 Quality Release Date: 10 MAR 2021



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Beige	Off White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Almost Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear to Very Slightly Hazy	Clear
50 mg/mL, EtOH		
Loss on Drying	< 10 %	3 %
Purity (GC)	> 98.5 %	99.7 %
Titration by NaOH (dry basis)	97.5 - 102.5 %	99.6 %

Brian Dulle, Supervisor  
 Quality Assurance  
 St. Louis, Missouri US

## Apéndice E. Certificado de análisis de ácido clorogénico

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

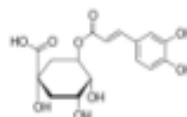
Outside USA: eurtechserv@sial.com

**Certificate of Analysis**

Product Name:

Chlorogenic acid - ≥95% (titration)

**Product Number:** C3878  
**Batch Number:** SLCC1113  
**Brand:** ALDRICH  
**CAS Number:** 327-97-9  
**MDL Number:** MFCD00003862  
**Formula:** C16H18O9  
**Formula Weight:** 354.31 g/mol  
**Quality Release Date:** 22 MAR 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off-White	Off-White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Very Faint Yellow to Dark Yellow	Dark Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear to Hazy	Clear
25 mg/mL, EtOH		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Loss on Drying	< 6 %	1 %
Titration by NaOH (dry basis)	> 95 %	97 %

Carolyn Baird, Supervisor  
 Quality Assurance  
 St. Louis, Missouri US

## Apéndice F. Certificado de análisis de ácido cafeico

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

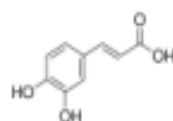
Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

**Certificate of Analysis**Product Name:  
Caffeic acid – ≥98.0% (HPLC)

Product Number: C0625  
 Batch Number: MKBQ5343V  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 331-39-5  
 MDL Number: MFCD00004392  
 Formula: C9H8O4  
 Formula Weight: 180.16 g/mol  
 Quality Release Date: 02 DEC 2013



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Faint Yellow to Yellow and Faint Brown-Yellow to Brown-Yellow and Faint Brown to Brown	Light Brown-Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Faint Yellow to Dark Yellow and Faint Brown to Light Brown and Brown-Yellow	Brown-Yellow
Solubility (Turbidity) 50 mg/mL, EtOH	Clear to Very Slightly Hazy	Clear
Purity (Titration by NaOH)	> 98.0 %	99.0 %
Infrared Spectrum	Conforms	Conforms
Purity (HPLC)	> 98.0 %	100.0 %

Jamie Gleason, Manager  
 Quality Control  
 Milwaukee, Wisconsin US

## Apéndice G. Certificado de análisis de ácido p-cumárico

**SIGMA-ALDRICH**3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

## Certificate of Analysis

**Product Name:** P-COUMARIC ACID  
 ≥ 98.0 % (HPLC)  
**Product Number:** C9008  
**Batch Number:** BCBN0412V  
**Brand:** Sigma  
**CAS Number:** 501-98-4  
**Formula:**  $\text{HO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$   
**Formula Weight:** 164.16  
**Quality Release Date:** 01 MAY 2014

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	OFF-WHITE TO TAN	FAINT TAN
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	99.8 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW	YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50MG/ML, ETHANOL	50MG/ML, ETHANOL
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner  
 Manager Quality Control  
 Buchs, Switzerland

## Apéndice H. Certificado de análisis de cafeína

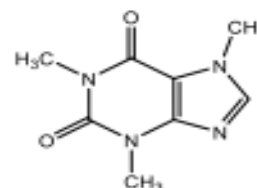
Supelco®

www.sigmaaldrich.com

## Certificate of Analysis – Certified Reference Material

## CAFFEINE

**Product no.:** PHR1009-1G  
**Lot no.:** LRAC4115  
**Description of CRM:** White Powder  
**Expiry date:** 30 November 2023  
**Storage:** Room Temperature/Protect from Light  
**Certificate version:** LRAC4115.1 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopelal Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
**Molecular mass:** 194.2  
**CAS No.:** 58-08-02



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty U, U=k·u (k=) (Mass Balance/basis)
CAFFEINE	99.96 % U <sub>CRM</sub> = ± 0.7 %, k = 2.0 (Mass Balance/as is basis)

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.

