



**CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS GENERADOS EN LOS PROCESOS
PRODUCTIVOS DE LA AGROINDUSTRIA DEL CAFÉ**

JULIÁN ZAPATA VARGAS

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS GENERADOS EN LOS PROCESOS
PRODUCTIVOS DE LA AGROINDUSTRIA DEL CAFÉ**

JULIÁN ZAPATA VARGAS

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**TUTOR DE INVESTIGACIÓN
GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
DIRECTOR PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**SANTIAGO DE CALI
2015**

APROBADO POR:

Nora E. Valderruten

Nora E. Valderrutén Posso

Aram J. Panay Escobar

Aram J. Panay Escobar

Guillermo L. Montoya Paláez

Guillermo L. Montoya Paláez
Director del Proyecto.

Santiago de Cali, agosto de 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Icesi, porque es el lugar donde me he formado académicamente; a mi familia por el apoyo brindado durante el desarrollo de mis estudios profesionales. A mi tutor el Doctor Guillermo León Montoya, ya que estuvo pendiente durante el desarrollo de este proyecto y recibí todo su aporte científico para llevarlo a cabo. Además, dedico este trabajo a una persona que ya no está conmigo Daniel Esteban Montoya Giraldo. Y por último agradezco a todos mis compañeros, ya que gracias a ustedes la etapa universitaria ha sido una de las mejores de mi vida.

Tabla de contenido

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	15
2.1 Planteamiento y justificación del problema.....	15
2.2 Marco teórico y estado del arte	16
2.2.1 Consideraciones generales de la producción de café en Colombia ...	16
2.2.1.1 Etapas del proceso productivo del café	17
2.2.2 Biorefinerías y aprovechamiento de la biomasa.....	17
2.2.2.1 Producción de bioetanol y compuestos aromáticos residuales....	18
2.2.3 Fitoquímica de <i>coffea arabica</i>	18
2.2.3.1 Ácido clorogénico y ácido caféico.....	19
2.2.3.1.1 Biosíntesis de los ácidos orgánicos y de la cafeína en la planta	19
19	
2.2.3.2 Cafeína	21
2.2.3.2.1 Biosíntesis de cafeína	21
2.2.4 Descripción de las técnicas utilizadas para el desarrollo del proyecto.	22
2.2.4.1 Cromatografía líquida de alta resolución.	22
2.2.4.2 Detector de fluorescencia	22
2.2.4.3 Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia con acople a un	23
espectrómetro de masas.....	23
2.2.4.4 Técnica de evaluación de propiedad antioxidante por medio del	23
radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	23

2.2.4.5	Técnica de evaluación de propiedad antioxidante por medio de la metodología Oxygen radical absorbance capacity (ORAC).	24
2.3	Objetivos.....	27
2.3.1	Objetivo general	27
2.3.2	Objetivos específicos	27
2.4	Metodología utilizada.....	28
2.4.1	Extracción de los ácidos caféico y clorogénico	28
2.4.2	Estandarización de la las condiciones cromatográficas para la valoración de los ácidos clorogénico y caféico.	29
2.4.3	Valoración de cafeína por medio de la técnica HPLC-PDA.....	30
2.4.4	Determinación de la capacidad antioxidante del residuo por medio de la utilización del método DPPH y evaluando la cinética de neutralización en el Lector de Platos.....	31
2.5	Resultados y discusión.....	32
2.5.1	Resultados obtenidos en la determinación de la presencia de los ácidos orgánicos.....	32
2.5.1.1	Análisis espectroscópico del residuo del café.....	32
2.5.1.2	Análisis espectrométricos del residuo del café.	34
2.5.2	Valoración de cafeína por medio de HPLC-PDA.....	36
2.5.3	Evaluación de la capacidad antioxidante del residuo por medio de las metodologías DPPH y ORAC.	39
2.5.3.1	Resultados DPPH.....	39
2.5.3.2	Resultados ORAC	42
2.6	Conclusiones	48
2.7	Recomendaciones	49
3.	BIBLIOGRAFÍA.....	50

4. ANEXOS.....55

Lista de tablas

Tabla 1. Reactivos utilizados.	28
Tabla 2. Equipos utilizados	28
Tabla 3. Curva de calibración realizada para la valoración de la cafeína en la matriz residual.....	37
Tabla 4. Tabla correspondiente a los datos de la ecuación de la recta hallada para la curva de calibración del radical DPPH y el coeficiente de determinación asociado al ajuste de los datos.....	40
Tabla 5. Obtención de los equivalentes Trolox de cada muestra evaluada.	44

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Cromatogramas correspondientes al estándar de ácido caféico a una concentración de 100ppm y a una solución de residuos con los espectros ultravioleta asociados a un tiempo de retención de 5.147 minutos.....	34
Gráfica 2. Cromatograma correspondiente al corrido cromatográfico realizado al residuo después de haber descartado la presencia de los ácidos clorogénico y caféico en el mismo.	35
Gráfica 3. Espectro ultravioleta y espectro de masas asociado a la banda del corrido cromatográfico anterior a un tiempo de retención de 5,06.	36
Gráfica 4. Cromatograma correspondiente al estándar de cafeína a una concentración de 100 ppm con el espectro ultravioleta asociado a los 3,47 minutos de corrido cromatográfico.	37
Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de la concentración de la cafeína presente en los residuos evaluados.	38
Gráfica 6. Cromatograma correspondiente al corrido cromatográfico de la muestra de residuos a una concentración 1g/100mL para la determinación de la concentración de cafeína con el espectro ultravioleta asociado a los 3,54 minutos de corrido.....	38
Gráfica 7. Curva de calibración del radical DPPH.....	40
Gráfica 8. Disminución de la intensidad de la absorbancia por parte del radical DPPH expuesto a las muestras de ácido gálico, café comercial y una muestra de los residuos.....	41
Gráfica 9. Disminución de la concentración de DPPH en el tiempo, evaluando la capacidad de neutralización del radical DPPH del ácido gálico, café comercial y una muestra de los residuos que se analizaron durante todo el proyecto.	42
Gráfica 10. Curva de calibración del Trolox (Velasco, 2015).	42
Gráfica 11. Evaluación de la disminución de la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína en el tiempo utilizando diferentes tipos de café y una serie de diluciones del residuo obtenido de la producción de café.....	43
Gráfica 12. Curva de calibración del Ácido Caféico en AUC vs Concentración (Velasco, 2015).....	45
Gráfica 13. Curva de calibración para el Ácido Caféico en equivalentes Trolox vs concentración.....	46

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución de ecotopos cafeteros a nivel nacional (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2007)	16
Figura 2. Partes de una cereza de café	18
Figura 3. Biosíntesis del ácido clorogénico.....	20
Figura 4. Biosíntesis del ácido caféico.....	21
Figura 5. Biosíntesis de la cafeína	22
Figura 6. Ecuación de la reacción de neutralización del radical DPPH.....	23
Figura 7. Formación de radical peroxilo a partir del APPH	24
Figura 8. Oxidación de la sonda fluorescente (fluoresceína) por el radical peróxilo.	25
Figura 9. Estructura del ácido gálico.....	31
Figura 10. Placa cromatográfica correspondiente a los residuos evaluados, las abreviaciones utilizadas corresponden a: MS: Material seco; MD: Material deshidratado; MH: Material húmedo; A.C: Ácido caféico. (Ver ítem 2.2.2.1)	33

Lista de anexos

Anexo 1. Condiciones cromatográficas de la combinación de solventes en el tiempo que se utilizaron para los análisis realizados en el HPLC-PDA-FD, para la determinación de ácido caféico en los residuos.....	55
Anexo 2. Condiciones cromatográficas de la combinación de solventes en el tiempo que se utilizaron para los análisis realizados en el UPLC-FDA-MS, para la determinación de moléculas con actividad biológica.	55
Anexo 3. Muestra del cálculo para hallar la concentración de la cafeína en el residuo analizado.....	56
Anexo 4. Muestra del cálculo para hallar las concentraciones de DPPH.....	56
Anexo 5. Ecuación utilizada para encontrar el área bajo la curva de los resultados mostrados en la gráfica 17.....	56
Anexo 6. Muestra de cálculo para hallar los equivalentes trolox de las muestras analizadas.....	57
Anexo 7. Diagrama de Jablonsky para explicar el fenómeno de fluorescencia (De Paula, 2008).....	57

RESUMEN

Las herramientas modernas de análisis han permitido el desarrollo de metodologías que brindan el soporte técnico para realizar la evaluación de matrices complejas, como lo son los residuos agroindustriales.

Al desarrollar este proyecto, se buscaba la extracción y valoración de los ácidos clorogénico y caféico de residuos obtenidos del procesamiento del café, los cuales provenían de fincas cafeteras ubicadas en el norte del Valle del Cauca. Como resultado del primer análisis, se observó una banda cromatográfica extendida sobre toda la placa sin un Rf definido (smear) que no permitió confirmar la presencia o ausencia de estos ácidos. En los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del estándar de ácido caféico se evidenció una banda cromatográfica a un tiempo de retención de 5,147 minutos, y un máximo de absorción en el espectro ultravioleta asociado a dicha banda a 320nm. Con respecto al corrido cromatográfico realizado al residuo proveniente del tratamiento del café, no se observaron Picos cromatográficos al tiempo de retención del estándar; determinándose así que no hay presencia de este ácido.

En los análisis realizados al residuo en el equipo UPLC-MS, se evidenció en todo el cromatograma un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 5,06 minutos, el cual tenía un máximo de absorción en el ultravioleta a 272 nm y un ión molecular a una relación masa/carga de 194,97. De acuerdo con estos resultados se determinó que la molécula es cafeína y que no había presencia del ácido clorogénico. Con respecto a la cafeína, se valoró y se encuentra a una concentración de 6 mg de cafeína/ g de residuo.

A pesar de haber descubierto que los principales ácidos orgánicos biosintetizados por *Coffea arabica* no estaban presentes, el residuo presentó un potencial enorme para estabilizar especies radicalarias oxidantes, de acuerdo con los resultados observados en análisis de neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Por último, utilizando la metodología Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC), se demostró que la capacidad antioxidante del residuo es muy buena y promisoría para múltiples aplicaciones. Los equivalentes trolox del mismo fueron 0,17 ET a una concentración de 1g/500mL. Con respecto al ácido caféico se reporta a un rango de concentraciones entre los 0,2-1 μ M que los equivalentes trolox son 6.63ET, mientras que en el estudio utilizando un rango de concentraciones entre los 1,56-12.50 μ M se encontró que los equivalentes trolox oscilan entre los 0-0,5ET

Palabras claves: ácido caféico, ácido clorogénico, cafeína, antioxidantes.

ABSTRACT

The modern tools of analysis have allowed the development of methodologies which provide all technical support for the evaluation of complex matrices such as agro-industrial waste.

In developing of this project, the extraction and evaluation of chlorogenic acid and caffeic waste matrices obtained from coffee processing sought, which come from coffee farms in the north of Valle del Cauca. As a result of the first analysis corresponding to a planar chromatography, the presence of a chromatographic strip extended over the entire plate without a defined Rf (smear) was observed. In the analysis of liquid chromatography (HPLC), was obtained for standard chromatographic peak caffeic acid to a retention time of 5.147 minutes and an absorption maximum in the ultraviolet spectrum associated with said web 320nm. With regard to the chromatographic run made from coffee residue treatment, a chromatographic retention time standard peak was observed and thus an absorption maximum is not present in the ultraviolet spectrum; thereby no determining the presence of interest acid residues.

The analyzes performed on the residue UPLC and mass spectrometer coupled to a chromatographic strip at a retention time of 5.06 minutes was evident, which had an absorption maximum in the ultraviolet band associated with said at 272 nm; the mass spectrum in which a peak of 194.97 molecular ion corresponding to the chromatographic band was observed was also obtained. According to these results it was determined that the molecule is caffeine, which is evaluated and a concentration of 6 mg caffeine / g of residue.

Despite having found that the main organic acids biosynthesized by *Coffea arabica* were not present, the waste contained a huge potential to stabilize oxidizing radical species. This preliminary result prompted us to undertake an analysis of neutralizing the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), which showed that this residue has good properties of neutralizing free radicals.

Finally using the methodology Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC), it demonstrated that the antioxidant capacity of the waste is very good. The trolox equivalents thereof were 0.17ET at a concentration of 1g/500mL. Regarding caffeic acid is reported to a range of concentrations between 0,2-1 μ M that are 6.63ET trolox equivalent, whereas in the study using a range of concentrations between 1,56-12.50 μ M was found that equivalent trolox range from 0-0,5ET

Keywords: caffeic acid, chlorogenic acid, caffeine, antioxidants.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se sabe que el residuo que se genera a través de la producción de café tostado cuenta con propiedades antioxidantes (Salinas, y otros, 2014), las cuales son relevantes en diversos sectores industriales, entre los que podemos encontrar la industria cosmética, el sector de alimentos y el sector farmacéutico.

Colombia es un país cuya producción agrícola tiene un gran impacto sobre el producto interno bruto (PIB) y el sector caficultor aportó más del 3% del PIB sectorial (Perfetti, 2014), los residuos generados por esta agroindustria se convierten en biomasa desaprovechada, de la cual se pueden obtener otros productos o materiales que podrían incrementar aún más la dinámica de este sector y contribuir a su sostenibilidad económica (Montoya, Avance financiero , 2015).

En el caso de la producción de café, se sabe que las cifras alcanzadas de producción sobrepasan los 12 millones de sacos (entre febrero 2014 y enero 2015) (LATINPYME, 2015), debido a estas cifras se podría proyectar que la generación de residuos es de alrededor de 300.000 toneladas, ya que la pulpa que contiene cada grano de café es de aproximadamente el 30% de su peso total (Murthy & Naidu, 2012).

A pesar de las propiedades que se han encontrado en los residuos, se ha reportado que estos no se disponen de manera adecuada, lo que lleva a contaminación de las fuentes hídricas cercanas a las fincas donde se dan los procesos de producción del café tostado (Murthy & Naidu, 2012).

Para la realización de las sesiones experimentales se utilizaron diferentes herramientas modernas de análisis, entre las que podemos encontrar la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA/FD), el lector de platos y la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UPLC-PDA/MS).

