

CONTENIDO DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS EN GRANOS DE *Coffea arabica* y *C. canephora*, SEGÚN EL DESARROLLO DEL FRUTO

Carolina Marín-García*, Gloria Inés Puerta-Quintero**

RESUMEN

MARÍN G., C.; PUERTA Q., G.I. Contenido de ácidos clorogénicos en granos de *Coffea arabica* L. y *C. canephora*, según el desarrollo del fruto. *Cenicafé* 59(1):7-28.2008

Con el objetivo de conocer las diferencias en la composición química del café de Colombia, se determinaron los ácidos clorogénicos totales (CGAT) por espectrofotometría, y los ácidos clorogénicos individuales y sus ésteres, mediante cromatografía (HPLC). Se analizaron granos de *Coffea arabica* de las variedades Colombia, Caturra, Típica y Borbón, y de *C. canephora* var. Robusta, recolectados en diferentes semanas después de la floración procedentes de cultivos experimentales establecidos en Chinchiná. En promedio, el café arábica maduro presentó 6,23% de CGAT y el Robusta 8,88%, contenidos que fueron estadísticamente diferentes. No hubo diferencias estadísticas entre los contenidos de CGAT para los granos de *C. arabica*, según los estados de desarrollo del fruto. Se cuantificaron los ácidos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA; 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA; 4 y 5-FQA; el ácido cafeico y los ácidos orto y para cumáricos. En las variedades de *C. arabica* los CQA representaron el 95% de los CGAT, los di-CQA del 2,1 al 2,7% y los FQA del 0,83 al 1,64%. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las variedades de café arábica con Robusta para los promedios de los di-CQA, el 3-CQA y el total de 4 y 5-FQA. Sin embargo, el contenido de los ácidos clorogénicos no permite una discriminación inequívoca entre los factores genéticos, ni de madurez del café.

Palabras clave: Café, composición química, cromatografía líquida de alta eficiencia, espectrofotometría.

ABSTRACT

With the purpose of knowing the differences in the chemical composition of Colombian coffee, the total chlorogenic acids CGAT were determined by means of spectrophotometry and the individual chlorogenic acids and their esters by means of HPLC chromatography. *Coffea arabica* beans of the varieties Colombia, Caturra, Typica and Bourbon as well as of *C. canephora* var. Robusta were analyzed. Such fruits were harvested at different weeks after flowering in experimental crops from Chinchiná. In average, the ripe Arábica coffee exhibited 6.23% of CGAT and Robusta 8.88%, contents that were statistically different. There were not statistical differences in the CGAT content for *C. arabica* regarding the cherries development state. The acids 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA; 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA and 4,5-di-CQA; 4 and 5-FQA were quantified as well as the caffeic acid and the orto and para coumaric acids. In the varieties of *C. arabica* the CQA represented 95% of the CGAT, the di-CQA from 2.1 to 2.7 % and the FQA from 0.83 to 1.64%. The differences were statistically significant between the Arábica and the Robusta coffee varieties for the averages of di-CQA, 3-CQA and the total of 4 and 5-FQA. However, the content of the chlorogenic acids does not allow an unequivocal discrimination between genetic or coffee cherries ripeness factors.

Keywords: Coffee, chemical composition, high performance liquid chromatography, spectrometry.

* Ingeniera de Alimentos, Universidad de Caldas.

** Investigador Científico III. Calidad y Manejo Ambiental. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

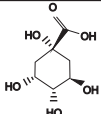
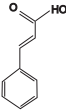
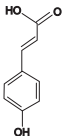
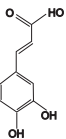
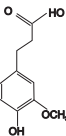
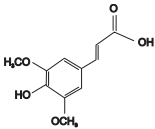
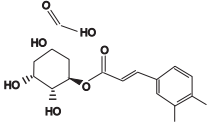
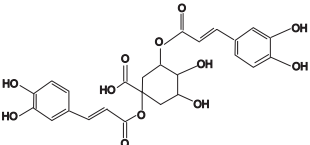
El grano de café está constituido por agua, carbohidratos, lípidos, compuestos nitrogenados, ácidos y minerales. Los ácidos clorogénicos (CGA), del inglés *chlorogenic acids*, comprenden varios ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, cumárico, sinápico) esterificados con el ácido quínico (8, 9). Los compuestos fenólicos, incluidos otros derivados del ácido quínico, y los cinamatos de ácidos, amidas, polisacáridos y lípidos, constituyen metabolitos secundarios de las plantas. Los CGA se encuentran en las paredes celulares, esterificados a los polisacáridos; se biosintetizan a partir de la fenilalanina, son precursores de la lignina, influyen en la textura y la plasticidad de las plantas, cumplen funciones similares al ácido indolacético, de protección de las plantas contra los microorganismos, la luz ultravioleta, el daño por herbívoros y los daños físicos (1, 5, 18, 29, 39). El café, las frutas, las hierbas, el té y las hortalizas son las principales fuentes de ácidos clorogénicos en la dieta humana (9, 10, 21, 29).

Los ácidos clorogénicos se aislaron del café en el siglo XIX. Su nombre proviene del pigmento verde formado por la reacción entre el ácido cafeico con el cloruro férrico y también por la coloración de los precipitados de ácidos clorogénicos del café, formados en varias reacciones de oxidación (8). En los últimos 60 años se han realizado numerosas investigaciones sobre estos ácidos, en las cuales se ha estudiado su función y contenido en diferentes vegetales, y en el café se desarrolló la nomenclatura según la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) para nombrarlos, y se probaron los métodos analíticos para la cuantificación de los ácidos clorogénicos totales (CGAT) y de los ácidos clorogénicos individuales o libres (cafeico, quínico, ferúlico, cumárico, sinápico), sus ésteres y sus isómeros (8, 12, 20, 21, 36, 37, 39, 40).

Muchas de las últimas investigaciones sobre los ácidos clorogénicos se han enfocado en buscar o asociar su biodisponibilidad, su forma de absorción y de metabolismo en los humanos, y también en conocer los efectos en la salud de los consumidores de café. Aunque hay controversia sobre las consecuencias para la salud humana por el consumo de productos que contienen estos ácidos, en varias publicaciones se les atribuye efectos antioxidantes y anticancerígenos a varios de los ácidos clorogénicos (10, 19, 20, 21, 29, 35, 36, 37, 39, 40). En general, estos estudios se han efectuado *in vitro* en animales, y no existen suficientes evidencias *in vivo*, ni sobre su efecto en los humanos. En la Tabla 1 se presentan los nombres, las fórmulas químicas y algunas fuentes de los principales ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos.

