

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS EN CAFÉ^{1/}

Ligia Dina Solís^{2/*}, Carlos H. Herrera^{**}

Palabras clave: Ácidos clorogénicos, química, análisis, café, calidad, *Coffea arabica*, compuestos fenólicos.

Keywords: Chlorogenic acids, chemistry, analysis, coffee, quality, *Coffea arabica*, phenolic compounds.

Recibido: 08/10/04

Aceptado: 15/05/05

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método para analizar ácidos clorogénicos en café, utilizando la misma metodología de extracción de la cafeína: Agua a 78°C por 60 min; dilución de 10 veces; y obtención del espectro de la segunda derivada, para cuantificar el contenido de ácido clorogénico y de cafeína en el café. El método propuesto tiene un ámbito lineal a 357,16 nm de 8-120 mg l⁻¹ de ácido clorogénico. La cafeína, el ácido tánico, la sacarosa y la albúmina, usualmente presentes en el café, no presentan problemas de interferencia. La extracción del ácido clorogénico del café debe realizarse sin la adición de sustancias que varíen la acidez del medio, ya que a un pH menor o mayor a 5,5-6,0 los resultados obtenidos son significativamente diferentes. La curva de calibración es homocedástica y los límites de detección y cuantificación son 0,002 y 0,006 mg l⁻¹, respectivamente. La pendiente de la función de recuperación (0,97±0,07) y su intercepto (0,01±0,05) se ajustan a la curva ideal, lo que implica una buena recuperación en el método propuesto. El método desarrollado se aplicó a diferentes muestras de café tostado comercial, a muestras de 2 variedades de café, tostados a temperaturas de 195-210°C por 9-11 min y en café oro de distintas variedades.

ABSTRACT

Development of an analysis method to quantify chlorogenic acids in coffee. A method to analyze chlorogenic acids in coffee was developed and validated, using the same methodology for caffeine extraction: water at 78°C for 60 min; a 10-fold dilution and obtention of the second derivative's spectrum to quantify caffeine and chlorogenic acid contents in coffee. The proposed method has a linear scope, at 357.16 nm, between 8 and 120 mg l⁻¹ of chlorogenic acid. Caffeine, tannic acid, saccharose and albumen, usually present in coffee, do not present interference problems. The extraction of chlorogenic acid of the coffee must be made without addition of substances that vary the acidity of the solution, since at pH smaller or greater than 5.5-6.0 the results are significantly different. The calibration chart is homocedastic and the limits of detection and quantification are 0.002 and 0.006 mg l⁻¹, respectively. The slope of the function of recovery (0.97±0.07) and its intercept (0.01±0.05) fit the ideal curve, which implies a good recovery with the proposed method. The method developed was applied to different samples of roasted commercial coffee, to samples of 2 varieties of coffee, roasted at temperatures of 195-210°C during 9-11 min and finally to gold coffee of different varieties.

1/ El trabajo forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor. Escuela de Química, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: dsolis@icafe.go.cr

* Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE).

** Escuela de Química, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

El uso de la química como herramienta para la evaluación de la calidad del café surgió desde hace muchos años; sin embargo, el análisis sensorial es aún la forma más usual de determinar su calidad. La búsqueda de diferencias químicas que puedan ser correlacionadas con la calidad de la bebida es un tema que ha estado en el trabajo de diversos investigadores, del cual surgió de forma natural el análisis de cafeína. Sin embargo, el café tiene componentes en mayor proporción, dignos de ser considerados como variables químicas de evaluación de su calidad (Clarke y Macrae 1985). Entre esos componentes se encuentra una familia de compuestos conocidos como ácidos clorogénicos: Son ésteres del ácido quínico, de los cuales el más abundante es el 5-cafeoilquínico. La cantidad de ácidos clorogénicos varía con el grado de maduración (Aerts y Baumann 1994), la especie y otros factores asociados a la calidad del café, tal como la altura y la presencia o ausencia de sombra e inclusive se les relaciona con la resistencia a algunas enfermedades (Humphrey y Macrae 1987). Estos ácidos son precursores del sabor y de los pigmentos del café tostado (Moreira *et al.* 2001), lo cual aunado a su gran solubilidad en agua da como resultado un buen candidato para la evaluación química de la calidad del café (Amorim *et al.* 1973).