Es importante mencionar que se estaba evaluando la presencia de los compuestos nombrados anteriormente en la matriz residual y que se encontraba reportada su presencia en diferentes órganos de la planta. Para enfrentar este reto analítico de descubrir sustancias de interés en los residuos, se emplearon técnicas de análisis convencionales; sin embargo se determinó que no están presentes en los residuos analizados, con base en los resultados obtenidos. Finalmente, se pudo determinar la presencia de cafeína y evidenciar que estos residuos, a pesar de no poseer ácido clorogénico ni ácido caféico, poseen un potente efecto antioxidante.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 Planteamiento y justificación del problema

El proyecto maneja el concepto de aprovechamiento de la biomasa que se basa en el procesamiento integrado y sustentable para obtener alimentos, biocombustibles, energía térmica, compuestos químicos y materiales con distintos fines productivos. (Bioeconomía Argentina 2014, 2014). Por esta razón los recursos biológicos renovables, como vegetales y animales, son cada vez más importantes tanto para satisfacer la demanda de alimentos sanos y seguros como para la obtención de materiales y productos químicos. El café es uno de los productos agrícolas más representativos de Colombia (Revista Semana, 2013) y a pesar de la volatilidad del precio del café en mercados internacionales, seguirá siendo una cadena agrícola priorizada por el gobierno nacional.

El procesamiento del café implica la generación de subproductos en cifras aún no documentadas, pero cuya biomasa es poco aprovechada para la generación de nuevos procesos industriales. Las investigaciones basadas en el análisis del ácido clorogénico y caféico han demostrado que se encuentran en una gran proporción en la pulpa debido a la producción de café tostado (Murthy & Naidu, 2012). Además de lo anterior, varias investigaciones han evidenciado la propiedad antioxidante de estas moléculas, lo que desde el punto de vista industrial resulta interesante para aplicaciones en sectores como el farmacéutico, cosmético y alimenticio. (Panusa, Zorro, Lavecchia, Marrosu, & Petrucci, 2013)

Teniendo en cuenta resultados de experimentos preliminares, el aprovechamiento de la biomasa obtenida de residuos agroindustriales para la generación de bioproductos que convencionalmente son obtenidos por métodos sintéticos, hacen a esta propuesta no solo ambientalmente amigable, sino además económicamente promisorio.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Consideraciones generales de la producción de café en Colombia

Desde principios del siglo XX, el café ha sido el producto de mayor sostenibilidad económica y aporte a las exportaciones del país y se sabe que la distribución de este sector económico ha estado estrictamente repartida en zonas rurales del país, promoviendo el desarrollo y producción de empleo a las personas residentes en el campo. (Silva, 2004)

El centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé), realizó una zonificación de los sectores cafeteros del país, la cual llamaron “Ecotopos Cafeteros”, entendiéndose por ecotopo a una región agroecológica que se encuentra delimitada geográficamente considerando las condiciones del clima, del suelo y el relieve, además de la respuesta biológica similar por parte del cultivo del café. A continuación se presentará una imagen de la distribución por ecotopos cafeteros a lo largo de todo el país:

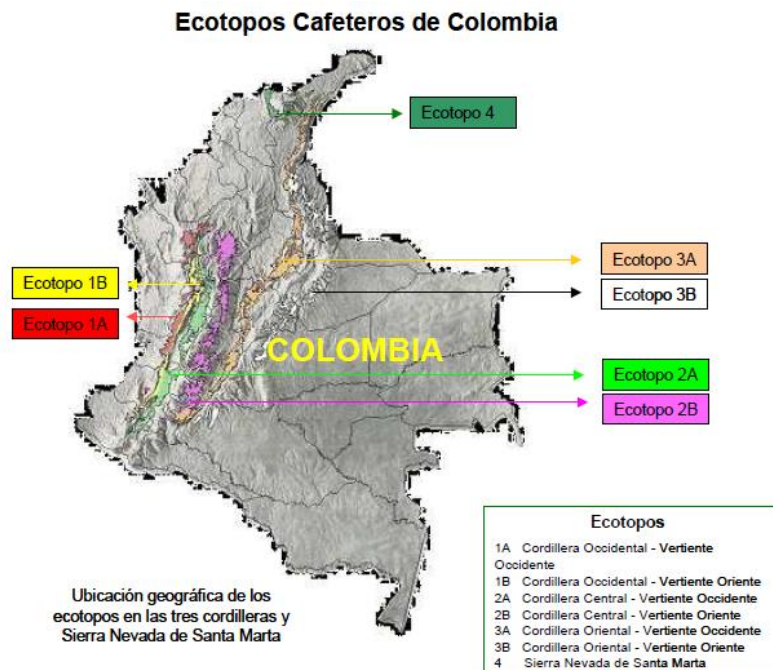


Figura 1. Distribución de ecotopos cafeteros a nivel nacional (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2007)

En la figura 1 se puede observar cómo el sector cafetero está ampliamente distribuido, los ecotopos marcados en el mapa abarcan cerca de 580 municipios en los que se da todo el proceso de producción del café. Estudios realizados han demostrado que el número de hectáreas en las cuales se produce café en el país, está alrededor de las 881000 y que para la labor de producción hay alrededor de 518 mil caficultores (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2007).

2.2.1.1 Etapas del proceso productivo del café

Con respecto a la producción de los cultivos de café se siguen los siguientes pasos:

1. Siembra.
2. Crecimiento, el crecimiento de las plantas requiere ciertos cuidados, para poder obtener cultivos sanos y de buena calidad.
3. Producción, donde se promueve el cuidado de la tierra ya sembrada, con el fin de obtener semillas de buena calidad
4. Cosecha, la recolección de los lotes de café maduro, se realiza a mano, lo que permite iniciar el procesamiento de los frutos de nuevo.
5. Post-Cosecha, el periodo de post-cosecha incluye una serie de procesos que se le hacen a las cerezas del café y es aquí donde empieza la obtención de los subproductos a aprovechar en el proyecto, estos procesos son:
 - Beneficio húmedo (Despulpado, fermentación y lavado): en este paso se realizan procesos de despulpación y desmucilaginación, con el fin de obtener el grano desnudo y llevarlo a los procesos de secado y transporte.
 - Secado: el secado de los granos es parte fundamental para la obtención de café tostado de buena calidad.
 - Transporte: asegurar una buena forma de transportar el material, evita la contaminación con hongos y otros patógenos de los granos. (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2007)

Después de haber descrito los pasos involucrados en la producción del café, se hace muy importante realizar la descripción del tratamiento que se realiza al beneficio por parte de asociaciones caficultoras del norte del Valle, ya que en uno de los procesos que se realizan se obtiene la materia que será analizada en este proyecto.

2.2.2 Biorefinerías y aprovechamiento de la biomasa

La FUNDACIÓN ENTORNO ha generado un sistema de producción de Bioetanol, en el cual se aprovecha el beneficio del café que se obtiene por los procesos de despulpado y desmucilaginado de las cerezas de café, generalmente el sector cafetero no hace uso de este beneficio por lo que la disposición se hace de manera inadecuada, ya que usualmente se arrojan estos residuos a las fuentes

hídricas causando contaminación debido a la putrefacción de la materia orgánica residual (Murthy & Naidu, 2012).

2.2.2.1 Producción de bioetanol y compuestos aromáticos residuales

Los procesos de los cuales se encarga la FUNDACIÓN ENTORNO inician con el transporte del beneficio del café hasta la planta de producción de Bioetanol, y aquí empiezan procesos de fermentación alcohólica para la obtención de un etanol apto para la utilización como combustible o materia prima. Después de realizar los procesos de fermentación y obtención de este alcohol, se obtiene una materia que se puede encontrar como material seco (MS), Material deshidratado (MD) y material húmedo (MH), el material seco es finalmente el residuo que se pretende analizar en este proyecto como parte de una fase exploratoria, (Entorno, 2013).

2.2.3 Fitoquímica de *coffea arabica*

Para hablar acerca de la fitoquímica correspondiente al *coffea arabica*, es importante tener en cuenta las partes de una cereza de café, las cuales se muestran a continuación:

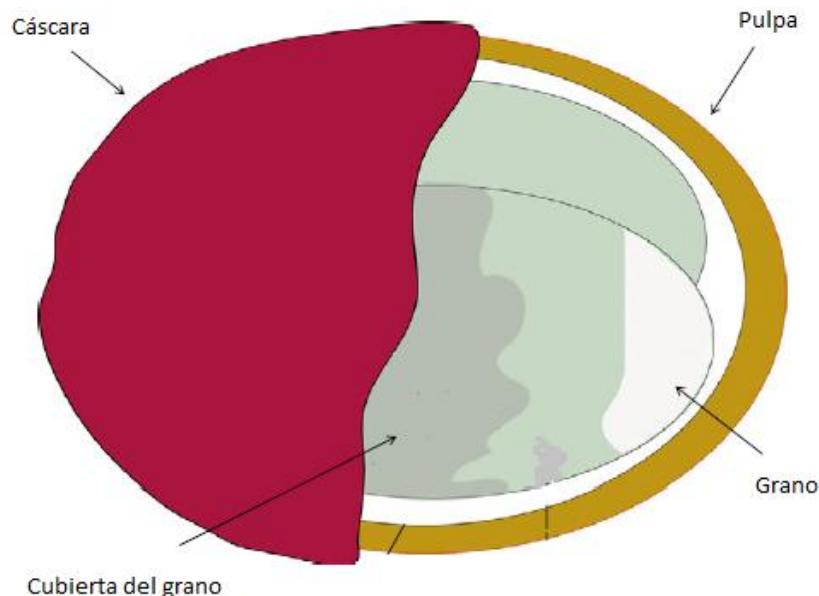


Figura 2. Partes de una cereza de café

Con respecto a cada sección de la cereza del café señalada en la figura 2, se ha reportado que cuenta con una gran cantidad de grupos de moléculas como: celulosas, proteínas, grasas, fibra, polifenoles, azúcares, sustancias pépticas, lignina, taninos, ácidos clorogénicos y cafeína (Murthy & Naidu, 2012).

En cuanto a las moléculas de interés, se ha reportado que el ácido caféico Y ácido clorogénico, se encuentran respectivamente a un porcentaje de 1.6% y 2.6% del

total de la pulpa de una cereza de café y el porcentaje de cafeína en la pulpa que se reporta en literatura es del 1,5%; es importante resaltar que se mencionan los datos correspondiente a la pulpa del café, ya que esta es la que se utiliza para la producción de bioetanol y finalmente de este proceso es que se obtuvieron los residuos que se analizaron en este estudio.

Con respecto a las moléculas de interés se mostrará a continuación una breve descripción de ellas:

2.2.3.1 Ácido clorogénico y ácido caféico

El ácido caféico y el ácido clorogénico son compuestos fenolicos, metabolitos esenciales para el crecimiento y producción de las plantas, ya que le proveen a estas protección frente a patógenos. Son secretadas como mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés, entre las que se pueden encontrar infecciones, radiaciones UV, etc. La síntesis de este se da a partir de la ruta del ácido Shikimico (Muños, Ramos, Alvarado, & Castañeda, 2007).

2.2.3.1.1 Biosíntesis de los ácidos orgánicos y de la cafeína en la planta

La **figura 3** muestra la biosíntesis del ácido clorogénico, la cual inicia con la reacción de la fenilalanina con la enzima fenilalanina amino liasa (PAL), la cual produce el ácido cinámico, esta molécula reacciona con la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H) formando el ácido p-coumárico este ácido reacciona con la enzima 4-hidroxicinamoil CoA ligasa (4CL) y esta reacción forma la molécula p-coumaril CoA. En este punto de la biosíntesis el p-coumaril CoA reacciona con las transferasas de la hidroxicinamoil CoA (HCT/HQT) y con el ácido quínico, estas reacciones dan como resultado la producción de la molécula ácido p-cumarilquínico, por último este ácido reacciona con la enzima p-cumaril éster 3'-hidroxilasa lo que da como resultado la formación del ácido clorogénico (Rocha , 2012)

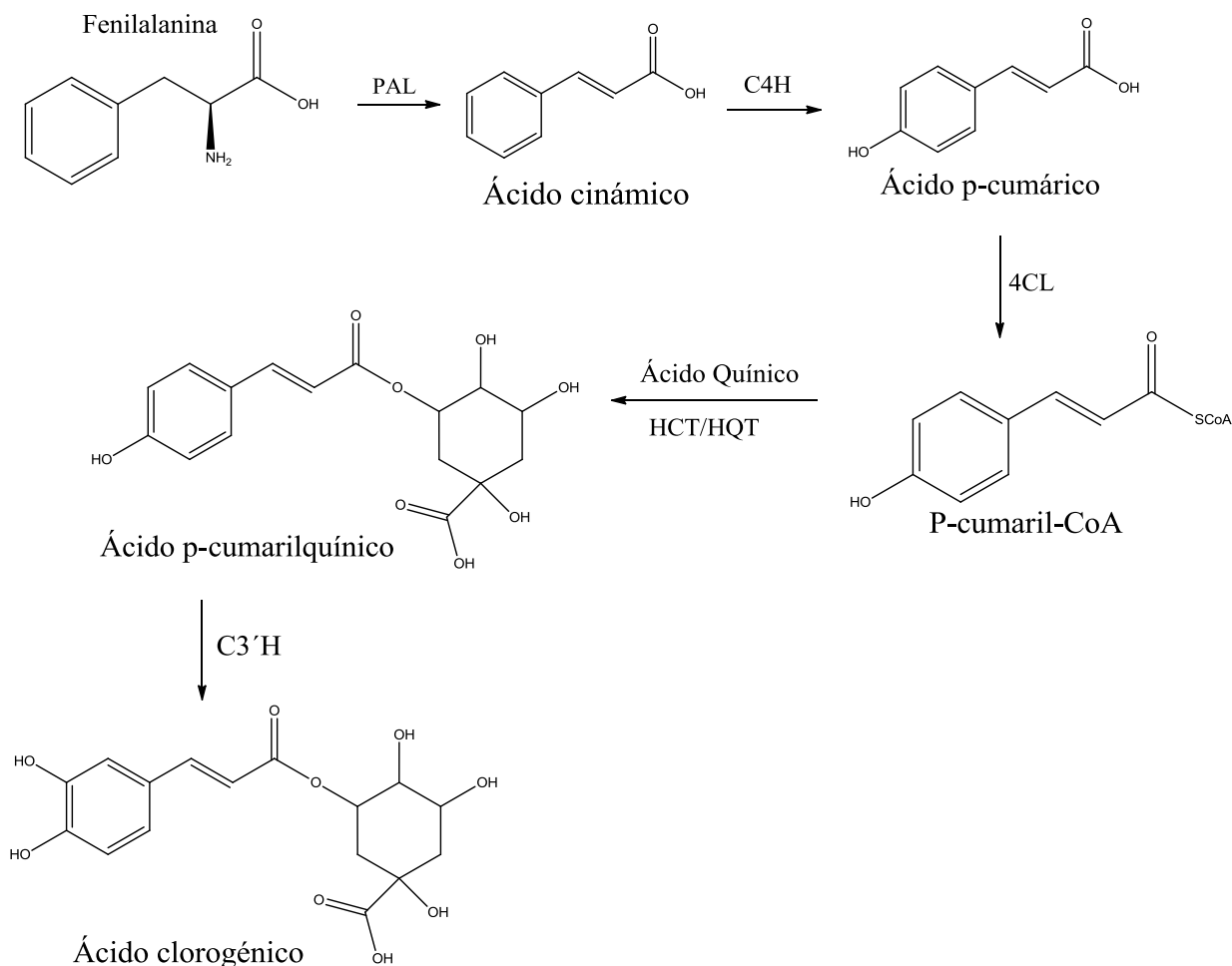


Figura 3. Biosíntesis del ácido clorogénico (Ácido 5-O-Cafeoilquínico).