Los ácidos clorogénicos se encuentran en los granos de café principalmente como mono y di-ésteres, y conforman más de 40 ácidos, en grupos de isómeros con sustituciones en las posiciones 1, 3-, 4- ó 5- del ácido quínico, como los siguientes: 4 ácidos cafeoil-quínicos (**CQA**), 6 ácidos di-cafeoil-quínicos (**di-CQA**), 3 ácidos feruloil-quínicos (**FQA**), 3 ácidos di-feruloil-quínicos (**di-FQA**), 3 ácidos p-cumaroil-quínicos (**p-CoQA**), 6 ácidos cafeoil-feruloil-quínicos (**CFQA**), 6 ácidos p-cumaroil-cafeoil-quínicos (**p-CoCQA**), 6 ácidos p-cumaroil-feruloil-quínicos (**p-CoFQA**), 3 ácidos di-metoxicinámico-quínicos, 3 ácidos cafeoil-dimetoxicinámico-quínicos (8, 12, 17, 48). Además, se han determinado varios ácidos clorogénicos en las hojas y en la pulpa del café (8, 10, 34). Si se considera la nomenclatura IUPAC, el 3-CQA, reportado en los trabajos de fechas anteriores a 1980, se refiere actualmente al 5-CQA, y consecuentemente se interpreta de esta forma en el presente estudio.

Tabla 1. Nombres y fórmulas químicas y estructurales de algunos ácidos clorogénicos (8, 9, 12, 29, 31, 39, 45, 46).

Nombre común	Fórmula molecular y nombres químicos	Fórmula estructural	Obtención
Quínico QA	$C_7H_{12}O_6$ 1,3,4,5-Tetrahidroxi-(1 α ,3R,4 α ,5R) ciclohexano- carboxílico		Quina, café y sintéticamente
Cinámico CiA	$C_9H_8O_2$ 3-Fenil-2-propenoico		Canela, maní y sintéticamente
p-cumárico p-CoA	$C_9H_8O_3$ 4-Hidroxicinámico 3-(4-Hidroxifenil)- 2-propenoico		Maní, tomate, zanahorias, fresas, ajo, espinaca, remolacha, aceituna
Cafeico CA	$C_9H_8O_4$ 3,4-Dihidroxi-cinámico 3-(3,4-Dihidroxifenil)-2-propenoico		Arándano, manzana, cidra, orégano, verbena, tomillo, albahaca, cúrcuma, diente de león, aceituna, café
Ferúlico FA	$C_{10}H_{10}O_4$ <i>trans</i> -4-Hidroxi-3-metoxicinámico 3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-2-propenoico)		Cereales, arroz, trigo, avena, café, manzana, maní, naranja, piña, remolacha
Sinápico (Sinapínico) SiA	$C_{11}H_{12}O_5$ 3,5-Dimetoxi-4-hidroxicinámico 3-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoico		Brócoli, col, hortalizas de hojas verdes, frutos cítricos
Clorogénico 5-cafeoil-quínico 5-CQA	$C_{16}H_{18}O_9$ 1,4,5-Trihidroxi-ciclohexano carboxílico 3-(3,4-dihidroxicinamato) 3-[[3-(3,4-Di-hidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexano-carboxílico		Café, arándanos, manzana, cidra. Es el ácido fenólico más abundante en el café
1,5-di-cafeoil-quínico 1,5 di-CQA	$C_{25}H_{24}O_{12}$ 3,4 -Dihidroxi-ciclohexano carboxílico 1,5-(3,4-dihidroxicinamato)		Alcachofa, achicoria silvestre, girasoles

El contenido de los ácidos clorogénicos se ha analizado en el café según la especie y la variedad, el origen geográfico, el estado de desarrollo del fruto, el proceso de beneficio, la tostación y las formas de preparación de la bebida. Las mayores diferencias se han encontrado entre las especies silvestres de África, con promedios de CGA del 1,4% al 14,4% (suma de los tres isómeros de CQA, tres isómeros de di-CQA y 5-FQA) para el café almendra; estas especies también presentan un contenido de cafeína del 0,09% al 3,3% (2, 8, 23, 28).

En las almendras de las variedades comerciales de *C. arabica* L. se han registrado promedios de CGA del 5 al 8% (4, 11, 16, 17, 22, 30, 38, 43, 49), en *C. canephora* P. ex. F. del 6,6 al 12,3% (4, 11, 13, 17, 23, 28, 38, 43, 44, 49) y en *C. liberica* del 7,6 al 14% (2, 11, 27, 38). Por otra parte, no se han determinado diferencias en el contenido de CGA en el grano de café según el fertilizante aplicado, ni según la altitud, ni entre variedades de una misma especie, resistentes y susceptibles a una enfermedad (8, 14, 22).

En cuanto al estado de desarrollo del fruto de café, se ha reportado un mayor contenido de los di-CQA en los frutos inmaduros que en los maduros (11, 23, 33, 34), así como diversas tendencias entre el contenido de los CGA según la maduración del fruto. También se ha publicado que el contenido de CGA disminuye en los granos de café según varía el deterioro del color de verde a amarillo, marrón y a negro (8, 38).

Con respecto a los métodos de beneficio, húmedo o vía seca, para granos de *C. arabica* y de *C. canephora* var. Robusta de India, no se registraron diferencias significativas en el contenido de los CGA (4). Cabe resaltar que otros autores reportaron un mayor contenido

de CGA en el café procesado por la vía húmeda (34), mientras que otros reportes indican, que en granos de frutos maduros y sobremaduros, procesados por la vía seca, se tiene un mayor contenido de los CGA (33, 38).