Los ácidos clorogénicos se relacionan con la prevención de enfermedades oxidativas, debido al grupo fenol que posee en su estructura (Morishita y Ohnishi 2001); en la protección de los dientes, ya que forma una película protectora contra las bacterias (Daglia *et al.* 2002) y hasta se cree que pueden ayudar a prevenir la drogadicción, ya que tiene un efecto opioide antagonista (Lima 1999).

Los compuestos con enlaces múltiples conjugados pueden ser analizados aprovechando la técnica de espectroscopía ultravioleta de derivadas (Schmitt 2000), técnica poco utilizada pero que da excelentes resultados. El Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE) utiliza esta técnica para el análisis de cafeína y el análisis resulta tan sencillo como una extracción con agua, sin ningún

tratamiento de la matriz (Guzmán 1992). El ácido clorogénico presenta una gran cantidad de enlaces conjugados; responsables de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y de la absorción en la región ultravioleta de este compuesto (Humphrey y Macrae 1987).

En la actualidad, el ICAFE evalúa la calidad con una serie de métodos que involucran variables físicas y químicas; como el contenido de humedad, extracto acuoso, extracto alcohólico, la cantidad de cafeína y de azúcares (Norma Oficial de Métodos de Análisis de Café 1999). Siguiendo la tendencia de evaluar la calidad del café por sus propiedades químicas y aprovechando la técnica de espectroscopía ultravioleta de derivadas, se propone aplicar esta metodología al análisis de ácidos clorogénicos. En esta forma; haciendo uso de un procedimiento de análisis único se lograría determinar el contenido de cafeína y ácidos clorogénicos en el café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del método de análisis de ácido clorogénico en café, utilizando la técnica de espectroscopía UV de derivadas

Pesar 1 g de café tostado y molido en un balón aforado de 100 ml y agregar 50 ml de agua caliente. Colocar el balón en un baño maría por 60 min. Enfriar a temperatura ambiente y aforar con agua destilada. Filtrar y diluir el filtrado 10 veces (alícuota de 10 ml del filtrado y aforar a 100 ml con agua destilada). Determinar el espectro de la segunda derivada en la región ultravioleta de 200-400 nm. Preparar una disolución patrón de ácido clorogénico pesando exactamente 0,1 g de ácido 5-cafeoilquínico y aforar con agua destilada en un balón de 500 ml. Por cada dilución obtener disoluciones con una concentración de ácido clorogénico de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mg l⁻¹ y determinar el espectro de la segunda derivada en la región ultravioleta de 200-400 nm para cada una de estas disoluciones. Construir una curva de calibración, graficando la magnitud de la segunda derivada en función de la concentración del ácido clorogénico. Interpolar la magnitud de la

segunda derivada en la curva de calibración, para calcular la concentración de ácidos clorogénicos totales en la muestra de café (Solís 2003).

Efecto de diferentes variables en el análisis de ácido clorogénico por la técnica de espectroscopía UV de derivadas

Para evaluar el efecto de diferentes variables en el análisis de ácido clorogénico; se determinó la magnitud de la segunda derivada o se calculó el contenido porcentual de ácido clorogénico, en muestras del mismo café (puro, tostado y molido) sometidas a las condiciones indicadas a continuación:

Temperatura de extracción del ácido clorogénico: El ácido clorogénico de la muestra de café fue extraído con agua a 25, 70, 78 y 100°C por 60 min.

Tiempo de extracción del ácido clorogénico: La muestra de café fue extraída con agua a 78°C a diferentes tiempos de extracción: 10, 60 (recomendada para la cafeína) y 90 min.

pH de extracción del ácido clorogénico: El ácido clorogénico fue extraído de la muestra de café con disoluciones a pH 4,0 7,0 y 10 y con agua a 78°C por 60 min.

Estabilidad del ácido clorogénico en disolución acuosa: Se estudió el efecto de la temperatura a 25, 70 y 78°C sobre la estabilidad del ácido clorogénico en disolución acuosa, con una concentración de 4 mg l⁻¹.