La **figura 4** muestra la biosíntesis del ácido caféico, la cual cuenta con sólo tres pasos, el primer paso se da con la reacción de la fenilalanina con la enzima fenilalanina-aminoliasa (PAL), formando el ácido cinámico, este ácido reacciona con la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y se forma el ácido p-cumárico, por último este ácido reacciona con la enzima 4-cumarato-3-hidroxilasa (C3H) y se da la formación del ácido caféico (Benítez, 2005)

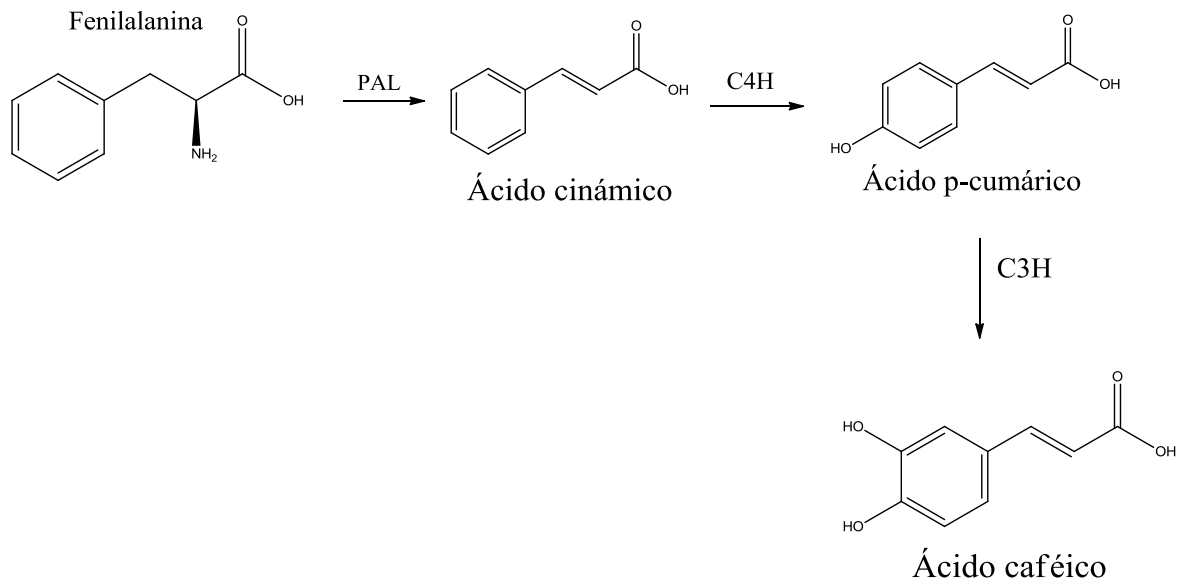


Figura 4. Biosíntesis del ácido caféico (Ácido 3,4-dihidroxicinámico).

2.2.3.2 Cafeína

La cafeína es un alcaloide purínico (Ashihara, 2006) que puede ser encontrado en el café y en el té (Herman & Herman, 2013). Se ha evidenciado que la cafeína presente en las plantas cuenta con propiedades antifúngicas y antimicrobianas, por lo que ayuda al desarrollo sano de la planta (Campos, Loarca, Vergara, & Oomah, 2015).

2.2.3.2.1 Biosíntesis de cafeína

El primer paso de la síntesis de la cafeína, inicia con la conversión de la xantosina a 7-metilxantosina por medio de un donador de grupo metilo como lo es la molécula s-adenosil-l-metionina (SAM), para donar el grupo metilo esta molécula es asistida por la enzima (1) 7-metilxantosina sintasa (xantosina N-metiltransferasa), el segundo paso de la síntesis consiste en la conversión de la molécula 7-metilxantosina en 7 metilxantina por medio de la hidrólisis de la 7-metilxantosina, por medio de la enzima (2) N-metilnucleosidasa, el tercer paso consiste en una reacción similar a la del primer paso de la síntesis donde se convierte la molécula metilxantosina en 7-metilxantina, con la diferencia de la enzima que asiste a la molécula SAM que en este caso es la (3) Tebromina sintasa (monometilxantina N-metiltransferasa), la última etapa consiste en una reacción similar a la de los pasos 1 y 3 donde se convierte la molécula 7-metilxantina en cafeína, pero en este caso la enzima que asiste a SAM es la (4)Cafeína sintasa (dimetilxantina N-metiltransferasa) (Ashihara, Sano, & Crozier, 2008)

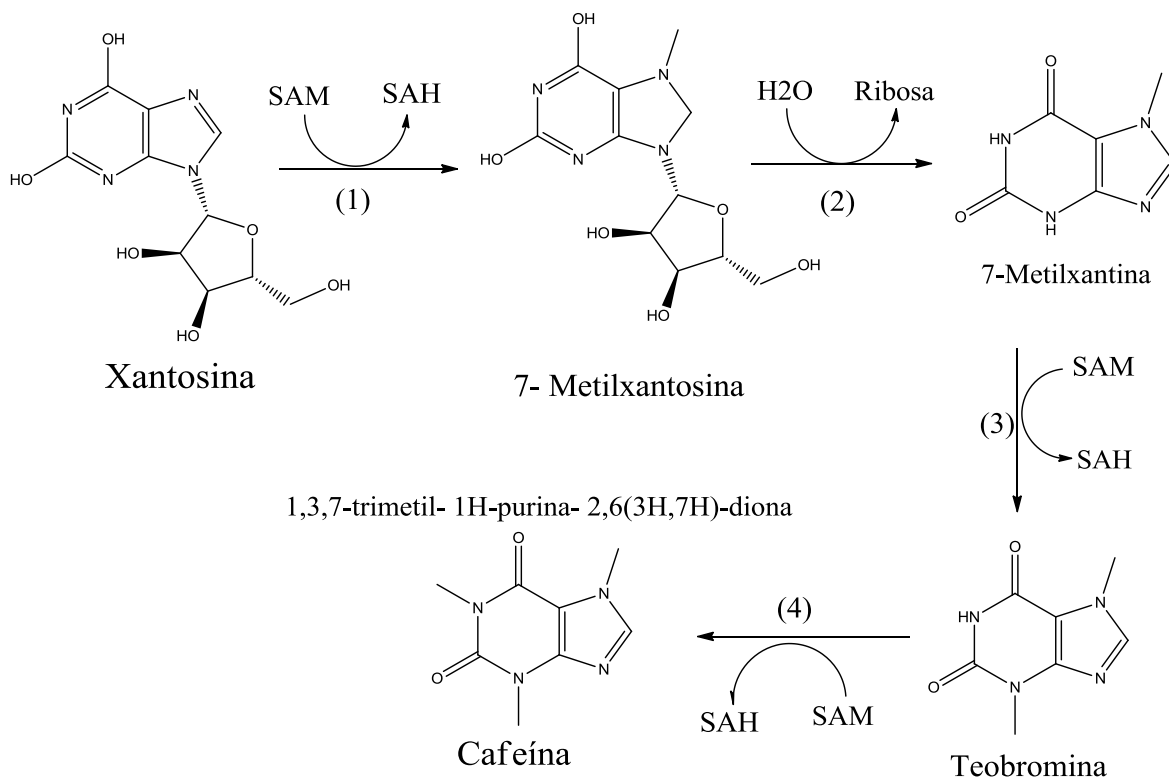


Figura 5. Biosíntesis de la cafeína (1,3,7-Trimetilxantina).

2.2.4 Descripción de las técnicas utilizadas para el desarrollo del proyecto.

2.2.4.1 Cromatografía líquida de alta resolución.

Para la determinación de la presencia de estos ácidos en la matriz residual, se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de fluorescencia, la cual es una técnica que utiliza diferentes solventes como eluentes (Fase móvil) para que los analitos, que se transportan por los solventes, interaccionen con las partículas que se encuentran empacadas (Fase estacionaria) en la columna cromatográfica, obteniéndose una separación de los mismos (Harris, 2007).

2.2.4.2 Detector de fluorescencia

Con respecto al detector de fluorescencia, el cual está acoplado al cromatógrafo, se sabe que este dispositivo es muy selectivo, dado que tiene la capacidad de detectar moléculas que puedan absorber y emitir luz a un conjunto específico de longitudes de onda y estas longitudes de onda son características de cada compuesto, debido a lo anterior esta técnica de detección es muy selectiva, además que hay relativamente pocas moléculas con la capacidad de producir fluorescencia (Hage & Carr, 2011).

A parte de la selectividad, los detectores de fluorescencia cuentan con 2 atributos más que son la especificidad y la sensibilidad, lo que reduce el número de moléculas que pueden analizarse utilizando este tipo de metodologías.

2.2.4.3 Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia con acople a un espectrómetro de masas

La separación e identificación de analitos de las muestras analizadas, podría realizarse también por medio del acople de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas y a pesar de que su utilización aumentaría los gastos con respecto al presupuesto destinado para el proyecto, es de suma importancia mencionar que este acople se convierte en una herramienta muy poderosa de separación de analitos y su posterior identificación, con una especificidad más alta. (Montoya, 2011).

2.2.4.4 Técnica de evaluación de propiedad antioxidante por medio del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Debido a la gran actividad antioxidante que se puede atribuir a algunas moléculas presentes en el residuo analizado en este estudio, se hace importante el uso de técnicas que permitan evaluar dicha actividad. En este sentido cabe mencionar que se realizaron algunas pruebas preliminares con el método DPPH, el cual consiste en la utilización de un radical estable, que tiene un máximo de absorción en el ultravioleta a una longitud de onda entre 517 y 520 nm. Esta sustancia pierde esta propiedad cuando es estabilizada por la donación de protones de un agente antioxidante, por lo que se evalúa la disminución en la concentración en el tiempo en una solución metanólica del radical en presencia de los antioxidantes evaluados (Kedare & Singh, 2011). A continuación se muestra la ecuación de la reacción de neutralización del radical DPPH.

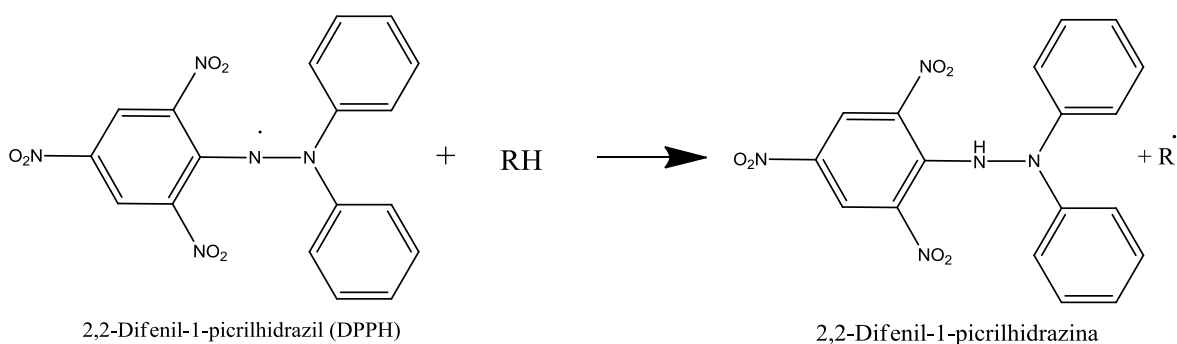


Figura 6. Ecuación de la reacción de neutralización del radical DPPH con moléculas polifenólicas.

2.2.4.5 Técnica de evaluación de propiedad antioxidante por medio de la metodología Oxygen radical absorbance capacity (ORAC).

La medida de esta capacidad por la metodología ORAC, consiste básicamente en la inhibición de radicales tipo peroxilo, los cuales son obtenidos a partir de la molécula 2,2'-azobis-amidinopropano-dihidrocloruro denominado (APPH). Esta molécula se descompone por efecto de la temperatura y produce nitrógeno molecular y radicales alquilo los cuales al entrar en contacto con el oxígeno singlete forman las especies peróxilo, la formación de estos radicales se muestra en la siguiente figura.

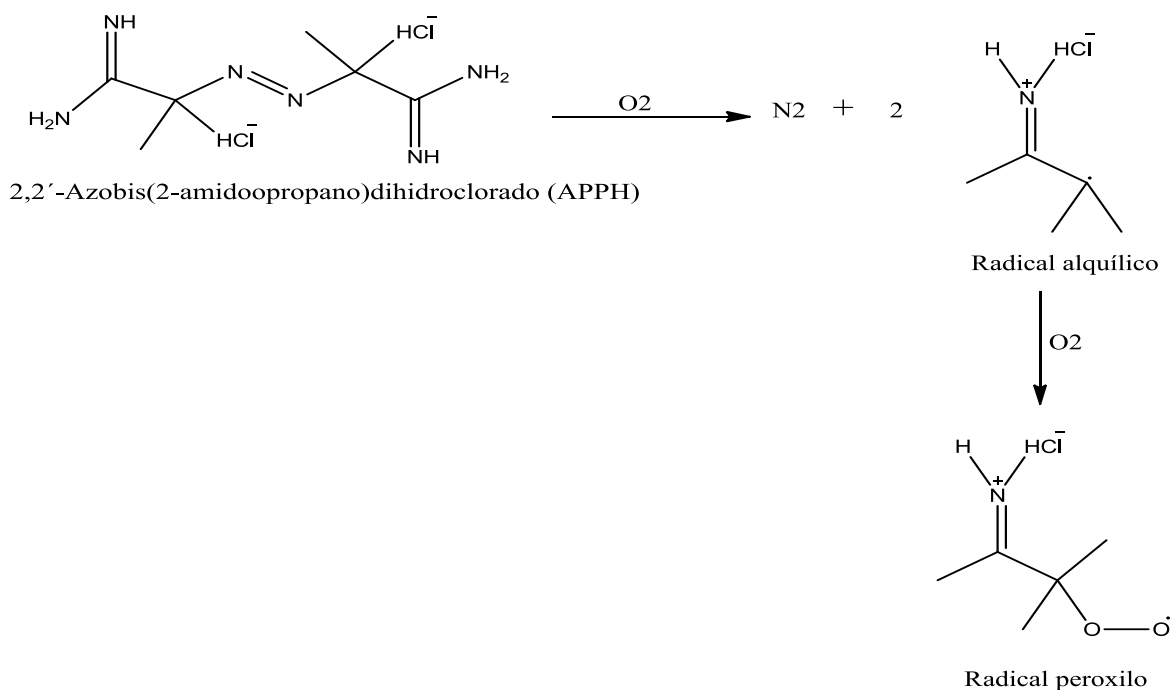


Figura 7. Formación de radical peroxilo a partir del APPH

Cuando se forman los radicales entran en contacto con sustancias fluorescentes (sondas), promoviendo la disminución de su fluorescencia por medio de la oxidación de la sonda, la siguiente figura muestra el mecanismo de reacción mediante el cual se oxida una sonda (fluoresceína).