Por otra parte, se conoce que en la torrefacción del grano de café almendra se presentan diferentes reacciones de los ácidos clorogénicos y, en consecuencia, se producen varios compuestos químicos en el grano tostado, que dependen del grado de tostación utilizado. Así, a medida que se tuesta el grano de café ocurren isomerizaciones, disminuye el 5-CQA y aumentan los isómeros 4-CQA y 3-CQA; también una parte de los CGA se une a las melanoidinas (pigmentos) en la reacción de Maillard. La mayor cantidad de los CGA se hidrolizan, entre un 5 a 8% de los CGA se transforman transitoriamente en quinolactonas de los ácidos clorogénicos (CGL), con un mayor contenido para el café tostado en grado medio, el cual contiene apenas un 0,5% de CGA y 0,23% de 3-CQL (lactona del ácido cafeoil-quinico) y en total solamente 0,5% de quinolactonas; mientras que cuando el café se tuesta en grado oscuro, los CGA y las CGL son totalmente transformados en otros compuestos como el catecol, guaiacol y pirogalol (6, 16, 17, 18, 30, 37, 43, 44, 47, 49).

Mediante el análisis de componentes principales del contenido de los ácidos clorogénicos se reportó la identificación del Robusta en la mezcla con cafés arábicas, cuando alguna de las dos especies componían el 80% en peso del café tostado utilizado para la preparación de la bebida (7). En contraste, mediante la evaluación sensorial realizada por expertos, el café Robusta se detectó desde proporciones del 10% en la mezcla con arábica, debido a la intensificación del amargor en la bebida, y a partir del 20%,

por la percepción del aroma característico del café Robusta (41).

Debido a la descafeinización del grano de café almendra hubo reducción del contenido de los ácidos clorogénicos (49). En estudios con café descafeinado de Brasil, Etiopía e Indonesia, el 5-CQA disminuyó con respecto al café almendra y los niveles de CGA se incrementaron en un 17%; en tanto que los CGA en el café descafeinado tostado fueron menores entre un 3 y un 10% con respecto al café tostado sin este procesamiento (16). Para los cafés solubles se han reportado valores de CGA del 2,1 al 7,4% en base húmeda (25).

Dada la reducción de más de un 90% de los ácidos clorogénicos en la tostación y al considerar un rendimiento de un 90 a un 95% en la extracción de la bebida, 100 mL de una taza de café pueden contener en promedio entre 15 y 90 mg de ácidos clorogénicos, según la mezcla o especie de café, el grado de tostación y las cantidades usadas para su preparación (10, 35). En contraste, una taza de café regular contiene de 60 a 150 mg de cafeína, el soluble de 70 a 90 mg, el café descafeinado 2 a 4 mg, y el té entre 10 y 90 mg (10).

En el mundo, se han realizado numerosas investigaciones sobre los compuestos químicos contenidos en el café. En algunas de estas investigaciones se han utilizado muestras de café de Colombia, la mayoría comerciales y provenientes de supermercados y tiendas, a las cuales se les han determinado algunos de los ácidos clorogénicos y varios componentes del aroma, entre otros (6, 18, 24, 30, 49).

Con el objetivo de contribuir a la identificación de los compuestos químicos que puedan diferenciar al café de Colombia por su origen y calidad, en este trabajo se analizó

el contenido de los ácidos clorogénicos en el grano de café almendra de las principales variedades de café arábica cultivadas en Colombia, según el estado de desarrollo del fruto procesado, y se comparó con los ácidos clorogénicos encontrados en granos de café Robusta de cultivos experimentales.

La información obtenida en este trabajo también es básica y útil para el acertado planteamiento de proyectos estratégicos, en los cuales se busque aprovechar industrialmente y disponer adecuadamente los granos deteriorados y los residuos obtenidos en el beneficio del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El café analizado fue cultivado en la Estación Central Naranjal de Cenicafé, localizada en Chinchiná (Caldas), ubicada a 4°58' Latitud Norte, 75° 39' Longitud Oeste, a 1.381 m de altitud, con promedios de temperatura de 21,3°C y humedad relativa de 78%, precipitación anual de 2.634 mm, con 237 días de lluvia y 1.690 h de brillo solar.

Muestras. Se procesaron y analizaron por triplicado, muestras de café almendra de *C. arabica* L. de las variedades Caturra, Típica, Borbón, Colombia de fruto rojo y Colombia de fruto amarillo, en estados de maduración pintón, maduro y sobremaduro, y también en el estado verde para Caturra, Colombia rojo y Colombia amarillo; así como, granos de frutos maduros y de frutos sin seleccionar (mezcla de todos los estados de desarrollo del fruto) de *C. canephora* var. Robusta. Las muestras se obtuvieron de la cosecha principal del año 1998 y de las cosechas principal y secundaria del año 1999.

Beneficio y preparación de las muestras. Los frutos de las variedades de *C. arabica*

de los diferentes estados de desarrollo se recolectaron de acuerdo con las semanas después de la floración y según la coloración del fruto, así: verdes de 26 a 28 semanas, pintones de 29 a 31, maduros de 32 a 34 y sobremaduros de 34 a 36 semanas. Para el café Robusta, los frutos cosechados se seleccionaron según la coloración.

En Cenicafé, se beneficiaron los frutos de café por separado, bajo condiciones controladas y estandarizadas; se partió de 15 a 40 kg para los estados pintón, maduro, y sin seleccionar, y de 2 a 6 kg de café para los estados verde y sobremaduro. Los frutos sobremaduros, maduros y pintones se procesaron por fermentación natural durante 14, 16 y 18 h, respectivamente, se lavaron con agua limpia y se secaron al sol. Los frutos verdes y sin seleccionar se procesaron por el método seco al sol. Todas las muestras se secaron hasta obtener una humedad entre el 10 y el 12%, en base húmeda (b.h.), se almacenaron durante un mes a una temperatura entre 10 y 12°C, y 65 a 70% de humedad relativa. Las muestras para los análisis químicos se trillaron, empaquetaron y rotularon, y se almacenaron a -20°C.

Equipos y elementos de análisis. Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC dotado con detector ultravioleta, equipo desgasificador para las fases móviles y con el *software* para la integración de los resultados cromatográficos; una estufa de convección forzada, un espectrofotómetro UV, un rotavapor, un molino para café almendra, tamizadores, un enfriador, un desecador, un agitador magnético, un equipo de ultrasonido, balanzas, una nevera, viales ámbar con tapa, filtros, equipos de filtración, material de vidrio de laboratorio, espátulas, elementos de protección personal, una precolumna Symmetry C18 y una columna cromatográfica C18 (250 x 4 mm, 5 µm).