Efecto de las interferencias en el análisis de ácido clorogénico: Se utilizaron disoluciones de ácido clorogénico (10 mg l⁻¹) y se mezclaron con volúmenes diferentes de una disolución de cafeína, hasta obtener concentraciones de 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 y 75,0 ppm de cafeína. Siguiendo el mismo procedimiento se prepararon disoluciones de ácido clorogénico con ácido tánico, albúmina y sacarosa con una concentración de 4,0, 8,0, 10,0, 20,0, 40,0, 80,0 y 100 ppm. Se determinó la magnitud de la segunda derivada del espectro UV a longitudes de onda de 259,01 y de 357,16 nm. Se calculó el contenido porcentual de ácido clorogénico en cada una de las disoluciones

con o sin interferencias y la diferencia entre los dos valores a ambas longitudes de onda.

Validación del método analítico propuesto

Para encontrar el ámbito lineal de trabajo, se determinó el espectro UV de segunda derivada de disoluciones acuosas de ácido clorogénico, con concentraciones de 8-120 mg l⁻¹. Los límites de detección y cuantificación fueron determinados con el espectro UV de la segunda derivada de disoluciones acuosas de ácido clorogénico a 7 niveles de concentración (entre 3,4 y 56,8 mg l⁻¹) con 7 repeticiones. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas, utilizando la prueba de Cochran (UDC 2003) y de Levene (NIST 2003). Se graficó la desviación estándar en función de la concentración de ácido clorogénico y se extrapoló el valor de DE₀, para calcular los límites de detección y cuantificación (L.D.=3 DE₀ y el L.C.=10 DE₀).

La precisión y exactitud del método fueron obtenidos a partir del análisis de muestras reales enriquecidas con ácido clorogénico, con 7 repeticiones en cada concentración.

Determinación de la función de recuperación del ácido clorogénico por el método propuesto

Para obtener la función de recuperación, se determinó el contenido de ácido clorogénico en muestras enriquecidas a 10 niveles de concentración diferentes, con 7 repeticiones. Los niveles variaron de 0,2-1,1% adicionados a la muestra de café tostado puro. La muestra se analizó como si fuera una muestra real, bajo las condiciones óptimas obtenidas. Posteriormente, se determinó por diferencia el valor adicionado experimental y se graficó en función del valor adicionado real.

Aplicación del método propuesto a muestras reales de café

El método propuesto se aplicó en muestras de diferentes tipos de café tostado, disponibles en el mercado nacional; en muestras del mismo café sometidas a diferentes condiciones de tostado; y en muestras de café de distintas variedades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Laboratorio Químico del Instituto del Café de Costa Rica analiza el contenido de cafeína en café, con el método propuesto por Guzmán (1992), el cual consiste en una extracción de la cafeína con agua y la determinación del espectro de la segunda derivada en la región ultravioleta. Correlacionando este espectro con la concentración de disoluciones patrón de cafeína, se obtiene una línea recta que permite calcular el contenido porcentual de este compuesto en las muestras analizadas. El uso de la segunda derivada es sencillo, exacto, preciso (Schmitt 2000); por lo que se consideró factible aplicar esta técnica a la determinación de ácido clorogénico, que posee un sistema conjugado responsable de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y de la absorción en la región ultravioleta (Solís 2003).

Estudio de la relación lineal entre la concentración del ácido clorogénico y la magnitud de la segunda derivada del espectro de absorción ultravioleta

En el cuadro 1 se muestra la variación en la magnitud de la segunda derivada (D2) del

espectro UV con la concentración del ácido clorogénico acuoso a 226,10, 259,01 y 357,16 nm.

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0,952, 0,999 y 0,999, respectivamente; el análisis estadístico comprobó que existe correlación entre los 2 parámetros (95% de confianza). A una longitud de onda de 226,10 nm, el coeficiente de correlación presentó el valor más bajo (0,952), por lo cual se descartó esta longitud de onda para el análisis de ácido clorogénico. En las longitudes de onda de 259,01 y 357,16 nm hay linealidad en un ámbito de concentración de ácido clorogénico de 8-120 ppm, los valores del coeficiente de correlación son más elevados (0,999), por lo que son más apropiadas para el método de análisis planteado (Bauer 1974, Miller y Miller 1993).