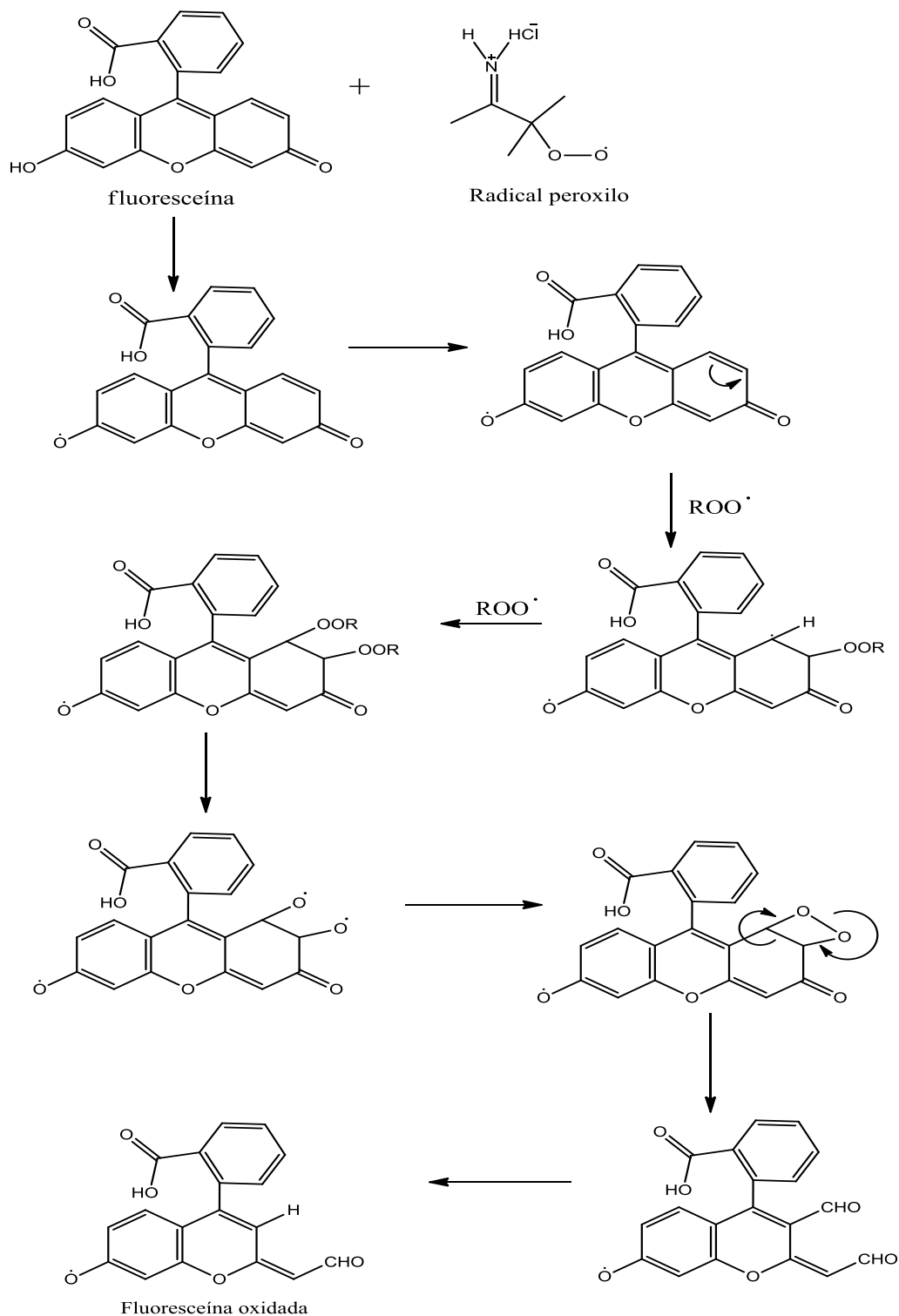


Figura 8. Oxidación de la sonda fluorescente (fluoresceína) por el radical peróxilo.

Para medir la capacidad antioxidante, se adiciona un agente que presenta la propiedad de neutralizar radicales libres y se evalúa la capacidad de retardar la

degradación de las moléculas fluorescentes, esto se logra cuantificando la disminución de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo. En la medida que el potencial antioxidante de la sustancia que se está evaluando es mayor, más lentamente va a disminuir la intensidad de la fluorescencia. (Zuleta, Esteve, & Frígola, 2009).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Extraer los ácidos clorogénico y caféico de residuos generados por asociaciones de caficultores del norte del Valle y estandarizar una metodología para su valoración por HPLC-FD.

2.3.2 Objetivos específicos

- Realizar una extracción de los ácidos clorogénico y caféico a partir de residuos generados por la producción de Bioetanol a partir del beneficio del café, por parte de la FUNDACIÓN ENTORNO.
- Estandarizar la metodología de valoración de los ácidos clorogénico y caféico, con el fin de determinar la concentración de los mismos en el extracto obtenido, por medio de la utilización de la técnica HPLC-FD.

2.4 Metodología utilizada

Reactivos utilizados para la realización del proyecto

Tabla 1. Reactivos utilizados.

Reactivo	Marca	Pureza
2.2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich	99.9%
Acetonitrilo	Sigma Aldrich	99.9%
Ácido acético	Sigma Aldrich	99.8%
Ácido fórmico	Merck	99.6%
Etanol	Merck	99.9%
Metanol	Sigma Aldrich	99.9%

Equipos utilizados para la realización del proyecto

Tabla 2. Equipos utilizados

Equipos	Marca
Vaso de precipitados 1000mL	Schott
HPLC-PDA-FD	Merck Hitachi
UPLC-PDA-MS	Waters
Lector de platos	Multi-Modal Synergy H1

2.4.1 Extracción de los ácidos caféico y clorogénico

La extracción de los ácidos clorogénico y caféico se realizó de la siguiente manera:

- Recepción de los residuos generados por la producción de Bioetanol a partir del beneficio del café, por parte de la FUNDACIÓN ENTORNO.
- Realizar el pesaje de los residuos.

- Disponer de los residuos en un vaso de precipitados y adicionar una mezcla de etanol: agua (70:30) en cantidad suficiente para que toda la masa residual este en contacto con la mezcla hidroalcohólica.
- Llevar el vaso de precipitados a un proceso de sonicación por 15 minutos
- Realizar los dos pasos anteriores por triplicado.
- Realizar un proceso de rotaevaporación, para recuperar el etanol utilizado en la extracción, destilarlo y disponer de él para otras investigaciones.
- Llevar el extracto a un proceso de liofilización para eliminar el agua acumulada en el mismo.
- Recuperar el polvo liofilizado acumulado en los balones del equipo y disponer de ellos para realizar la valoración.

Los pasos anteriores se fundamentan básicamente en dos conceptos:

- La extracción de los ácidos clorogénico y caféico se realiza con la mezcla hidroalcohólica, ya que se sabe que el ácido caféico es muy soluble en alcohol (Pubchem), al igual que el ácido clorogénico, la solubilidad de este en etanol es 25mg/mL (Cayman Chemical , 2012)
- El etanol es un solvente ampliamente utilizado en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos (U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2012), y teniendo en cuenta que los resultados del proyecto tienen estas industrias como foco principal, se hace muy importante manejar este tipo de estrategias de extracción, para no tener problemas de toxicidad causado por trazas de solventes.

Para verificar la presencia de los ácidos clorogénico y caféico en el extracto se utilizó la cromatografía planar de acuerdo a la metodología planteada en el Plant Drug Analysis (Wagner & Blatt, 1996).

2.4.2 Estandarización de la las condiciones cromatográficas para la valoración de los ácidos clorogénico y caféico.

La estandarización de la metodología de valoración de los ácidos clorogénico y caféico en el extracto se realizó de la siguiente manera:

- Utilizar el equipo Lector Multi-Modal Synergy H1, con el fin de obtener la longitud de onda de emisión de cada una de las moléculas, utilizando estándares y con estos resultados poder establecer las condiciones de operación del cromatógrafo acoplado al detector de fluorescencia y al detector de arreglo de fotodiodos.
- Realizar corridos cromatográficos con estándares de las moléculas, con el fin de obtener un cromatograma en el que los tiempos de retención de las moléculas sea inferior a los 10 minutos de análisis. Los corridos cromatográficos se van a hacer utilizando como fase móvil mezclas de acetonitrilo, agua y metanol.

Cabe mencionar que esta metodología fue propuesta para la extracción y valoración de los ácidos clorogénico y caféico como parte de una fase exploratoria de los residuos analizados, sin embargo en esta primera parte no se determinó la presencia del ácido caféico. Con respecto a la presencia del ácido clorogénico se realizó la metodología que se plantea a continuación, además esta metodología también se planteó con el fin de determinar moléculas con actividad biológica.

Evaluación de los compuestos presentes en la matriz residual liofilizada.

- Establecer las condiciones cromatográficas del equipo UPLC (ACQUITY UPLC System).
- Establecer las condiciones de ionización del espectrómetro de masas (SQ Detector 2).
- Realizar una solución de un gramo de residuo liofilizado en 100 mL metanol.
- Realizar una estandarización de los corridos cromatográficos, con el fin de obtener bandas separadas y así poder tener buenos resultados en la identificación.
- Realizar un corrido cromatográfico para realizar la separación de los analitos y permitir el paso de estos al espectrómetro de masas para poder realizar la identificación de acuerdo a los picos de ión molecular y a su relación con la banda cromatográfica.

Los resultados obtenidos con el experimento planteado anteriormente no evidenciaron la presencia del ácido clorogénico pero permitieron la identificación de la cafeína, por lo que se realizó una metodología de la valoración de la misma utilizando HPLC-PDA realizando los siguientes pasos.

2.4.3 Valoración de cafeína por medio de la técnica HPLC-PDA

- Estandarizar las condiciones cromatográficas del equipo con el fin de poder identificar la cafeína aproximadamente entre los 3-6 minutos de corrido.
- Después de haber estandarizado las condiciones del equipo y obtener un tiempo de retención dentro de los límites que se plantearon para la cafeína, realizar un corrido cromatográfico con una solución de los residuos en metanol, con el fin de verificar la aparición de la misma en el tiempo de retención establecido.
- Realizar una curva de calibración con estándar de cafeína de las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 20, 40,60 y 100 ppm.
- Revisar la linealidad de la curva por medio del coeficiente de determinación (R^2) que se obtenga al tratar los datos obtenidos.
- Realizar una solución de los residuos a una concentración de 1g residuos/100mL de etanol, y realizar un corrido cromatográfico.

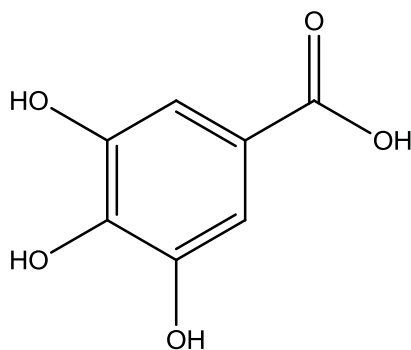
Después de haber obtenido el valor aproximado de la cantidad de cafeína presente en el residuo, se realizó un análisis de determinación de la capacidad antioxidante por medio de la utilización del método DPPH, el cual usa el radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), cabe mencionar que la técnica se aplicará a todo el residuo y no se va a atribuir la capacidad antioxidante a moléculas en específico. (Kedare & Singh, 2011)

2.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante del residuo por medio de la utilización del método DPPH y evaluando la cinética de neutralización en el Lector de Platos

- Estandarizar las condiciones del equipo con respecto a la absorbancia a 517nm (Kedare & Singh, 2011) y condicionar lecturas a cada 3 minutos durante 2 horas.
- Realizar una curva de calibración por triplicado a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppm
- Realizar una solución de una concentración de 100ppm del radical DPPH en etanol.
- Realizar las soluciones a evaluar a una concentración de 1mg/500mL, (las soluciones evaluadas fueron de ácido gálico, café comercial y los residuos).
- En un plato de 96 pozos para el equipo Lector Multi-Modal Synergy H1, realizar siembras de 100µL para el solvente y para las muestras a evaluar (las muestras se analizan por duplicado y se realiza un promedio con las dos medidas).

La utilización del ácido gálico se fundamenta en que es un polifenol que cuenta con altas propiedades antioxidantes y además de esto es utilizado como estándar de comparación en este tipo de estudios (Yen, Duh, & Tsai, 2002), la estructura de este ácido es la siguiente:

Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico



Ácido Gálico

Figura 9. Estructura del ácido gálico.

2.5 Resultados y discusión

A continuación se van a mostrar los resultados obtenidos durante la fase experimental del proyecto y la discusión de los mismos. Es muy importante resaltar que a pesar de que se tenía planificada la extracción y valoración de los ácidos clorogénico y caféico de la matriz residual, estas moléculas no se encontraron en el residuo. Sin embargo, se encontró que el residuo contenía cafeína, por lo que se re-direccionó el proyecto proponiendo la metodología para la valoración de la cafeína, y además evaluar las propiedades antioxidantes del residuo utilizando metodologías internacionales.

2.5.1 Resultados obtenidos en la determinación de la presencia de los ácidos orgánicos

Para la evaluación de la presencia de los ácidos en este estudio, se utilizaron técnicas de separación que están acopladas a detectores espectroscópicos y detectores espectrométricos, los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

2.5.1.1 Análisis espectroscópico del residuo del café

La primera parte del estudio consistió en un análisis del residuo por medio de técnicas de separación cromatográficas y técnicas de detección espectroscópicas. La detección espectroscópica consiste en el estudio de la interacción de los átomos y moléculas con la radiación electromagnética (Zuluaga & Insuasty, 1993).

Después de realizar la extracción, se hizo una cromatografía planar como se describe en el libro *Plant Drug Analysis* (Wagner & Bladt, 1996), en el cual se especifican las condiciones para la separación de los ácidos clorogénico y caféico. No obstante, como se muestra en la figura 10, no se observaron bandas cromatográficas definidas en la placa, en cambio se aprecia una banda extendida (smear) en la cual no se puede definir la separación de los compuestos de interés. El resultado observado es atribuible a que la composición del residuo cuenta con una alta concentración de moléculas orgánicas.