Estándares. Se emplearon los siguientes estándares para los ácidos marcas Sigma, Acros y Kochlight, de las siguientes purezas: 3,4 di-hidroxicinámico (caféico), pureza 99%; cafeoil-quinico (5-CQA), por encima de 95%; p-hidroxicinámico (p-cumárico), 98%; 3,5 di-metoxi-4-hidroxicinámico (sinápico), 97%; o-hidroxicinámico (o-cumárico), 97%; transcinámico (cinámico), 98%; y 4-hidroxí-3-metoxicinámico (ferúlico), 99%.

Reactivos y solventes. Éter de petróleo, acetato de plomo, solución amoniacal 4M, ácido clorhídrico 4M, sulfito de sodio 98%, acetato de zinc cristalizado, ácido acético glacial, hexacianoferrato de potasio II, nitrógeno líquido, ácido sulfúrico 96,9%, metanol grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC, agua grado HPLC y ácido fosfórico 85% v/v, alta pureza.

Determinación de la humedad de las muestras. Se realizó por duplicado, por el método ISO6673 de desecación en estufa a 105°C, hasta peso constante (26).

Análisis de los ácidos clorogénicos totales. Se siguió el método AOAC 14.025 (3). Para cada muestra se realizaron por triplicado, extracciones en agua caliente a partir de 0,7 g de café previamente enfriado con nitrógeno líquido, molido y tamizado (tamaño entre 710 a 850 µm), secado en estufa y desengrasado con éter de petróleo; la purificación se efectuó con acetato de plomo neutro. En el espectrofotómetro se midió la absorbancia UV a 324 nm, antes y después del tratamiento con plomo.

Determinación de los ácidos clorogénicos individuales. Se realizaron preparaciones por triplicado para cada muestra. Las muestras se trataron con nitrógeno líquido, se molieron y se tamizaron (tamaño de 710 a 850 µm). Se tomó un gramo de café almendra molido en

un erlenmeyer, se le adicionó una solución de 100 mL de metanol acuoso 70% v/v y 0,5% de sulfito de sodio; el contenido se agitó a 125 r.p.m., y se almacenó a 4°C, en oscuridad, durante 12 horas, luego se filtró a través de algodón y se purificó mediante los reactivos de Carrez I (21,9 g de acetato de zinc cristalizado y 3 mL de ácido acético glacial disueltos en 100 mL de agua destilada) y Carrez II (disolución de 10,6 g de hexacianoferrato de potasio II en 100 mL de agua destilada). Al extracto se agregó 1 mL de cada preparación de Carrez y se diluyó en 50 mL de una solución acuosa de metanol 70/30, lo cual permitió precipitar el material coloidal. El extracto obtenido se filtró usando papel Whatman No.1, luego se concentró y evaporó el metanol, por medio de nitrógeno líquido de alta pureza, se pasó por filtro de membrana 0,45 µm, y se guardó en viales ámbar de 2 mL de capacidad, a -20°C, hasta los análisis cromatográficos (12, 27, 47, 48).

Se usó la cromatografía HPLC, en fase reversa con la precolumna y la columna Symmetry C18, para separar los ácidos clorogénicos, tres isómeros del CQA, tres isómeros de los di-CQA, los FQA y los ácidos cinámico, sinápico, ferúlico, cafeico, p-cumárico y o-cumárico. Se utilizaron dos solventes para la fase móvil, solvente A: 100 mL de agua y 1 mL de H₃PO₄ (85% alta pureza), y solvente B: acetonitrilo grado HPLC, eluidas en modo gradiente A/B 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 60/40, 90/10, 90/10 a los 0, 20, 25, 35, 40, 41 y 56 minutos, respectivamente, el flujo se ajustó a 1 mL/min, la detección se efectuó a 324 nm UV y el volumen de inyección fue de 10 µL, según el método DIN 10767 de 1992 (15).

Los CGA se identificaron comparando los cromatogramas con los tiempos de retención reportados en la literatura para los ácidos respectivos, a longitudes de onda y sistemas

cromatográficos similares, y se verificó con la adición de soluciones de los estándares a varias muestras de café (4, 7, 11, 17, 27, 47, 48, 49). El 5-CQA se cuantificó usando la ecuación de calibración obtenida con cinco concentraciones, entre 25 a 150 ppm del estándar. Para la identificación de los isómeros del CQA se preparó una mezcla de 3-CQA, 4-CQA y 5-CQA, mediante el calentamiento del estándar 5-CQA durante 30 minutos en baño María, en solución amoniacal 4M ajustada a pH 8 (48).

La cuantificación de los CGA se realizó considerando la concentración obtenida del 5-CQA en el cromatograma, los coeficientes de absorptividad molar (concentración en función de la absorción en UV en L /mol x cm) y los pesos moleculares de los respectivos ácidos, según la relación y las absorptividades molares reportadas en la literatura (47, 48). En este trabajo la detección se realizó a una longitud de onda de 324 nm, de tal forma que se introdujo un error del 1,0 al 1,5%, ya que la absorptividad molar depende de la longitud de onda, del solvente usado y del pH de la solución. Sin embargo, la aproximación ha sido recomendada por varios autores, dado que los estándares de los FQA y de los di-CQA no están disponibles comercialmente (47, 48).

Diseño experimental. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5x4+4 (cinco variedades de *Coffea arabica*: Colombia rojo, Colombia amarillo, Caturra rojo, Típica rojo, Borbón rojo; por cuatro estados de desarrollo del fruto: verde, pintón, maduro y sobremaduro, procesados por fermentación natural; más cuatro estados de desarrollo de la variedad Robusta: recolección no selectiva, pintón, maduro y sobremaduro). No se recolectaron frutos en estado verde para Típica y Borbón. Se analizaron tres repeticiones por variedad (tres extracciones por muestra x tres inyecciones en el cromatógrafo).

Adicionalmente, se analizaron muestras de frutos maduros de Colombia rojo, Colombia amarillo y Caturra, procesadas por desmucilaginado mecánico (Becolsub).