**Minimum sample size:** 20 mg

**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

**Certificate issue date:** 04 February 2020



[Andy Ommen; Quality Control]

[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 5

Certificate version 01



**Packaging:** 1 g in amber vial

**Details on metrological traceability:**

This standard has been gravimetrically prepared using balances that have been fully qualified and calibrated to ISO 17025 requirements. All calibrations utilize NIST traceable weights which are calibrated externally by a qualified ISO 17025 accredited calibration laboratory to NIST standards. Qualification of each balance includes the assignment of a minimum weighing by a qualified and ISO 17025 accredited calibration vendor taking into consideration the balance and installed environmental conditions to ensure compliance with USP tolerances of NMT 0.10% relative error. Fill volume to predetermined specifications is gravimetrically verified throughout the dispensing process using qualified and calibrated balances. Further traceability to a corresponding Primary Standard may be achieved through a direct comparison assay. Where a Primary Standard is available, the assay value will be included in the specified section of the COA.

**Associated uncertainty:**

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty ( $U_{CRM}$ ) corresponding to the 95% confidence interval.  $U_{CRM}$  is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor  $k$ , which is obtained from a  $t$ -distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

**Traceability Assay:**

Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards

**ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)**

<b>ASSAY VALUE</b>	<b>vs. USP LOT</b>
99.3 %	R04330
	Labeled Content = 0.998 mg/mg

**ASSAY vs. EP CRS (as is basis)**

<b>ASSAY VALUE</b>	<b>vs. EP BATCH</b>
98.0 %	4.0
	Labeled Content = 99.9 % $C_8H_{10}N_4O_2$

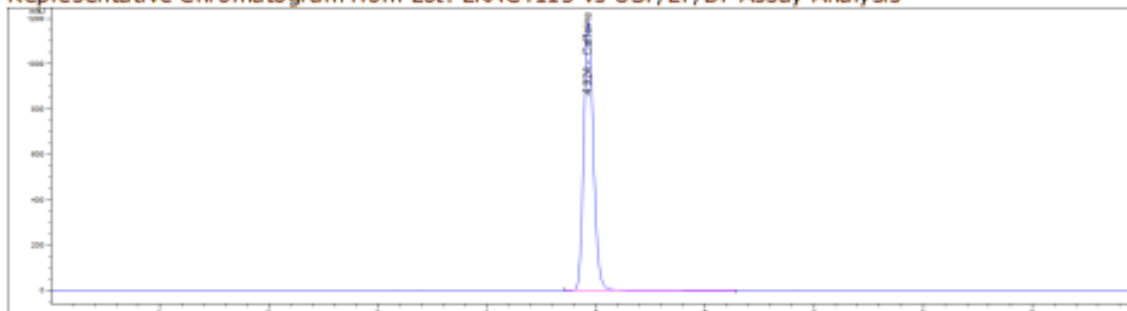
**ASSAY vs. BP CRS (as is basis)**

<b>ASSAY VALUE</b>	<b>vs. BP BATCH</b>
99.5 %	3271
	Labeled Content = 99.9 % of $C_8H_{10}N_4O_2$

**Method: HPLC (ref.: Caffeine, Current Compendial Monographs)**

Column: Ascentis Express C18, 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m  
 Mobile Phase: 0.82 g/L Sodium Acetate (pH to 4.5 w/glacial acetic acid), THF, Acetonitrile  
 Mobile Phase Ratio: 95.5:2:2.5  
 Flow Rate: 0.8 mL/min  
 Column Temperature: 30 °C  
 Injection: 10  $\mu$ L  
 Detector: 275 nm

Representative Chromatogram from Lot: LRAC4115 vs USP/EP/BP Assay Analysis



**Certification process details:**

The certified purity is determined by mass balance and calculated as

$$\% \text{ Purity} = \left( \frac{(100 - TCI)}{100} * \frac{(100 - LOD)}{100} * \frac{(100 - H_2O)}{100} * \frac{(100 - ROI)}{100} * \frac{(100 - RS)}{100} \right) * 100\%$$

- TCI = Total Chromatographic Impurities
- LOD = Loss on Drying
- H<sub>2</sub>O = Water content determined by Karl Fischer analysis
- ROI = Residue on Ignition
- RS = Residual Solvents