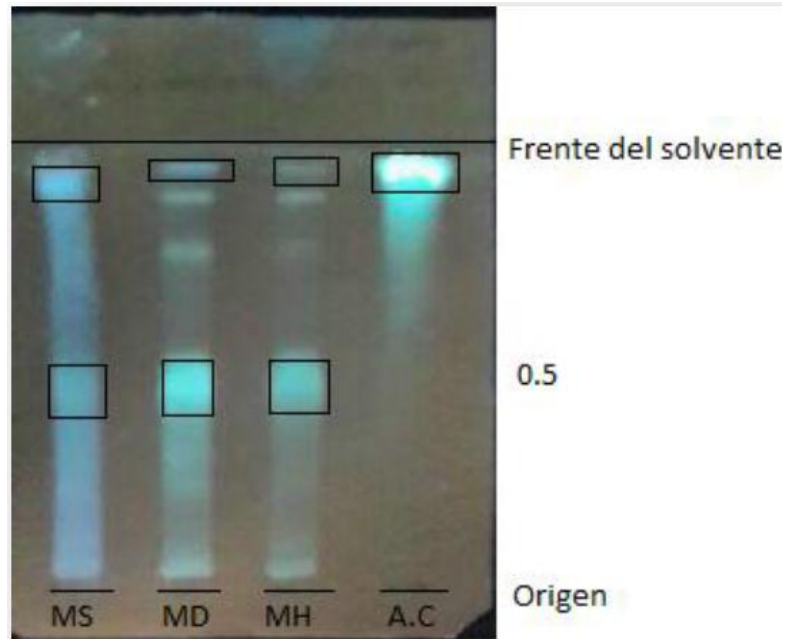
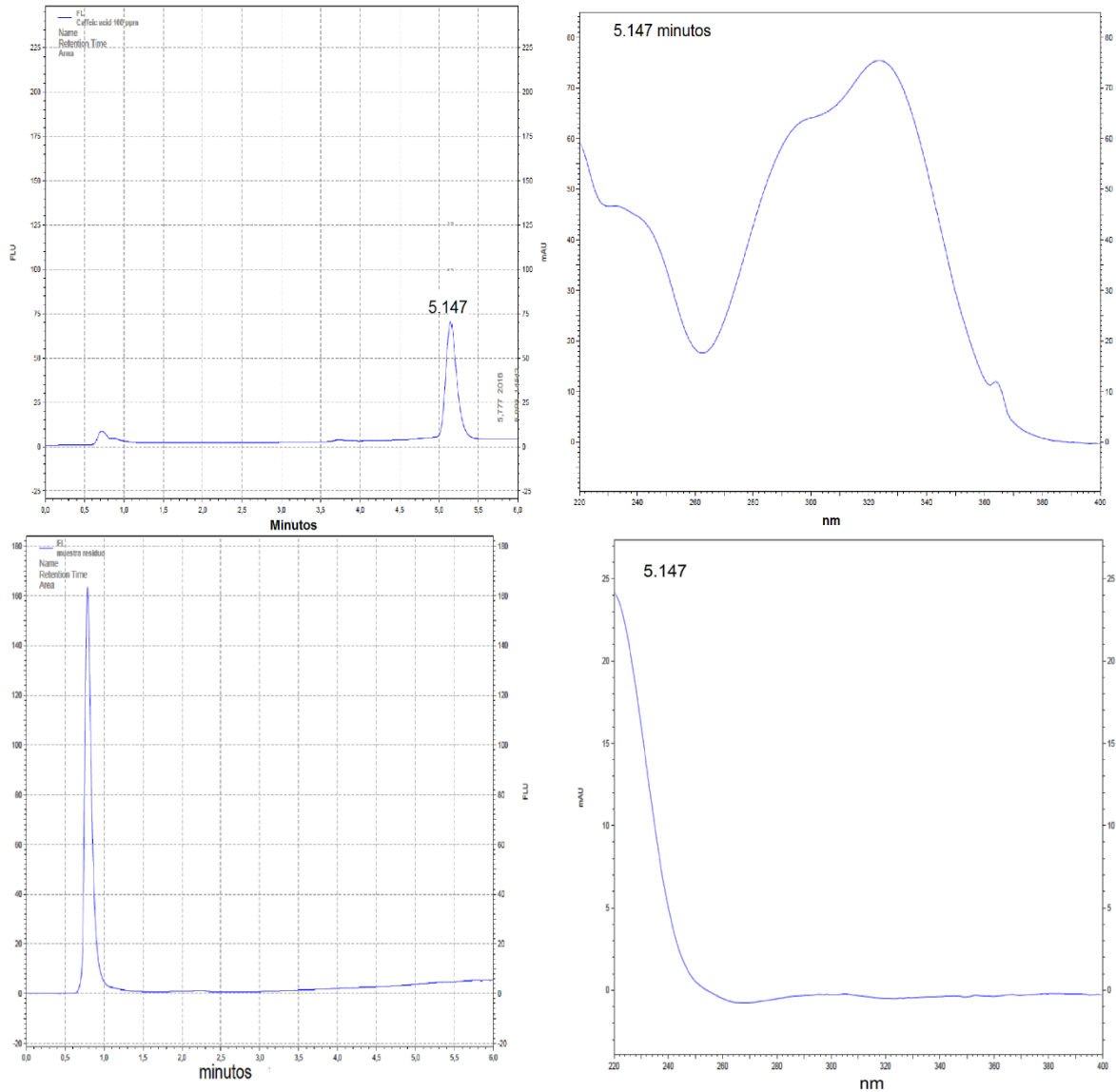


Figura 10. Placa cromatográfica correspondiente a los residuos evaluados, las abreviaciones utilizadas corresponden a: MS: Material seco; MD: Material deshidratado; MH: Material húmedo; A.C: Ácido caféico. (Ver ítem 2.2.2.1).

Posterior a la realización de la cromatografía planar, se siguió con el procedimiento establecido para lograr la determinación de los ácidos por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (técnica de separación) acoplada a un detector de fluorescencia (FD) y un detector de arreglo de fotodiodos (PDA).

En cuanto a la estandarización de las condiciones cromatográficas se utilizó agua y acetonitrilo como solventes de elución, además se utilizó una columna C18 (50x2, 1mm, 2.5 μ m) como fase estacionaria (Panusa, Zuorro, Lavecchia, MARrosu, & Petrucci, 2013). Al haber estandarizado el método cromatográfico, se realizó la corrida del estándar de ácido caféico, seguido del corrido cromatográfico de la muestra. Los resultados de esto se encuentran consignados en la gráfica 1, donde se muestra los cromatogramas y los espectros ultravioleta tanto del ácido caféico (imagen superior), como del residuo (imagen inferior). En el cromatograma correspondiente al ácido caféico, se observó la presencia de un pico con un tiempo de retención de 5,1 minutos y un máximo de absorción de 322nm, resultados que coinciden con lo reportado en la literatura (Conrad, Caudron, & Merlin, 2006). En cuanto al cromatograma del residuo, no hay evidencia de un pico cromatográfico al tiempo de retención del estándar, por lo tanto se descartó la presencia de este ácido.



Gráfica 1. Cromatogramas correspondientes al estándar de ácido caféico a una concentración de 100ppm y a una solución de residuos con los espectros ultravioleta asociados a un tiempo de retención de 5.147 minutos.

Debido a que no se contaba con un estándar de ácido clorogénico para realizar un procedimiento con la técnica HPLC, se optó por determinar la presencia de este ácido por medio de la utilización del equipo UPLC-PDA-MS y la metodología planteada, para poder determinar también moléculas con propiedades biológicas.

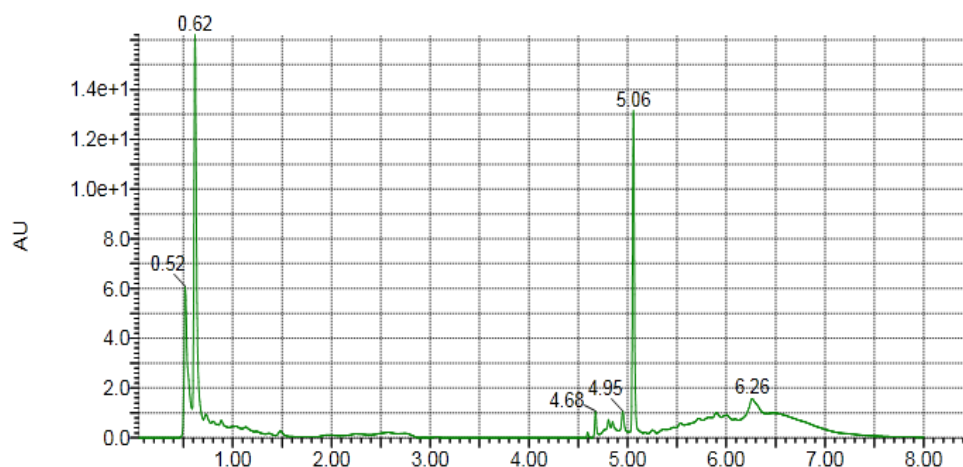
2.5.1.2 Análisis espectrométricos del residuo del café

Para lograr la separación del ácido clorogénico y/u otras moléculas con actividad biológica, se utilizó la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), para la

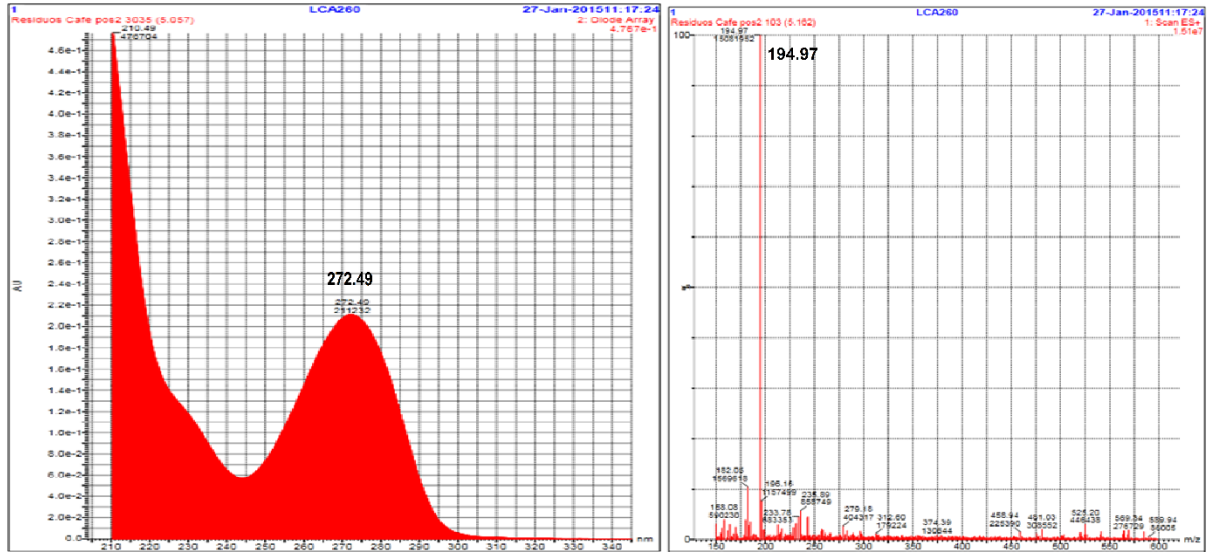
separación de moléculas y la técnica espectrométrica para la detección. La detección espectrométrica consiste básicamente en la ionización de las moléculas a analizar y la evaluación de la relación masa/carga de cada señal que aparezca en un espectro (UPLC-PDA-MS).

Después de haber realizado los análisis al residuo en el equipo UPLC-PDA-MS, se obtuvo el cromatograma reportado en la gráfica 2 donde se aprecia un pico cromatográfico con un tiempo de retención a los 5,06 minutos. Además en la gráfica 3 se observan el espectro ultravioleta y el espectro de masas del pico cromatográfico; el espectro ultravioleta tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 272,49 nm, encontrándose un valor teórico de máximo de absorción de la cafeína a esa misma longitud de onda (Belay, Ture, Redi, & Asfaw, 2008). Con respecto al espectro de masas, se observó un pico de ión molecular con una abundancia del 100% de un compuesto con una relación masa/carga de 194,95 y se ha reportado que el peso de la cafeína es de 194,19 g/mol (Chemspider, 2015). Debido a este hallazgo y a la comparación realizada con los datos reportados para la cafeína, se determinó su presencia en el residuo y se propuso realizar su valoración por medio de la técnica HPLC-PDA.

Debido a que los resultados sólo presentaron la presencia de un pico cromatográfico definido, el cual corresponde a cafeína, en este punto de la investigación se descarta la presencia del ácido clorogénico, ya que la metodología se planteó a partir de la literatura, donde se evidenció la separación y detección de este ácido (Panusa, Zuorro, Lavecchia, Marrosu, & Petrucci, 2013).



Gráfica 2. Cromatograma correspondiente al corrido cromatográfico realizado al residuo después de haber descartado la presencia de los ácidos clorogénico y caféico en el mismo.

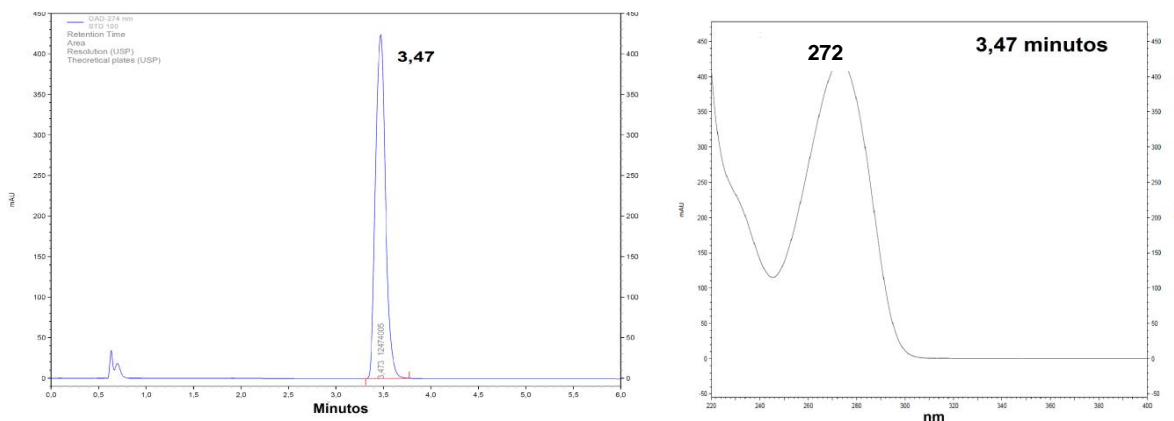


Gráfica 3. Espectro ultravioleta y espectro de masas asociado a la banda del corrido cromatográfico anterior a un tiempo de retención de 5,06.