Efecto de la temperatura de extracción en el contenido porcentual de ácido clorogénico

Se determinó el contenido porcentual de ácido clorogénico en una misma muestra de café, extraída con agua a diferentes temperaturas (25, 70, 78 y 100°C) por 60 min. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas (95% de confianza) entre los valores obtenidos

Cuadro 1. Variación de D2 con la concentración de ácido clorogénico a 3 longitudes de onda para determinar el ámbito lineal.¹

Concentración (ppm)	D2 (226,10 nm)	D2 (259,01 nm)	D2 (357,16 nm)
8	0,176	0,105	0,04568
24	0,517	0,310	0,12942
40	0,848	0,511	0,21744
56	1,167	0,711	0,29987
72	1,430	0,905	0,38181
88	1,591	1,098	0,46560
104	1,696	1,294	0,56336
120	1,542	1,490	0,65236
Pendiente	0,014	0,012	0,005
Intercepto	0,247	0,015	-0,001
Correlación	0,952	0,999	0,999

¹ Adaptado de Solís, L.D. 2003. D2 = Segunda Derivada.

a 25°C y a 78°C; pero no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos a 70, 78 y 100°C. De los resultados se dedujo que la extracción del ácido clorogénico es más efectiva a temperaturas altas, lo cual es razonable por cuanto se está tratando de recuperar un compuesto natural presente en las semillas de una planta se requiere de un aumento en la temperatura para aumentar su capacidad de disolución en el medio acuoso.

Efecto de la temperatura en la estabilidad del ácido clorogénico

Se estudió la estabilidad térmica del ácido clorogénico en disolución acuosa a 78°C (temperatura utilizada para el análisis de cafeína en el Laboratorio Químico del ICAFE) y a 25°C. La literatura indica que el ácido clorogénico es estable en disolución acuosa a temperatura ambiente (Clarke y Macrae 1985); sin embargo, no hay información sobre su estabilidad a temperaturas más elevadas. La estructura del ácido clorogénico permite predecir una reacción de hidrólisis del grupo éster al aumentar la temperatura; por lo que se determinó su estabilidad a 78°C. No se encontró diferencias significativas (95% de confianza) en el contenido porcentual de ácido clorogénico a una temperatura de 25°C y 78°C; por lo que se deduce que no hay efecto de la temperatura en la estabilidad del ácido clorogénico en disolución acuosa.

Efecto del tiempo de extracción en el contenido porcentual de ácido clorogénico

Para la determinación de cafeína se utiliza un tiempo de extracción de 60 min a 78°C. Para el análisis de ácido clorogénico, se evaluó estadísticamente el efecto del tiempo de extracción (10, 60 y 90 min) en la magnitud de la segunda derivada del espectro UV de este compuesto, manteniendo la temperatura constante a 78°C. Se encontró (95% de confianza) que hay diferencias significativas; en la magnitud de la segunda derivada del espectro UV; y, entre las disoluciones de ácido clorogénico extraídas por 10 y 60 min

(tiempo de referencia). A un tiempo de extracción de 90 min, los resultados no fueron significativos (95% de confianza) respecto de los obtenidos a un tiempo de extracción de 60 min; demostrando que con un tratamiento con agua a 78°C por 60 min, la extracción del ácido clorogénico de la matriz es completa.

Efecto del tiempo de determinación del espectro ultravioleta de segunda derivada de la disolución acuosa de ácido clorogénico

Para evaluar la estabilidad de las disoluciones acuosas de ácido clorogénico en el tiempo, se determinó el espectro UV de estas disoluciones: 2 h (al finalizar el procedimiento de extracción indicado), 24 h y 120 h después de la extracción del analito. La magnitud de la segunda derivada de las disoluciones acuosas de ácido clorogénico, a 2 y 24 horas después de su extracción, no fueron significativamente diferentes (95% de confianza); sin embargo a 120 h hubo diferencias significativas en la magnitud de la segunda derivada. Se concluyó que el espectro UV de la segunda derivada de las disoluciones acuosas de ácido clorogénico debe determinarse, como máximo, 24 h después de realizada la extracción del analito.