Variables medidas. Contenido de los siguientes ácidos en el café almendra: cinámico, sinápico, ferúlico, cumárico, cafeico, 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA, 4-FQA, 5-FQA, CGA (suma de los tres isómeros del CQA, tres isómeros del di-CQA y el 5-FQA), CGAT (suma de todos los ácidos clorogénicos cuantificados). Todos los resultados se expresaron en % p/p, en base seca (b.s.).

Análisis estadísticos. Se realizó un análisis descriptivo de los contenidos de los ácidos clorogénicos en el café. Se efectuó el análisis de varianza y la comparación de promedios por la prueba de Tukey al 5%, para todas las variables medidas en el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ácidos clorogénicos totales. En la Tabla 2 se observan los promedios de los contenidos de los ácidos clorogénicos totales obtenidos por la espectrofotometría UV, donde los valores para café arábica variaron entre 4,72% y 8,58%, en tanto que para Robusta el valor mínimo fue de 7,45%, obtenido para el estado maduro procesado por vía seca, y el máximo fue de 10,81%, para la recolección no selectiva beneficiada por vía seca. El café Robusta de cosecha no selectiva, contenía frutos de los siguientes estados de desarrollo, en promedio: maduros 61,5% (coeficiente de variación, C.V. 7,9%), sobremaduros 3,7% (C.V. 126%), pintones 9,8% (C.V. 23%), verdes 20,1% (C.V. 28,3%), negros y secos 4,9% (C.V. 54%).

El valor máximo de los CGAT para café arábica se obtuvo para el estado sobremaduro

Tabla 2. Promedios de los contenidos de ácidos clorogénicos totales (% b.s.) en almendras de *C. arabica* y *C. canephora*, según el estado de desarrollo del fruto. Mediciones efectuadas por espectrofotometría UV.

Especie de café	Estado de desarrollo del fruto	Tipo de beneficio*	CGAT (%)			C.V. (%)
			Mínimo	Promedio	Máximo	
<i>Coffea arabica</i> L.	Verde	BS	6,43	6,79	7,18	3,8
	Pintón	FN	4,72	6,11	7,93	11,9
	Maduro	FN	5,24	6,19	7,61	9,2
	Maduro	BEC	5,46	6,20	6,92	5,2
	Sobremaduro	FN	5,17	6,25	8,58	11,4
<i>Coffea canephora</i>	Pintón	FN	7,86	7,93	8,01	1,4
	Maduro	FN	8,21	9,25	10,59	7,7
	Maduro	BS	7,45	7,72	7,98	4,9
	sobremaduro	FN	8,38	9,10	9,81	11,1
	no selectiva	BS	7,98	9,04	10,81	10,3

*FN: Fermentación natural; BS: Beneficio seco; BEC: Beneficio por desmucilaginado mecánico.

de la variedad Colombia fruto amarillo, y el mínimo para la misma variedad en estado maduro y procesado por Becolsub. Para los frutos maduros de *C. arabica*, la variedad Típica procesada por fermentación natural, presentó tanto el valor promedio más bajo de los CGAT con 5,93% como el mínimo absoluto con un valor de 5,24%, mientras que el valor promedio más alto se encontró en la variedad Caturra con 6,47% y el máximo absoluto fue de 7,61% también para Caturra.

Para el contenido total de los ácidos clorogénicos, determinados por espectrofotometría se presentaron diferencias significativas (Tukey 5%) entre Robusta con todas las variedades de *Coffea arabica*, independiente del estado de madurez y del

tipo de beneficio. En promedio, el café arábica presentó 6,23% de CGAT, mientras Robusta presentó 8,88%. Para las variedades y los estados de desarrollo estudiados, los coeficientes de variación de los CGAT determinados por espectrofotometría estuvieron entre 1,4 y 18,6%. Estos contenidos de CGAT y los coeficientes de variación se encuentran dentro de los valores reportados en la literatura.

Para el café arábica se encontró el mayor promedio del contenido de ácidos clorogénicos totales en el estado verde, con una disminución en el estado pintón, seguido de un aumento en el maduro y en el sobremaduro, aunque los valores máximos y mínimos absolutos se encontraron en el estado sobremaduro y verde, respectivamente. En tanto que para

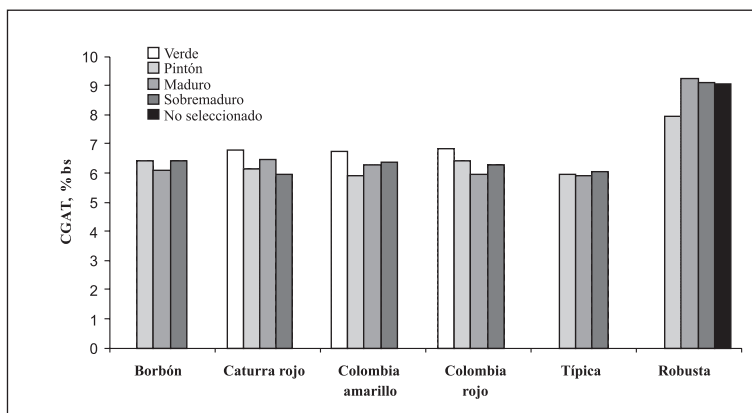


Figura 1. Promedios de los contenidos de ácidos clorogénicos totales (% b.s.) en almendras de las variedades de *C. arabica* y *C. canephora* var. Robusta, según el estado de desarrollo del fruto. Mediciones efectuadas por espectrofotometría UV (Estados verdes y no seleccionados procesados por la vía seca; pintones, maduros y sobremaduros por fermentación natural).