Los resultados obtenidos del UPLC-PDA/MS demuestran la presencia de la cafeína. Debido a esto realizó la valoración de esta molécula.

2.5.2 Valoración de cafeína por medio de HPLC-PDA.

Después de estandarizar las condiciones cromatográficas para la valoración de la cafeína, se realizó un corrido cromatográfico con una estándar de cafeína y se obtuvieron el cromatograma y el espectro ultravioleta que se muestran en la **gráfica 4**. A pesar de que ya se había empleado el UPLC, se optó por el HPLC porque es un equipo cuya inyección resulta ser menos costosa y tenía menos demanda de análisis por otros usuarios del laboratorio. En el cromatograma se puede observar un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 3,47 minutos correspondiente a la cafeína y un espectro ultravioleta asociado a este pico cromatográfico que cuenta con máximo de absorción a 272nm, que como ya se dijo antes es el máximo de absorción en el espectro ultravioleta reportado para esta molécula.



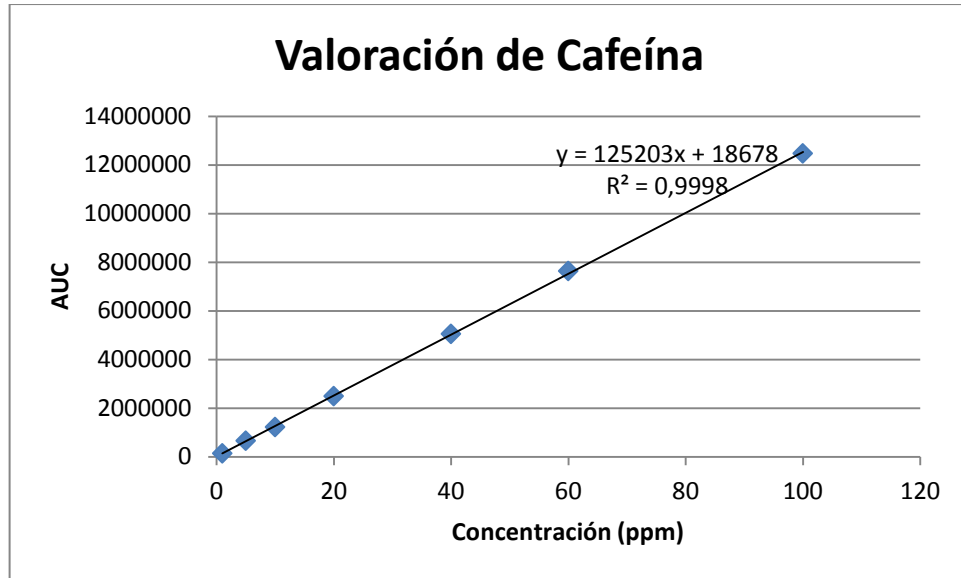
Gráfica 4. Cromatograma correspondiente al estándar de cafeína a una concentración de 100 ppm con el espectro ultravioleta asociado a los 3,47 minutos de corrido cromatográfico.

Posterior al corrido cromatográfico, se realizó la construcción de una curva de calibración de la cafeína para poder hallar la concentración de la misma en el residuo.

En la **tabla 3** se encuentran consignados los datos con los que se construyó la curva de calibración utilizando la herramienta gráfica Excel, con esta herramienta se elaboró la **gráfica 5** en la cual se puede observar el comportamiento de los datos, además de esto se muestran la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación (R^2). Es importante mencionar que estadísticamente se evaluó el ajuste de los datos al modelo lineal por medio del coeficiente de determinación, el cual tuvo un valor de 0,9998 y teóricamente se reporta que este coeficiente entre más cercano a un valor de 1, va a describir un mayor ajuste al modelo gráfico que se esté utilizando (Mendoza, Vargas, Lopez, & Bautista, 2002). De acuerdo al valor de este coeficiente se puede afirmar con 99,98% de confianza que los datos obtenidos se ajustan a un modelo lineal.

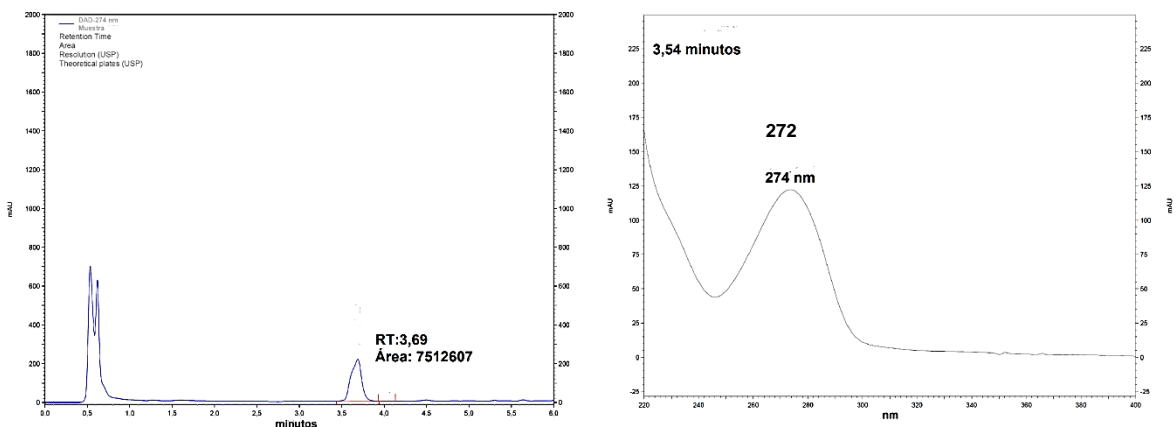
Tabla 3. Curva de calibración realizada para la valoración de la cafeína en la matriz residual.

AUC	Concentración (ppm)
139658	1
658976	5
1221546	10
2492882	20
5052679	40
7638813	60
12474005	100



Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de la concentración de la cafeína presente en los residuos evaluados.

Al comprobar que los datos obtenidos de la curva de calibración se ajustan al modelo lineal, se hizo un corrido cromatográfico con la muestra de los residuos, la cual se preparó a una concentración de 1g/100mL. Los resultados de este corrido se muestran en la **gráfica 6**, donde se tiene el cromatograma con un pico a un tiempo de retención de 3,69 minutos y un área de este pico de 7512607 y el espectro ultravioleta asociado al pico cromatográfico con un máximo de absorción en el ultravioleta de 272nm. Con el área bajo la curva del pico cromatográfico, se halló la concentración de la cafeína por interpolación de este dato en la curva de calibración y se determinó que la concentración de la cafeína en el residuo es de 6 mg de cafeína/ g de residuo.



Gráfica 6. Cromatograma correspondiente al corrido cromatográfico de la muestra de residuos a una concentración 1g/100mL para la determinación de la

concentración de cafeína con el espectro ultravioleta asociado a los 3,54 minutos de corrido.

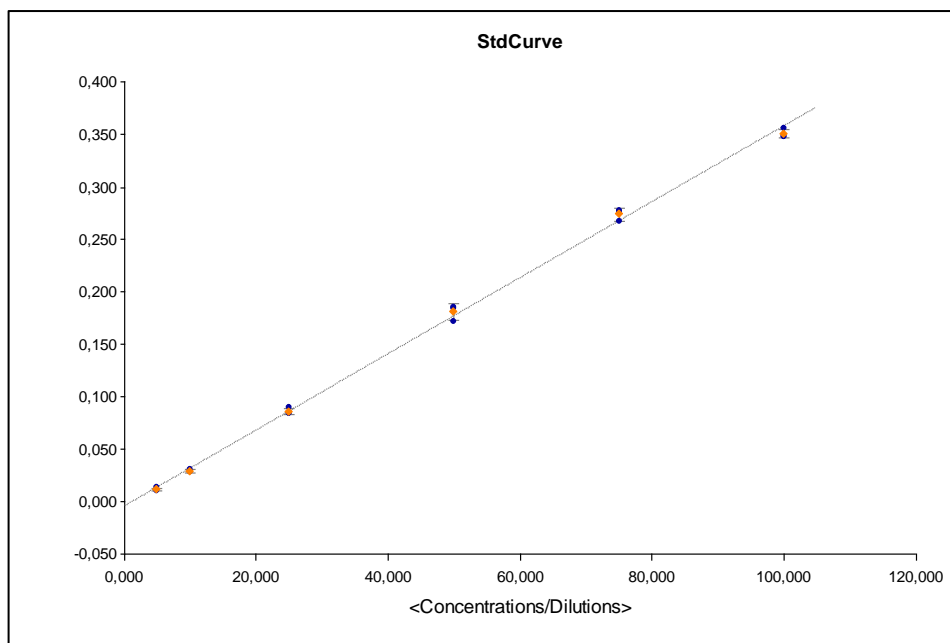
En la etapa final del proyecto se evaluaron las propiedades antioxidantes del residuo, para ello se utilizó la metodología de neutralización del radical DPPH y se utilizaron los datos reportados en el estudio realizado por la alumna Alejandra Velasco, el cual consistió en la validación de la metodología ORAC para evaluar el potencial antioxidante de alimentos y productos naturales (Velasco, 2015)

2.5.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del residuo por medio de las metodologías DPPH y ORAC

2.5.3.1 Resultados DPPH

La primera forma de evaluación de las propiedades de neutralización de radicales libres se hizo por medio del método de neutralización del radical DPPH, hay que resaltar que este método busca la obtención de la concentración efectiva 50 (EC50) (Kedare & Singh, 2011). Sin embargo, por cuestiones de tiempo y alcance del proyecto, no fue posible la realización de un análisis tan robusto como el que se propone en la literatura. Para el alcance del proyecto se propuso la comparación de la capacidad antioxidante del residuo contra el ácido gálico, el cual es un polifenol que cuenta con altas propiedades antioxidantes y además de esto es utilizado como estándar de comparación de dichas propiedades (Yen, Duh, & Tsai, 2002), además del ácido gálico también se comparó el residuo con el café comercial el cual por su composición podría presentar propiedades antioxidantes (Naranjo, Vélez, & Rojano, 2011).

Para realizar el estudio de neutralización de radicales libres utilizando el DPPH, se hizo primero una curva de calibración (gráfica 7), para dicha gráfica se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,999, por lo que se puede afirmar que los datos consignados en ella se ajustan con un 99,9% de probabilidad a un modelo estadístico lineal y la ecuación de la recta que se muestra en la **tabla 4**.



Gráfica 7. Curva de calibración del radical DPPH

Tabla 4. Tabla correspondiente a los datos de la ecuación de la recta hallada para la curva de calibración del radical DPPH y el coeficiente de determinación asociado al ajuste de los datos.

Nombre de la curva	Fórmula de la curva	A	B	R ²
Curva de calibración DPPH	$Y=A*X+B$	0,00362	-0,00435	0,999

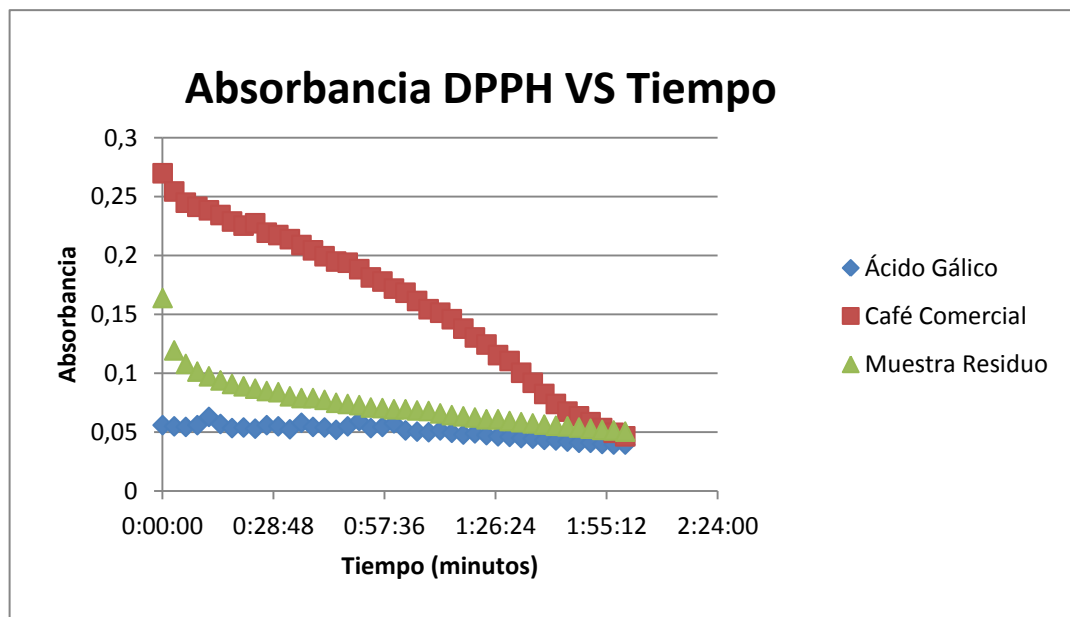
El siguiente ensayo consistió en la evaluación cinética de la neutralización del radical DPPH, se puede ver en la **gráfica 8** como disminuye la intensidad de la absorbancia del radical en el tiempo, debido a la neutralización del radical. En los resultados de este tipo de estudios no se reporta la disminución de la intensidad de la absorbancia del DPPH en el tiempo, si no que se debe reportar la disminución de la concentración de DPPH en el tiempo. A partir de la ecuación de la recta que se reportó en la tabla 4, se convirtieron los datos de disminución de la intensidad en la absorbancia del radical en el tiempo, en datos de disminución de la concentración del radical en el tiempo y se elaboró la **gráfica 9**.