Efecto del pH en la estabilidad del ácido clorogénico

Las disoluciones o infusiones de café presentan una acidez en un ámbito de pH de 5-6 (Clarke y Macrae 1985). Bertrand (2001), indica que el pH de las disoluciones acuosas de café es usualmente muy estable y cercano a 5,5; por lo cual se consideró el efecto del pH sobre la estabilidad del ácido clorogénico en el método de análisis propuesto. A partir de la estructura química del ácido clorogénico, se puede predecir algunos cambios que podrían afectar significativamente los resultados del análisis: Al aumentar el pH ocurre una desprotonación de los grupos hidroxilo fenólicos e hidrólisis del grupo éster. Se determinó el contenido de ácido clorogénico en café, variando el pH del medio de extracción con disoluciones amortiguadoras (Lide 1994) de

pH 4,0, 7,0 y 10 y se comparó con los resultados del extracto acuoso (pH $5,7 \pm 0,1$). Se demostró que a pH 4,0 y 7,0 hay diferencias significativas (95% de confianza) con respecto al pH de trabajo de 5,7; por lo cual se concluyó que hay variaciones significativas en el contenido de ácido clorogénico por aumento de la acidez del medio de extracción. También, se determinó que hay diferencias significativas en el contenido de ácido clorogénico en los extractos acuosos de pH 10 y 5,7; concluyendo que un aumento del pH es un factor que afecta el análisis. El porcentaje de error generado a pH 4,0 y 7,0 se encuentra dentro del ámbito de 2-7%; sin embargo, a pH 10 el error es superior al 100%.

Al variar el pH de la disolución acuosa de ácido clorogénico, se hizo evidente un cambio en la coloración de las disoluciones. En las disoluciones a pH 10 la coloración café fue más intensa que la presentada por las disoluciones de pH 5,7 y 4,0. A pH bajos los grupos hidroxilo fenólicos estaban protonados, reduciéndose la conjugación del grupo aromático y a pH altos los grupos hidroxilo se encontraban desprotonados, aumentando la conjugación del grupo aromático, provocando desplazamiento de las bandas de absorción a longitudes de onda diferentes. Además, en medio básico, la reacción de hidrólisis del grupo

éster aumentó su velocidad, afectando significativamente los resultados del análisis.

Efecto de las interferencias en la magnitud de la segunda derivada de disoluciones acuosas de ácido clorogénico a diferentes longitudes de onda

Algunas de las sustancias más frecuentemente encontradas en el café crudo y tostado son la cafeína, la sacarosa, el ácido tánico y la albúmina (Clarke y Macrae 1985), las cuales podrían actuar como interferencias en la determinación de ácido clorogénico. Para evaluar este efecto se determinó la magnitud de la segunda derivada del espectro UV en disoluciones acuosas de ácido clorogénico con cantidades variables de cafeína, sacarosa, ácido tánico y albúmina. Se calculó el contenido porcentual de ácido clorogénico en cada una de las disoluciones con o sin interferencias y la diferencia entre ambos valores. El ácido tánico y la cafeína presentaron un mayor efecto interferente a una longitud de onda de 259,01 nm y a concentraciones entre 80 y 100 mg l⁻¹ (Figura 1). A una longitud de onda de 357,16 nm, no se presentó ninguna interferencia importante de parte de estas sustancias (Figura 2).