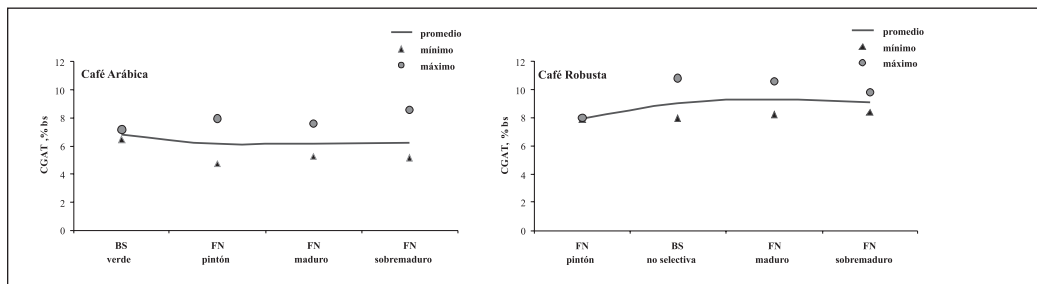


Figura 2. Variación del contenido de los ácidos clorogénicos totales (% b.s.) en almendras de *C. arabica* y *C. canephora* var. Robusta, según la madurez del fruto (FN: fermentación natural; BS: procesado por vía seca). Mediciones efectuadas por espectrofotometría UV.

Robusta se observó un incremento de los CGAT en los granos durante la maduración, medida del pintón al sobremaduro (Figuras 1 y 2, Tabla 2).

En comparación, los registros para café arábica, Robusta y Libérica muestran una variación de los CGA en el grano con un comportamiento sigmoidal, al madurarse el fruto (11, 38). Por su parte, otros autores indican que se presentan cambios diferentes de los CGA según la madurez y el pase de recolección de la cosecha (23); en tanto que para Catuai rojo procesado por la vía húmeda, se encontraron variaciones entre el contenido de los CQA, con una disminución del verde al pintón, un aumento del pintón al maduro, seguido de una significativa disminución al sobremadurarse el fruto, mientras que para la misma variedad procesada por la vía seca la disminución del maduro al sobremaduro fue menor (33).

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de los CGAT entre la variedad Robusta, beneficiada por la vía seca, con todas las variedades arábica, y entre los estados verdes de *C. arabica* y el café no seleccionado de la variedad Robusta, ambos procesados por el beneficio seco. Para la

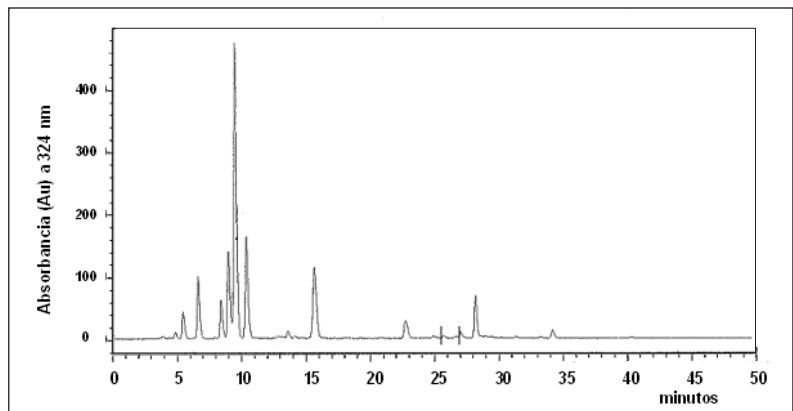
fermentación natural, las diferencias se encontraron entre el maduro y el pintón. Al comparar por maduración, los estados maduro y sobremaduro del café Robusta se diferenciaron de todas las variedades de arábica maduras y sobremaduras, respectivamente; en el caso del pintón, las diferencias fueron significativas entre el Robusta con Típica, Caturra y Colombia de fruto amarillo (Tukey 5%).

Ácidos clorogénicos individuales. Mediante la purificación con los reactivos de Carrez y la separación cromatográfica, se logró la separación de varios de los ácidos clorogénicos y se obtuvieron cromatogramas con picos de muy buena resolución, además, las interferencias en la línea base fueron bajas (32).

En la Figura 3 se presentan los tiempos de retención de los ácidos clorogénicos para el sistema cromatográfico usado. El orden de elución encontrado para los ácidos cafeoilquínicos fue 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, que coincide con los resultados de otros autores (4, 6, 11, 31, 48). No obstante, en otros trabajos donde se usaron diferentes columnas y fases móviles se reportó el orden 3, 5, 4 para la elución de estos monoisómeros (7, 17, 47).

Figura 3.

Cromatograma de los ácidos clorogénicos en café arábica. Sistema HPLC, columna Symmetry C18, UV 324 nm. Tiempos de retención en minutos: 3-CQA: 6,9; 4-CQA: 8,39; 5-CQA: 8,96; cafeico 10,98; p-cumárico: 16,98; 5-FQA: 22,13; 3,4-di-CQA: 25,35; o-cumárico: 26,13; 3,5-diCQA: 26,51; 4,5-diCQA: 27,75; cinámico: 33,41.



Así mismo, el orden de elución para los di-CQA hallados corresponde al encontrado mediante otros sistemas cromatográficos (4, 11, 17, 27, 47, 48). En el presente trabajo se determinaron los isómeros 4 y 5 del ácido feruloil-quinico, y no se identificó el 3-FQA, que según las investigaciones eluye después del 3-CQA y antes de los otros isómeros del CQA, y cuya presencia en el grano de café es del orden de 0,02% en arábica y de 0,03% en Robusta (27, 49). De otro lado, no se identificaron los ácidos p-CoQA, que según la literatura se presentan en contenidos del 0,03 al 0,06% en el grano de café (10), y tampoco se identificaron los CFQA, que en algunos estudios se reportan en el café Robusta (10, 11).

Los tiempos de retención de los ácidos sinápico, 4-FQA y ferúlico fueron 18,26, 20,15 y 19,52 minutos, respectivamente, con el sistema cromatográfico usado. Es de anotar que los ácidos sinápico y cinámico presentaron absorbancias muy bajas y en consecuencia no fueron detectados en el grano de café. Según la literatura, para su determinación por HPLC se recomienda seguir los mismos procedimientos de extracción y purificación y utilizar el mismo sistema cromatográfico, aunque para lograr una mayor absorbancia se requiere variar las longitudes de onda de la detección a 272 nm para el ácido cinámico y a 230 nm para el sinápico (31).

En la Tabla 3 se presentan los contenidos promedios de los ácidos clorogénicos individuales y la suma de los CGA y CGAT en el café almendra, según la variedad y el estado de desarrollo del fruto.