En esta gráfica se evidencia cómo en la curva correspondiente al ácido gálico disminuye la concentración del radical por completo al tiempo 0 de la cinética, por lo que se demuestra su poder antioxidante. Como se ha mencionado antes, en un estudio realizado para la evaluación de las propiedades antioxidantes quedó demostrado que el ácido gálico, debido a su estructura, ha mostrado un potencial

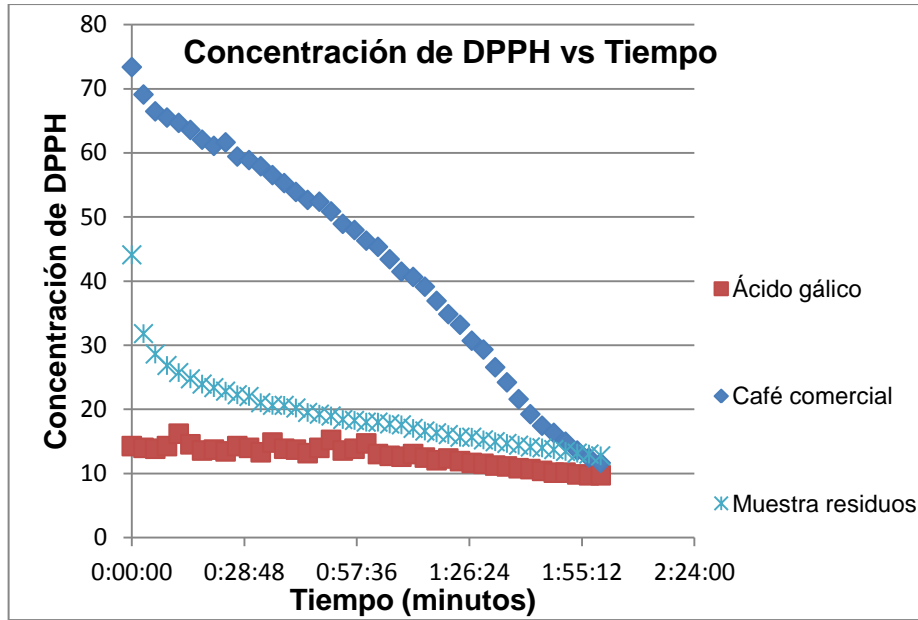
antioxidante muy fuerte, por lo que actualmente se utiliza en los estudios como un estándar de comparación para evaluar capacidad antiradicalaria (Mishra, Ojha, & Kumar, 2012).

Con respecto a la muestra de los residuos, se puede observar como a los 30 minutos aproximadamente de iniciada la cinética, ya se ha neutralizado por completo el DPPH y teniendo en cuenta que los ensayos realizados tuvieron una duración de 2 horas, se puede afirmar que es comparable el poder antioxidante de los residuos con el poder del ácido gálico, ya que mientras el ácido gálico neutralizó el radical al tiempo 0 de la cinética, a la muestra sólo le tomo 30 minutos en lograr estos mismos resultados, por lo que se puede evidenciar el poder antioxidante con el que cuenta el residuo.

Con respecto al comportamiento del café comercial, se nota una disminución en la concentración del radical pero más lenta en el tiempo, sin embargo se puede observar que presenta capacidad de neutralizar radicales libres. En el estudio realizado se demostró, con algunas muestra de café comercial, el gran potencial antioxidante con el que cuentan, el cual podría ser beneficioso para la salud de las personas que consumen este tipo de bebidas, debido a las diferentes moléculas, como los polifenoles presentes en el café (Ludwing, Sanchez, Caemmere, Kroh, Peña, & Concepción, 2012).



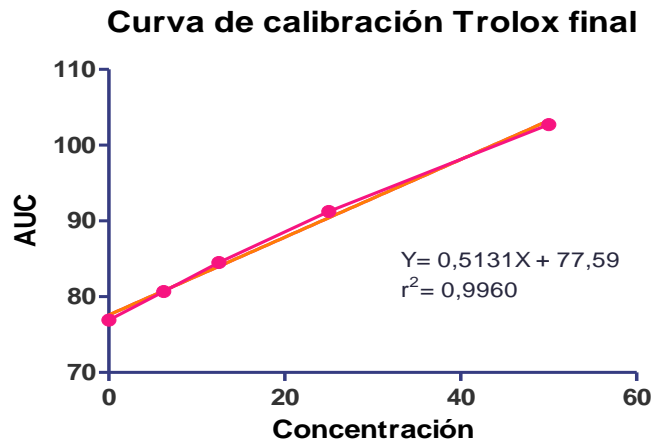
Gráfica 8. Disminución de la intensidad de la absorbanza por parte del radical DPPH expuesto a las muestras de ácido gálico, café comercial y una muestra de los residuos.



Gráfica 9. Disminución de la concentración de DPPH en el tiempo, evaluando la capacidad de neutralización del radical DPPH del ácido gálico, café comercial y una muestra de los residuos que se analizaron durante todo el proyecto.

2.5.3.2 Resultados ORAC

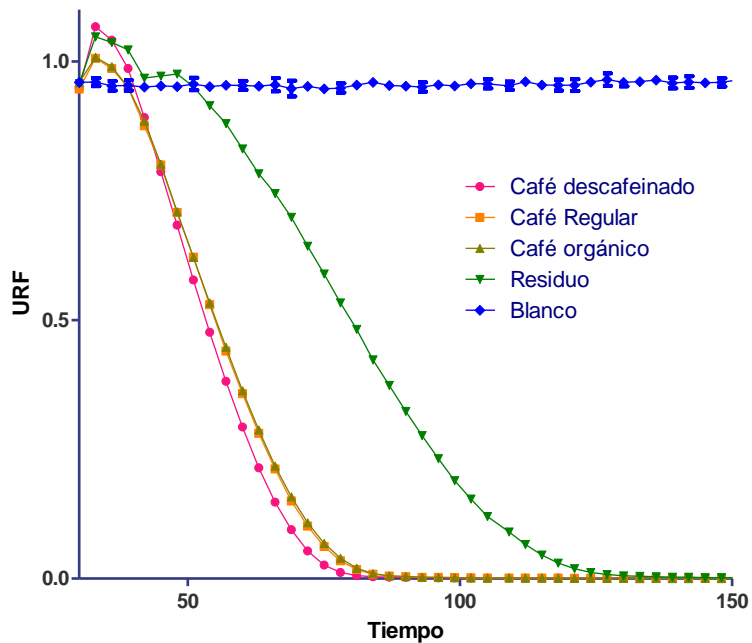
Por último se utilizaron, se reportaron y se discutieron en este estudio los datos obtenidos en el proyecto realizado por la estudiante Alejandra Velasco. En este proyecto se retó el residuo a la validación de la metodología ORAC que realizó la estudiante en su proyecto.



Gráfica 10. Curva de calibración del Trolox (Velasco, 2015).

En los resultados correspondientes a los análisis realizados por medio de la validación de la metodología ORAC en el laboratorio de investigación de Productos Naturales, la **gráfica 11** muestra una disminución de la intensidad de la fluorescencia de la fluoresceína, esta disminución es atribuida a la interacción con los radicales libres que se forman a partir de la molécula APPH, los cuales oxidan a la sonda fluorescente y disminuyen su intensidad de emisión (Zuleta, Esteve, & Frígola, 2009).

En cuanto a la evaluación de cada una de las muestras, se puede apreciar cómo las variedades de café evaluadas, en las que se encuentran el café tradicional, el café orgánico y el café descafeinado, muestran un comportamiento muy similar con respecto a la neutralización del radical, en donde logran mantener la fluorescencia de la sonda por 70 minutos aproximadamente. En cambio, la gráfica correspondiente a los residuos muestra cómo la fluorescencia se preserva alrededor de los 125 minutos en comparación a las variedades de café utilizadas. Este comportamiento se atribuye a las diferentes moléculas polifenólicas que estén presentes en las matrices evaluadas.



Gráfica 11. Evaluación de la disminución de la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína en el tiempo utilizando diferentes tipos de café y una serie de diluciones del residuo obtenido de la producción de café.

En la **tabla 5** están consignados los datos de las áreas bajo la curva de las gráficas de la cinética de neutralización de radicales, correspondiente a cada una de las muestras evaluadas. Estos datos son importantes debido a que sirven para hallar los equivalentes de Ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

trolox. Hay que tener en cuenta que el trolox es un derivado hidrofílico de la vitamina E (Lee, Kim, Jong, Kim, & Kim, 2014) y es utilizado como un estándar de la metodología ORAC, el cual ha permitido realizar la evaluación de alimentos, nutracéuticos y farmacéuticos, con el fin de poder comparar la actividad antioxidante, al ser expresados de la misma forma (equivalentes trolox) (Huang, Ou, Hampsch, Flanagan, & Prior, 2002).

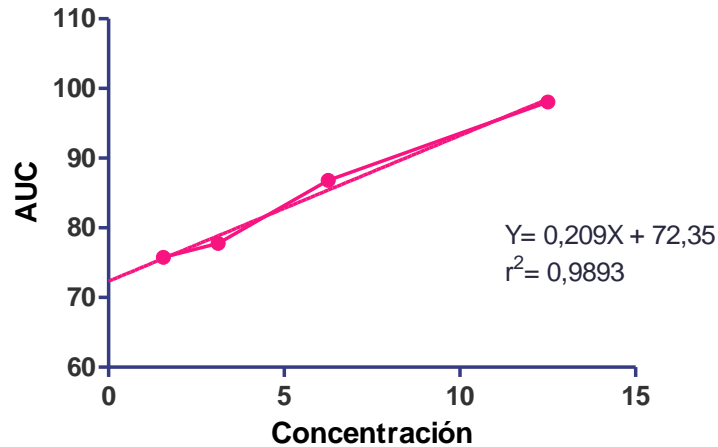
Al comparar el comportamiento de los equivalentes trolox de cada una de las muestras, se aprecia cómo a pesar de que esta medida sea mayor en cada una de las variedades de café que en el residuo, se debe tener en cuenta que la concentración de cada una de estas, es menor aproximadamente en 1 orden de magnitud a la concentración de la solución que se evaluó del residuo, este hecho demuestra el poder de la neutralización de radicales libres por parte de este.

Tabla 5. Obtención de los equivalentes Trolox de cada muestra evaluada.

Muestra	Concentración (g/mL)	AUC	Equi Trolox
Café regular	1/50	97,28	0,6058078
Café organico	1/50	97,32	0,60693514
Café descafeinado	1/50	94,21	0,52812533
Muestra	1/500	138,646712	0,16543894
Trolox	20uM	89,1576928	

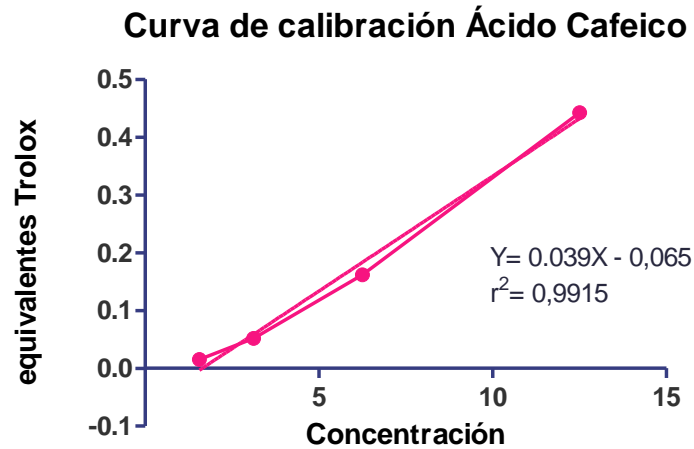
Durante el desarrollo del estudio para la validación de la metodología ORAC se evaluó la capacidad antioxidante del ácido caféico, esta molécula se ha estudiado y se ha encontrado que cuenta con propiedades antiradicalarias muy poderosas y se ha evidenciado su uso a nivel terapéutico (Cadenas & Packer, 2002). En la **gráfica 12** es importante destacar que se graficó el área bajo la curva de cada una de las concentraciones evaluadas para este ácido y se aprecia un comportamiento adecuado de acuerdo al aumento de la concentración del mismo, esto quiere decir que a una menor concentración es menor la capacidad antioxidante.

Curva de calibración del Ácido Cafeico



Gráfica 12. Curva de calibración del Ácido Caféico en AUC vs Concentración (Velasco, 2015).

A partir de los datos que se usaron para la construcción de la gráfica 12, se hallaron los equivalentes trolox para cada concentración de ácido caféico, estos resultados se graficaron vs el tiempo y se puede ver que los equivalentes trolox para el ácido caféico oscilan entre 0-0,5ET. Este resultado comparado con lo que se ha reportado en la literatura es muy bajo, ya que se ha demostrado que el ácido caféico es muy potente para neutralizar radicales libres, al haberlo evaluado en un rango de concentraciones de 0,2-1 μ M y haber establecido un valor de equivalentes trolox de 6,63 (Dávalos, Gómez, & Bartolomé, 2004). Con respecto al estudio realizado por (Velasco, 2015), hay que resaltar que las concentraciones de ácido caféico eran muy superiores a las evaluadas en el estudio mencionado anteriormente, por lo que se debió revisar bien los errores que hubieran podido influir en los ensayos realizados.



Gráfica 13. Curva de calibración para el Ácido Caféico en equivalentes Trolox vs concentración.

Por último, el potencial antioxidante del residuo puede ser apreciado al comparar la curva de calibración para el trolox (**gráfica 10**), en la cual el eje Y cuenta con datos de áreas bajo la curva, en donde se evidencia que el último punto de la curva muestra un AUC de 107 aproximadamente, mientras que el AUC que se halló para el residuo fue de 138,65, por lo que este resultado no podría ser interpolable en la curva de calibración y no se podría comparar debido a que el valor se saldría de la linealidad de la curva para el experimento. Este resultado muestra que el residuo cuenta con unas propiedades de neutralización de radicales muy potente aun estando muy diluido y esto puede deberse a que cuenta con una gran variedad de moléculas, las cuales son las que aportan esta propiedad (Murthy & Naidu, 2012) y permiten observar este tipo de comportamientos en ensayos como ORAC y DPPH.

La discusión anterior abre un poco el panorama de la utilización del concepto de la bioeconomía, por lo que se hace importante nombrar algunas de las aplicaciones con las que podrían contar los residuos evaluados.

Los residuos generados a través de la producción del café, se han visto implicados en la obtención de beneficios económicos para las agroindustrias que los han estudiado y aprovechado, entre los usos que se han propuesto para la utilización de los residuos están:

- Producción de hongos comestibles, utilizando los residuos como fertilizantes.
- Producción de ácido cítrico y ácido giberélico por medio de la fermentación de los residuos.
- Compostaje como estrategia de reciclaje de los residuos.

- Producción de enzimas y metabolitos secundarios utilizando los residuos como medios nutritivos para la fermentación y obtención de estos productos.
- Como se nombró en el marco teórico de este estudio, la producción de etanol.
- Compuestos bioactivos, partiendo de las propiedades antioxidantes con las que cuentan este tipo de residuos.
- Producción de biogas.
- Combustibles
- Alimento para animales teniendo en cuenta la cantidad de nutrientes con la que este tipo de residuos cuentan (Murthy & Naidu, 2012).