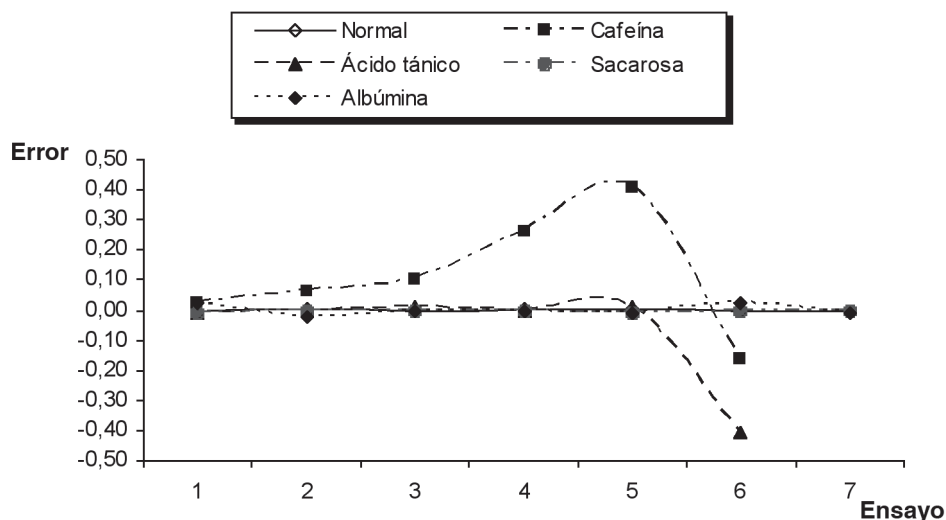


Fig. 1. Diferencia en el contenido de ácido clorogénico entre las disoluciones con interferencias y sin ella a 259,01 nm.

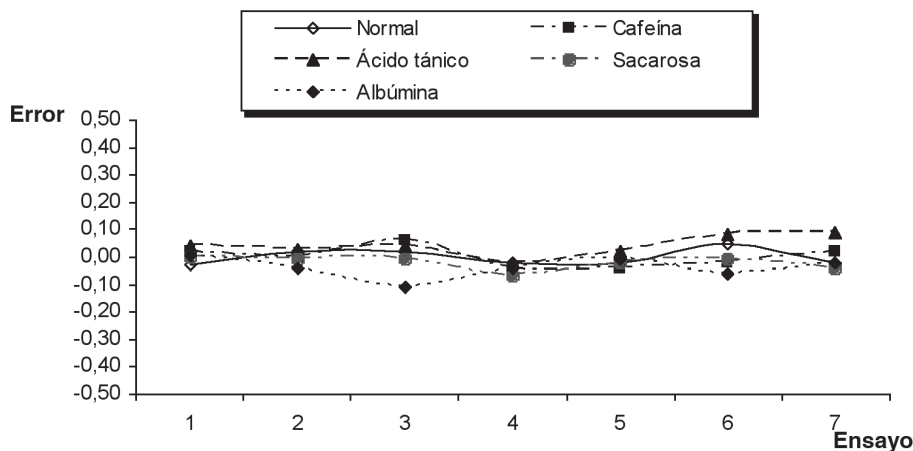


Fig. 2. Diferencia en el contenido de ácido clorogénico entre las disoluciones con interferencias y sin ella a 357,16 nm.

A una longitud de onda de 259,01 nm se demostró que hay diferencias significativas (95% de confianza) entre el contenido de ácido clorogénico, en ausencia o presencia de la cafeína, el ácido tánico y la albúmina; concluyendo que estas sustancias actúan como interferencias en el método de análisis propuesto. Sin embargo; no hay diferencias significativas (95% de confianza) entre el contenido de ácido clorogénico en ausencia o presencia de la sacarosa; por lo tanto este compuesto no mostró efecto interferente en la determinación de ácido clorogénico.

A 357,16 nm se demostró que en presencia o ausencia de la cafeína, el ácido tánico, la albúmina y la sacarosa no hay diferencias significativas (95% de confianza) en el contenido porcentual de ácido clorogénico, concluyendo que estas sustancias no causan interferencia en el análisis propuesto. Por lo tanto, esta longitud de onda resultó más apropiada para el análisis de ácido clorogénico; debido a que presentó una excelente correlación entre la concentración y la magnitud de la segunda derivada y no presentó problemas de interferencia con las sustancias estudiadas.

Determinación de los límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.)