Los ácidos cafeoil-quinicos se encontraron en todas las variedades de café analizadas, y se identificaron como los ácidos clorogénicos más abundantes en el grano de café, con cerca del 95% del total de los CGAT en

el café arábica y el 91% en el Robusta. La proporción de los CQA respecto a los CGA totales, encontrada en este trabajo, difiere de los resultados registrados en la literatura para cafés comerciales, que muestran que los CQA representan del 80 al 85% en arábica y 76% en los Robusta (16, 17).

El ácido 5-cafeoil-quinico (5-CQA) resultó el más abundante en ambas especies, tal como ha sido reportado por la mayoría de los autores. Así, el 5-CQA constituyó el 75% de los CQA en las variedades arábica evaluadas, seguido del 3-CQA con un 31%; mientras que en Robusta el 5-CQA representó el 51%, y el 3-CQA el 39,8% de los CQA contenidos en esta especie.

En promedio, los granos de café arábica presentaron 6,74% de CQA (C.V. 22,6%) y 4,4% de 5-CQA, comparado con el café Robusta en el cual se encontraron 7,65% de CQA (C.V. 18,7%) y 3,97% de 5-CQA. En los estados maduros de las variedades de *C. arabica* el 5-CQA varió en promedio de 4,06% para Típica a 4,69% para Borbón, en tanto que en el estado maduro de Robusta presentó 3,89% de 5-CQA.

El máximo promedio del contenido de CQA se presentó en el estado verde de la variedad Caturra (9,12%), en tanto que en las variedades Colombia los mayores valores se encontraron en los estados maduro y verde, para el Borbón en los estados sobremaduro y maduro y en Típica, en el pintón. Mientras que el máximo valor promedio de CQA en Robusta se encontró en el café que no fue seleccionado por madurez. Aunque las diferencias en los contenidos del 4-CQA, el 5-CQA, y los CQA entre las variedades, las especies, los estados de maduración o el tipo de beneficio no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 3. Promedios de los contenidos de los ácidos clorogénicos (% b.s.) en café almendra de las especies *C. arabica* y *C. canephora*, según la variedad y el estado de desarrollo del fruto. Determinaciones efectuadas por HPLC.

Estado de desarrollo del fruto	Ácido clorogénico	Borbón		Caturra rojo		Colombia amarillo		Colombia rojo		Típica		Robusta	
		Media	C.V. %	Media %	C.V. %	Media %	C.V. %	Media %	C.V. %	Media %	C.V. %	Media %	C.V. %
Verde		-*	-	3,0867	4,9	2,3333	24,7	2,5000	28,3	-	-	-	-
Pintón		1,9133	2,6	1,1980	51,7	1,9700	33,6	1,4300	49,9	1,5840	48,7	2,3300	20,0
Maduro	3-CQA	1,8767	6,4	1,5643	57,1	1,7114	14,4	2,0400	15,6	1,8167	21,1	3,2000	26,9
Sobremaduro		1,7414	21,0	1,1033	14,7	1,4067	25,0	2,2500	19,3	1,4300	4,2	3,0250	1,2
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1380	30,6
Verde		-	-	0,3133	12,9	0,5700	95,9	0,6550	83,1	-	-	-	-
Pintón		0,4500	83,7	0,4840	102,5	0,6800	117,4	0,2200	51,2	0,4360	54,2	0,8400	90,9
Maduro	4-CQA	0,4033	53,0	0,3771	68,9	0,5214	90,3	0,4914	71,8	0,4011	75,2	0,3883	72,4
Sobremaduro		0,6200	64,5	0,1700	117,5	0,2200	86,7	1,0722	86,3	0,2725	46,0	0,9800	63,5
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7340	65,5
Verde		-	-	5,7267	5,9	4,2633	47,8	3,8800	17,9	-	-	-	-
Pintón		3,9667	21,0	4,8680	30,0	3,4000	28,6	5,3467	50,8	4,4620	19,8	2,9900	0,5
Maduro	5-CQA	4,6933	32,8	4,6443	23,3	4,9414	34,8	4,5371	28,4	4,0600	28,9	3,8850	33,3
Sobremaduro		4,6700	33,1	5,1667	37,3	4,2433	32,2	3,4833	32,3	4,3200	10,2	3,9900	35,1
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4400	37,8
Verde		-	-	0,0367	41,7	0,0333	17,3	0,0400	35,4	-	-	-	-
Pintón		0,0533	57,3	0,0280	68,7	0,0380	57,1	0,0233	49,5	0,0208	48,2	0,0400	0,0
Maduro	Caféico	0,0300	0,0	0,0271	114,0	0,0286	65,3	0,0400	52,4	0,0213	28,1	0,0483	27,5
Sobremaduro		0,0257	49,5	0,0100	100,0	0,0233	65,5	0,0322	20,7	0,0192	6,6	0,0300	94,3
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0520	34,4
Verde		-	-	0,1600	86,6	0,1867	118,6	0,0650	76,1	-	-	-	-
Pintón		0,0367	87,7	0,0360	72,4	0,1140	116,6	0,5300	153,6	0,0275	116,4	0,0500	141,4
Maduro	o-cumárico	0,1133	10,2	0,0271	121,7	0,1286	129,7	0,0871	57,6	0,0722	134,6	0,2083	64,6
Sobremaduro		0,1214	97,6	0,1200	145,3	0,0467	81,1	0,0944	134,4	0,0550	76,4	0,6550	91,8
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4740	113,1
Verde		-	-	0,0091	96,7	0,0024	173,2	0,0003	-	-	-	-	-
Pintón		-	-	0,0015	223,6	nd**	-	0,0024	173,2	0,0010	223,6	0,0105	141,4
Maduro	p-cumárico	nd	-	0,0029	193,0	0,0034	264,6	0,0044	173,2	nd	-	0,0054	155,4
Sobremaduro		0,0019	244,9	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	0,0097	141,4
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0029	223,6
Verde		-	-	nd	-	0,0067	173,2	nd	-	-	-	-	-
Pintón		nd	-	nd	-	0,0050	200,0	nd	-	nd	-	0,0350	20,2
Maduro	4-FQA	nd	-	0,0329	238,8	0,0140	156,5	nd	-	nd	-	0,0317	12,9
Sobremaduro		nd	-	nd	-	nd	-	0,0060	223,6	nd	-	0,0150	141,4
No seleccionado		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0200	93,5