Methods for impurity determination may be added or deleted as required. The following techniques are applied:

**CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS****METHOD: HPLC (ref.: Caffeine, Current Compendial Monographs)**

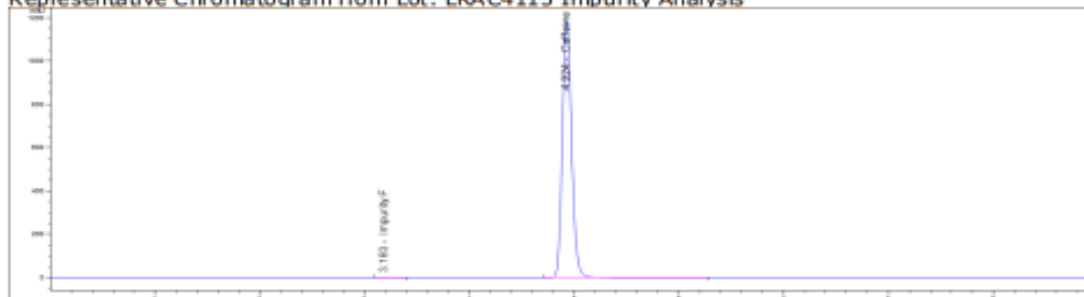
See HPLC Assay for Method Parameters

Impurities Detected:

Impurity F: 0.03 %

Total Impurities: **0.03 %**

Representative Chromatogram from Lot: LRAC4115 Impurity Analysis

**RESIDUAL SOLVENTS**

Method: GC-MS Headspace (ref.: Adapted from Residual Solvents USP <467>)

Column: SPB-624

Carrier gas: He

Flow: 1.2 mL/min

Split Ratio: 1:5

Injection/Temperature: 1 mL/220 °C

Temperature Program: 40 °C for 5 min, 8 °C/min to 200 °C, hold 5 min

Solvents Detected: **None**

**LOSS ON DRYING/VOLATILES**

Method: 80 °C for 4 hours (ref.: Current Compendial Monographs)

Mean of three measurements, Loss = **0.006 %**

**RESIDUE ANALYSIS**

Method: Sulfated Ash (ref.: Current Compendial Monographs)