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se determinó la magnitud de

la segunda derivada de disoluciones acuosas de ácido clorogénico de concentraciones diferentes y se graficó la desviación estándar de D2 en función de la concentración de ácido clorogénico. La curva obtenida tiene una excelente linealidad ($r=0,99994$), una correlación significativa (95% de confianza) entre los parámetros indicados y un comportamiento homocedástico al aplicar la prueba de Cochran. Se obtuvo el valor de DE_0 (por extrapolación) y se calculó el límite de detección ($LD=3 DE_0$) y el límite de cuantificación ($LC=10 DE_0$) (Cuadro 2). Utilizando la prueba de Levene (UniOvi 2003, NIST 2003) los resultados de los límites de detección y cuantificación no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con el criterio de Cochran.

La función de recuperación

Para calcular la función de recuperación, se preparó muestras de café enriquecidas con ácido clorogénico (10 concentraciones), se determinó la cantidad de ácido clorogénico recuperada ($mg l^{-1}$) utilizando el método analítico propuesto y se encontró que en el ámbito de concentración ensayado, la recuperación no fue significativamente diferente del 100%. Al graficar la concentración de ácido clorogénico adicionada en función de la concentración recuperada, se obtuvo una curva con una pendiente de 0,97008,

Cuadro 2. Determinación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) para el método de análisis de ácido clorogénico utilizando los criterios de Cochram y Levene.

Criterio	LD (mg l ⁻¹)	LC (mg l ⁻¹)
Cochram	0,003	0,008
Levene	0,002	0,007

un intercepto de 0,01550 y un coeficiente de correlación de 0,97818.

La pendiente de la función de recuperación (0,97±0,07) y su intercepto (0,01±0,05) no son significativamente diferentes (95% de confianza) de los valores de la pendiente y del intercepto (1,0 y 0,0) de una curva ideal (Miller y Miller 1993). Este ajuste a la curva ideal implica una buena recuperación con el método propuesto.

Aplicación del método en muestras reales

El método se aplicó en diferentes muestras de café tostado comercial encontradas en los supermercados nacionales. Los resultados se muestran en el cuadro 3. En algunos casos, el contenido de ácido clorogénico fue menor a 1% y menor que los valores reportados por la literatura (Clarke y Macrae 1985) como usuales en el café, debido a la adición de azúcar (sacarosa).

En el cuadro 4 se muestra el contenido de ácido clorogénico en muestras de 2 variedades de

Cuadro 3. Método empleado en cafés tostados nacionales.¹

Tipo	Café molido comercial	Ácido clorogénico %
Tostado con azúcar	Marca 1	0,54
	Marca 2	1,31
	Marca 3	1,08
Tostado puro	Marca A	1,16
	Marca B	1,97
	Marca C	1,41

¹ Adaptado de Solís, L.D. 2003.

café, tostadas a temperaturas de 195-210°C por 9-11 min. Según Bertrand (2001), las condiciones establecidas en los tuestes III y IV, son las ideales para el café. El contenido de ácido clorogénico en el café tostado oscila de 1-4%, lo cual coincide con los valores reportados en la literatura (Clarke y Macrae 1985). Un incremento en la temperatura y en el tiempo de tostado (tostado más oscuro), provoca una disminución en el contenido de ácido clorogénico debido a la degradación del analito.

Por último se aplicó el método en café oro de distintas variedades, los resultados se observan en el cuadro 5 y son consistentes con los reportados en la literatura (Clarke y Macrae 1985).

Cuadro 4. Contenido de ácido clorogénico en muestras de 2 variedades de café tostado a diferente tiempo y temperatura.¹

Tostado	Condiciones		Ácido clorogénico (%)	
	T (°C)	t (min)	Variedad 1	Variedad 2
I	195	9,00	3,89	3,79
II	197	9,30	3,35	3,90
III	200-203	10,00	2,82	2,82
IV	207-210	10,30	1,42	2,40
V	210-220	11,00	1,05	2,07

¹ Adaptado de Solís, L.D. 2003.