2.6 Conclusiones

- Se implementó una metodología de extracción para los ácidos clorogénico y caféico en la matriz residual utilizando una mezcla hidroalcohólica. Sin embargo, al momento de comprobar la presencia de los mismos, por medio de la utilización de la técnica cromatografía planar, no se obtuvieron datos contundentes respecto a su presencia en el residuo evaluado, proveniente de la producción de café en las fincas del norte del Valle del Cauca.
- Se estandarizó una metodología de valoración para el ácido caféico, utilizando un estándar para la determinación de dicha molécula en el residuo generado por la agroindustria del café y comparando los espectros ultravioletas asociados a picos cromatográficos. No obstante, no se pudo cuantificar el ácido debido a que no se encontró ningún pico cromatográfico al momento de realizar el corrido de la muestra.
- Se determinó por medio de la utilización del acople entre el UPLC-PDA-MS la presencia de cafeína en los residuos analizados.
- Se determinó por medio de todos los resultados obtenidos y mostrados a lo largo de este trabajo, que en el residuo no hay presencia de los ácidos clorogénico y caféico.
- Se valoró la concentración de cafeína en los residuos utilizando la técnica HPLC-PDA, hallando una concentración de esta molécula de 6g de cafeína/g de residuo.
- Se evaluó la capacidad antioxidante del residuo contra el ácido gálico y café comercial por medio de la técnica DPPH y, se encontró que la capacidad antioxidante de la matriz residual evaluada es comparable con la molécula estándar (ácido gálico), en cuanto a la neutralización de radicales libres.
- Se evidenció la capacidad antioxidante del residuo por medio de la metodología ORAC y se encontró que este cuenta con propiedades muy potentes para neutralizar radicales libres y comparables con moléculas muy estudiadas por estas propiedades.

2.7 Recomendaciones

- Por medio de la utilización de técnicas instrumentales modernas como resonancia magnética nuclear, realizar análisis que permitan determinar la presencia de moléculas a las cuales se les pueda atribuir las propiedades antioxidantes que mostró el residuo en los análisis realizados en este proyecto.
- Proponer proyectos enfocados a evaluar las posibilidades del residuo para ser utilizado en alguno de los procesos industriales que se nombraron a lo largo de la discusión, teniendo en cuenta sus buenas propiedades de neutralización de radicales libres.
- Establecer una metodología de extracción para la cafeína y que esta pueda ser aprovechada y evaluada a nivel cosmético, de acuerdo con las propiedades que se le han establecido en procesos de reducción de peso (Herman & Herman, 2013).

3. BIBLIOGRAFÍA

- Ashihara, H. (2006). Metabolism of Alkaloids in Coffe Plants. *Journal of Plants Physiology* , 1-8.
- Ashihara, H., Sano, H., & Crozier, A. (2008). Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, 841-856.
- Barquero, M. (2004). *MECANISMOS Y APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPEÑO*. Costa Rica : Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Belay, A., Ture, K., Redi, M., & Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry* , 310-315.
- Benítez, A. (2005). *Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas*. Barcelona : REVERTÉ.
- Bharate, S., & Bharate, S. (2012). SPECTROPHOTOMETRIC AND CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ACETYLSALICYLIC ACID AND CAFFEINE IN PURE AND IN TABLET DOSAGE FORM. *Journal of Advanced Scientific Research*, 73-81.
- Bioeconomía Argentina 2014*. (2014). Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de Bioeconomía Argentina 2014: <http://www.bioeconomia.mincyt.gov.ar/index.php>
- Cadenas, E., & Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants*. New Yotk: Marcel Decker Inc.
- Campos, R., Loarca, G., Vergara, H., & Oomah, D. (12 de Abril de 2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. México.
- Cayman Chemical . (19 de Junio de 2012). *Cayman Chemical* . Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de Cayman Chemical : <https://www.caymanchem.com/pdfs/70930.pdf>
- Chemspider. (2015). *Chemspider Search and Share Chemistry*. Recuperado el 19 de Mayo de 2015, de Chemspider Search and Share Chemistry: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2424.html>

- Conrad, J., Caudron, A., & Merlin, J. (2006). UV–visible and synchronous fluorescence spectroscopic investigations of the complexation of Al(III) with caffeic acid, in aqueous low acidic medium. *Polyhedron*, 2215-2222.
- Dávalos, A., Gómez, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 48-54.
- De Paula, A. (2008). *Química Física* . Buenos Aires : Panamericana .
- Entorno, F. (2013). PROBIOCA Bioethanol production from waste coffe. Caicedonia, Valle del Cauca, Colombia.
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2007). *Federación Nacional de Cafeteros de Colombia*. Recuperado el 3 de Noviembre de 2014, de Federación Nacional de Cafeteros de Colombia: http://www.federaciondecafeteros.org/caficultores/es/servicios_para_el_cafetero/documentacion/
- Hage, D., & Carr, J. (2011). *ANALYTICAL CHEMISTRY and QUANTITATIVE ANALYSIS*. Pearson.
- Harris, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo* . Barcelona : Reverté .
- Herman, A., & Herman, A. (2013). Caffeine's Mechanisms of Action and its Cosmetic Use. *Skin Pharmacology and Physiology* , 8-14.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch, M., Flanagan, J., & Prior, R. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4437-4444.
- Kedare, S., & Singh, R. (2011). Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay . *Journal of Food Science Technology* , 412-422.
- LATINPYME. (6 de Febrero de 2015). *LATINPYME DENTRO DE DESARROLLO EMPRESARIAL*. Obtenido de LATINPYME DENTRO DE DESARROLLO EMPRESARIAL: <http://www.latinpyme.com.co/articulo/3288>
- Lee, J.-H., Kim, B., Jong, W., Kim, J.-W., & Kim, H.-H. (2014). Trolox inhibits osteolytic bone metastasis of breast cancer through both PGE2-dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 51-60.

- Ludwing, I., Sanchez, L., Caemmere, Kroh, L., Peña, P., & Concepción, C. (2012). Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. *Food Research International*, 57-64.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela : Torino .
- Mendoza, H., Vargas, J., Lopez, L., & Bautista, G. (2002). *Universidad Nacional de Colombia*. Recuperado el 24 de Mayo de 2015, de http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2007315/html/un6/cont_02_63.html
- Mishra, K., Ojha, H., & Kumar, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* , 1036-1043.
- Montoya, G. (2011). Consideraciones sobre la espectrometría de masas debido a su moderno acople con cromatografía líquida y su modo de aplicación en la química de productos naturales. *Consideraciones sobre la espectrometría de masas debido a su moderno acople con cromatografía líquida y su modo de aplicación en la química de productos naturales*. Cali, Valle del Cauca, Colombia.
- Montoya, G. (2 de Marzo de 2015). *Avance financiero* . Obtenido de Avance financiero : <http://avancefinanciero.com/bioeconomia-una-herramienta-poderosa-para-evolucionar/>
- Mullen, W., Nemze, B., Ou, B., Stalmach, A., Hunter, J., Clifford, N., y otros. (2011). THE ANTIOXIDANT AND CHLOROGENIC ACID PROFILES OF WHOLE COFFE FRUITS ARE INFLUENCED BY THE EXTRACTION PROCEDURES. *Journal of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 3754-3762.
- Muños, A., Ramos, D., Alvarado, C., & Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 142-149.
- Murthy, P., & Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 45-58.
- Naranjo, M., Vélez, L., & Rojano, B. (2011). Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 164-173.

- Ng, S.-f., Rouse, J., Sanderson, F., Meidan, V., & Eccleston, G. (2010). Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech*, 1432-1441.
- Panusa, A., Zuorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). RECOVERY OF NATURAL ANTIOXIDANT FROM SPENT COFFEE GROUNDS. *Journal of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 4162-4168.
- Perfetti, J. (14 de Marzo de 2014). *el COLOMBIANO*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2014, de *el COLOMBIANO*: http://www.elcolombiano.com/BancoConocimiento/M/mejora_el_pib_agricola/mejora_el_pib_agricola.asp
- Pubchem. (s.f.). *Pubchem OPEN CHEMISTRY DATABASE*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de *Pubchem OPEN CHEMISTRY DATABASE*: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/689043?from=summary#section=Top>
- Revista Semana. (21 de 12 de 2013). *Semana*. Recuperado el 7 de Noviembre de 2014, de *Semana*: <http://www.semana.com/economia/articulo/balance-de-la-economia-colombiana-en-2013/369104-3>
- Rocha . (2012). *Calaméo*. Recuperado el 16 de Noviembre de 2014, de *Calaméo*: <http://es.calameo.com/read/00175220284f5881b728b>
- Salinas, T., Ortega, M., Sanchez, M., Hernández, J., Díaz, A., Figueroa, J., y otros. (2014). productive performance and oxidative status of sheep fed diets supplemented with coffee pulp. *Small Ruminant Research*.
- Silva, G. (2004). *Federación Nacional de Cafeteros de Colombia*. Recuperado el 3 de Noviembre de 2014, de *Federación Nacional de Cafeteros de Colombia*: <http://www.federaciondecafeteros.org/static/files/1.%20OrganizacionesPrivadasyDividendosPublicosLaInstitucionalidadcafetera.pdf>
- U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). (Febrero de 2012). *Food and Drug Administration*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de *Food and Drug Administration*: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073395.pdf>
- Velasco, A. (2015). *VALORACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR POTENCIAL ANTIOXIDANTE (ORAC- OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY) EN ALIMENTOS Y PRODUCTOS NATURALES*. Cali.

Vickrey, T. (1983). *Liquid Chromatography Detectors* . New York: MARCEL DEKKER .

Wagner, H., & Blatt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Berlín: Springer.

Yen, G., Duh, P., & Tsai, H. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 307-313.

Zuleta, A., Esteve, M., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* , 310-316.

Zuluaga, F., & Insuasty, B. (1993). *Análisis Orgánico Clásico y Espectral* . Cali: Unidad de Artes Gráficas.

4. ANEXOS

Tiempo (min)	%Agua	%ACN	Flujo (mL/min)
0,0	95,0	5,0	1,0
5,0	80,0	20,0	1,0
5,5	50,0	50,0	1,0
10,0	20,0	80,0	1,0

Anexo 1. Condiciones cromatográficas de la combinación de solventes en el tiempo que se utilizaron para los análisis realizados en el HPLC-PDA-FD, para la determinación de ácido caféico en los residuos.

Tiempo (min)	%Agua	%ACN	Flujo (mL/min)
0-6	95,0-58,0	5,0-42,0	1,0
6-7	58,0-0,0	42,0-100,0	1,0
7-7,5	0,0-95,0	100,0-5,0	1,0
7,5-8,5	95,0	5,0	1,0

Anexo 2. Condiciones cromatográficas de la combinación de solventes en el tiempo que se utilizaron para los análisis realizados en el UPLC-FDA-MS, para la determinación de moléculas con actividad biológica.

$$y = 125203x + 18678$$

Donde Y: área bajo la curva

X: concentración en ppm de la cafeína.

Por lo tanto realizando el despeje de la variable X y reemplazando el área bajo la curva obtenida en la ecuación obtenemos:

$$X = \frac{7512607 - 18678}{125203} = 59,8498ppm$$

Hay que tener en cuenta que el residuo fue diluido 100 veces, por lo tanto la concentración real se obtiene multiplicando el valor anterior por 100, entonces la concentración real es:

$$\frac{59,8498 \text{ mg}}{L} * \frac{0.005 \text{ L}}{0.05 \text{ g}} = 6 \frac{\text{mg Cafeína}}{\text{g de residuo}}$$

Anexo 3. Muestra del cálculo para hallar la concentración de la cafeína en el residuo analizado.

Nombre de la curva	Fórmula de la curva	M	B
Curva de calibración DPPH	Y=M*X+B	0,00362	-0,00435

Dónde Y: Absorbancia del DPPH

X: concentración de DPPH

Por lo tanto realizando el despeje de la variable X y la absorbancia obtenida en la ecuación obtenemos:

$$X = \frac{0,056 - (-0,00435)}{0,00362} = 14,27 \text{ ppm DPPH}$$

Anexo 4. Muestra del cálculo para hallar las concentraciones de DPPH.

$$AUC = (0,5 + \sum \frac{f_n}{f_1}) \times 5$$

Anexo 5. Ecuación utilizada para encontrar el área bajo la curva de los resultados mostrados en la **gráfica 17**.

Donde f_n es la lectura de la fluorescencia en tiempo n, f_1 es la primera lectura de fluorescencia.

Para la obtención de los equivalentes trolox que se muestran en la **tabla 6**, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{equivalentes Trolox} = \frac{C_{\text{Trolox}} (AUC_{\text{muestra}} - AUC_{\text{blanco}})k}{(AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanco}})}$$

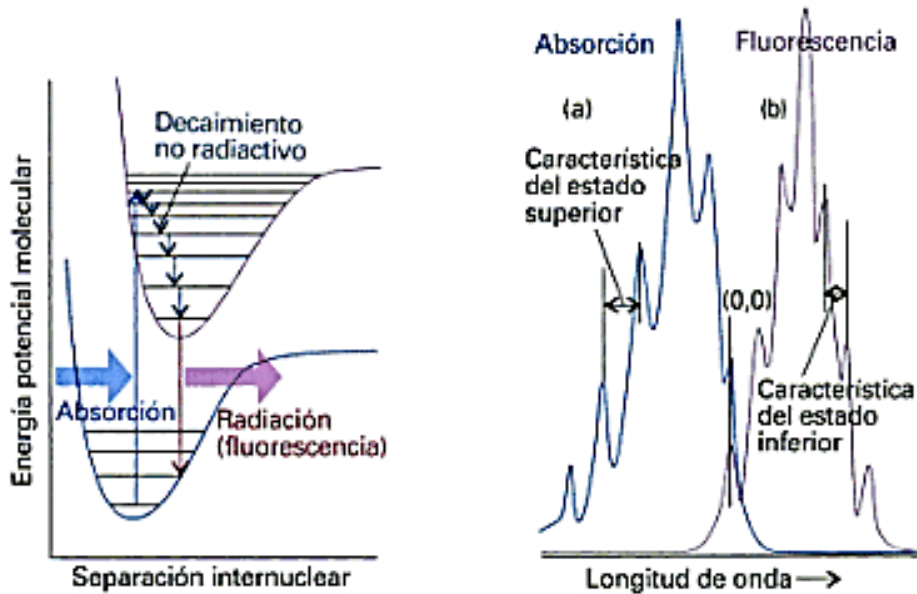
Donde C_{Trolox} concentración de Trolox a 20 μM , k es el factor de dilución de la muestra, AUC_{muestra} es el área bajo la curva de la muestra, así como la del Trolox a 20 μM y el blanco respectivamente (AUC_{Trolox} y AUC_{blanco}) (Zuleta, Esteve, & Frígola, 2009).

Por lo tanto el cálculo de los equivalentes trolox es:

$$\text{equivalentes Trolox para la muestra 4} = \frac{20\mu\text{M}(138,646712 - 73,376622)\left(\frac{1}{500}\right)}{(89,1576928 - 73,376622)}$$

$$\text{Equivalentes Trolox para la muestra 4} = 0,16543894$$

Anexo 6. Muestra de cálculo para hallar los equivalentes trolox de las muestras analizadas.



Anexo 7. Diagrama de Jablonski para explicar el fenómeno de fluorescencia (De Paula, 2008).