Sample Size: ~ 100 mg

Mean of three measurements, Residue = **0.004 %**

**CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE**

**99.96 %**  $U_{GM} = \pm 0.7 \%$ ,  $k = 2.0$   
(as is basis)

**Homogeneity assessment:** Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical method: HPLC

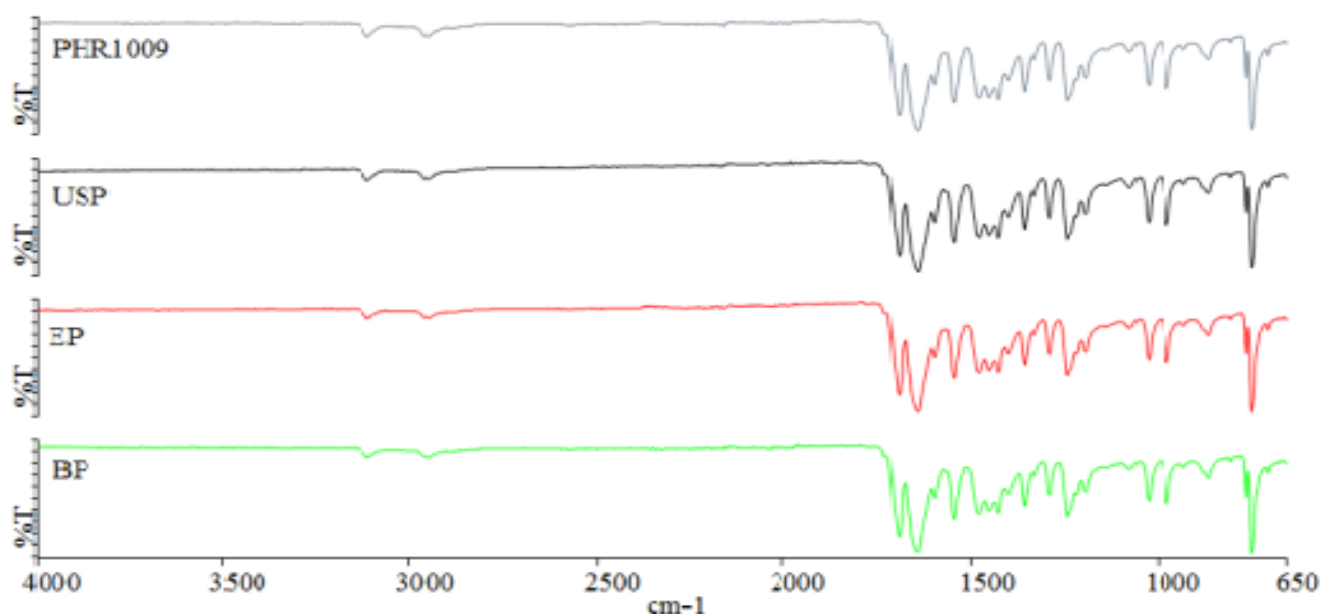
Sample size: 20 mg

**Stability assessment:** Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis. Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.

**Identification Test:**

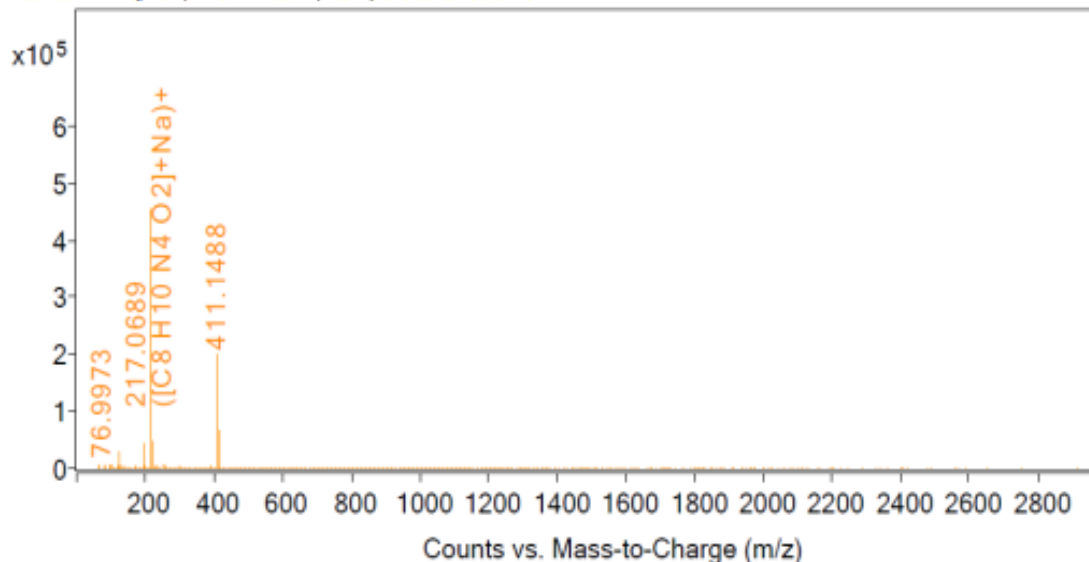
**INFRARED SPECTROPHOTOMETRY** (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopial standards)



PHR1009 LRAC4115 vs USP R04330/EP Batch 4.0/BP Batch 3271

**Indicative Values:****MASS SPECTRUM**

Method: HR-QTOF; 4.0 kV ESI+; temperature: 325 °C



Theoretical value: 217.0701 m/z

The signal of the MS spectrum is consistent with the theoretical value and its interpretation is consistent with the structural formula.

**MELTING POINT**

Specification: 234-239 °C (EP)

Mettler Toledo FP900 Thermosystem with FP81 Measuring Cell

Mean of three measurements = **236.9 °C****Certificate of analysis revision history:**

Certificate version	Date	Reason for version
LRAC4115.1	04 February 2020	Original Release

**Disclaimer:**

The purchaser is required to determine the suitability of this product for any particular application. Sigma-Aldrich RTC makes no warranty of any kind, express or implied, other than its products meet all quality control standards set by Sigma-Aldrich RTC. We do not guarantee that the product can be used for any particular application.

The vibrant M, Supelco, TraceCERT and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. © 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.