Cuadro 5. Aplicación del método en muestras de distintas variedades de *Coffea arabica* de la finca de CICAFAE.^{1/2/}

Repetición	Ácido clorogénico (%)		
	Catuaí	Caturra	Etíope
1	7,14	7,36	7,45
2	7,10	7,34	7,30
3	7,41	7,40	7,35
Promedio	7,22	7,36	7,36
Desviación	0,13	0,03	0,06

¹ Centro de Investigaciones en Café, San Pedro de Barva de Heredia.

² Adaptado de Solís, L.D. 2003.

El método es aplicable entonces tanto a café tostado como a café oro por cuanto los valores se ajustan a los valores esperados para estos tipos de muestra.

LITERATURA CITADA

- AERTS R.J., BAUMANN T.W. 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 45 (273): 497-503.
- AMORIM H. V., MALAVOLTA E., TEIXEIRA A., CRUZ V. F., MELO M., GUÉRCIO M. A., FOSSA E., BREVIGLIERI O., FERRARI S. E., SILVA D. M. 1973. Relationship between some organic compounds of Brazilian green coffee with the quality of the beverage, pp. 113-127. *In: Colloque scientifique international sur le café*, 6. Bogotá (Colombia), Juin 4-9. ASIC
- BAUER E. L. 1974. Manual de estadística para químicos. Alhambra, Madrid, 188 p.
- BERTRAND B. 2001. Informe sobre los análisis físicos, químicos y sensoriales para la cosecha 2000/2001. ICAFE. 5 p.
- CLARKER J., MACRAE R. 1985. Coffee. Vol. 1: Chemistry. Elsevier London. 306 p.
- DAGLIA M., TARSİ R., PAPETTI A., GRISOLI P., DACARRO C., PRUZZO C., GAZZANI G. 2002. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(5): 1225-1229.
- GUZMÁN M. 1992. Determinación de la correlación entre propiedades físico-químicas que evalúen la calidad del café tostado y molido para consumo nacional. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 111 p.
- HUMPHREY C. J., MACRAE R. 1987. Determination of chlorogenic acid in instant coffee using derivative spectrophotometry and its application to the characterization of instant coffee/ chicory mixtures p. 179-186. *In: Colloque scientifique international sur le café*, 12. Montreux (Suiza), Juin 29 - Juillet 3. ASIC.
- LIDE D. R. 1994. Buffers, pp 8-42. *In: Lide, H.R. (ed) Handbook of Chemistry and Physics*. CRC.
- LIMA D.R. 1999. Coffee & Health. Vanderbilt University, Medical Center. Nashville. 17 p.
- MILLER J.M., MILLER J.C. 1993. Estadística y quimiometría para química analítica. Prentice May, Madrid. 278 p.
- MOREIRA R. F. A., TRUGO L. C., DE MARÍA C. A. B., MATOS A. G. B., SANTOS S. M., LEITE J. M. 2001. Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51(1): 95-99.
- MORISHITA H., OHNISHI M. 2001. Chlorogenic acids, pp. 919-953. *In: Rahman A-U (ed). Studies in natural products chemistry*. Volume 25. Elsevier
- NIST. 2003. Levene Test. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, England, Consultada 10 de febrero de 2003. <http://www.itl.nist.gov/div898/software/dataplot/refman1/auxillar/levetest.html>.
- NORMA OFICIAL DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO. Decreto ejecutivo N° 12 del 20 de octubre de 1954, reformado por decreto ejecutivo N° 6 del 3 de marzo de 1969, derogado por decreto ejecutivo N°27753-MP-MEIC del 8 de abril de 1999.
- SCHMITT A. 2000. Introducción a la espectroscopía de derivadas. Perkin Elmer. Norwak. 11 p.
- SOLÍS L.D. 2003. Desarrollo de un método de análisis de ácido clorogénicos en café. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 62 p.
- UDC. 2003. Homocedasticidad de los errores. Universidad Da Coruña. Coruña, España, Consultada 10 de febrero de 2003. http://www.udc.es/dep/mate/estadistica2/sec4_4.html.
- UNIOVI. 2003. Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Universidad de Oviedo. Oviedo, España, Consultada 10 de febrero de 2003. <http://www.uniovi.es/UniOvi/Apartados/Departamento/Psicologia/metodos/tutor.5/levetest.html>.