Verde	-	-	0,0500	87,2	0,0633	18,2	0,0700	40,4	-	-	-	-
Pintón	0,0933	48,3	0,0780	61,1	0,0900	82,0	0,1133	50,2	0,1240	56,3	0,0550	12,9
Maduro	0,0500	87,2	0,1043	59,6	0,0771	79,5	0,0729	83,4	0,1122	60,6	0,0683	52,7
Sobremaduro	0,0500	0,0	0,1533	10,0	0,0333	86,6	0,0511	6,5	0,1533	41,9	0,0650	32,6
No seleccionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0460	58,7
Verde	-	-	0,0060	12,7	0,0134	32,8	0,0092	13,8	-	-	-	-
Pintón	0,0111	38,5	0,0071	57,8	0,0090	49,8	0,0112	88,1	0,0057	146,6	0,0326	105,0
Maduro	0,0169	49,7	0,0179	110,9	0,0109	32,2	0,0094	60,2	0,0131	85,4	0,0185	88,2
Sobremaduro	0,0071	44,1	0,0070	57,5	0,0085	101,0	0,0101	50,1	0,0095	59,4	0,0195	81,1
No seleccionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0480	192,2
Verde	-	-	0,0046	4,9	0,0189	58,0	0,0097	29,2	-	-	-	-
Pintón	0,0104	24,8	0,0058	57,2	0,0089	18,4	0,0086	91,4	0,0103	66,3	0,0331	108,0
Maduro	0,0179	64,4	0,0227	83,7	0,0100	95,6	0,0097	34,0	0,0085	96,6	0,0222	117,8
Sobremaduro	0,0066	44,1	0,0080	37,6	0,0105	42,1	0,0096	53,6	0,0109	26,5	0,0277	101,5
No seleccionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0439	152,7
Verde	-	-	0,1147	1,3	0,1754	40,4	0,1947	42,6	-	-	-	-
Pintón	0,1382	19,8	0,1335	14,0	0,2009	39,4	0,1548	11,5	0,1375	37,9	0,2584	1,8
Maduro	0,1642	54,4	0,1774	41,9	0,1227	84,3	0,1633	30,3	0,1750	30,0	0,2027	43,3
Sobremaduro	0,1144	36,3	0,0957	14,7	0,1685	53,0	0,1398	35,9	0,1315	30,5	0,2697	7,7
No seleccionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2774	20,0
Verde	-	-	9,3019	5,0	7,4377	28,5	7,3186	7,9	-	-	-	-
Pintón	6,5830	8,8	6,7743	21,0	6,3588	14,8	7,2846	31,2	6,7595	22,7	6,5391	20,3
Maduro	7,2223	19,4	6,8768	18,8	7,3745	22,0	7,2991	15,7	6,5648	22,9	7,7850	18,0
Sobremaduro	7,2094	16,3	6,7041	33,2	6,0908	29,2	7,0162	27,0	6,2514	11,5	8,3768	7,8
No seleccionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7273	20,0
Verde	-	-	9,5077	3,6	7,6668	27,8	7,4238	8,3	-	-	-	-
Pintón	6,6730	8,3	6,8398	20,9	6,5148	15,8	7,8403	35,1	6,8032	22,5	6,6746	18,7
Maduro	7,3657	19,0	6,9656	18,3	7,5450	22,4	7,4224	15,7	6,6560	22,9	8,0787	18,3
Sobremaduro	7,3582	14,5	6,8341	34,8	6,1608	29,5	7,1462	27,3	6,3208	11,0	9,0865	13,4
No seleccionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,2762	15,3

(-) valor no medido, ** (nd): valor no detectado

Sin embargo, sí se presentaron diferencias significativas para el contenido del 3-CQA entre las variedades de arábica con Robusta, que se beneficiaron por fermentación natural, así como, entre las variedades Caturra rojo con Borbón, variedad Colombia amarillo y variedad Colombia rojo, del proceso de la fermentación natural. También hubo diferencias entre el estado verde de las variedades arábica con los estados pintón, maduro y sobremaduro. Al comparar por el estado de maduración, las diferencias fueron significativas para el estado maduro entre Robusta con todas las variedades de arábica, y también en el estado sobremaduro entre Robusta con Típica, Caturra, variedad Colombia amarillo y Borbón. Se destaca el mayor contenido de 3-CQA de la variedad Caturra de frutos verdes, el cual se diferenció de todos los estados analizados para *C. arabica* (Tabla 3).

En granos de café arábica de India procesados por la vía húmeda se reportan valores de 3,64% de 5-CQA, 0,44% de 4-CQA y 0,34% de 3-CQA, mientras que para café de la misma procedencia y especie, pero procesado por la vía seca, se encontró 4,23% de 5-CQA. De otra parte, para el café Robusta obtenido por vía húmeda se registró un 5,68% de 5-CQA y en Robusta obtenido por vía seca el valor fue de 4,11% (4). Por otra parte, en cafés beneficiados por vía seca, de la variedad Borbón de Brasil se encontró 3,062% de 5-CQA, en café de Indonesia el valor estuvo entre 3,2 y el 4,34%, y en la variedad Longberry de Etiopía éste fue de 3,61% (16, 17). De esta forma se destaca el mayor contenido de 3-CQA cuantificado en todas las variedades analizadas en el presente estudio, en comparación con los contenidos del 3-CQA registrados en café de otras procedencias.

El ácido cafeico se encontró en todas las variedades analizadas y representó apenas

del 0,36% al 0,48% de los CGAT en el café arábica, y el 0,55% en Robusta. La variedad Típica presentó el menor contenido de ácido cafeico (0,021%) con respecto al promedio obtenido para todas las variedades de *C. arabica* (0,0295%), en tanto que Robusta presentó 0,046% de ácido cafeico, en promedio. Los contenidos de este ácido en las variedades de arábica evaluadas fueron menores a los valores reportados para café de la India (0,07%) (4); sin embargo, están dentro de los rangos reportados por otros autores en cafés de otras procedencias (37, 47).

Las diferencias en el contenido de ácido cafeico fueron significativas entre Robusta con las variedades de café arábica procesadas por la fermentación natural, y en el estado maduro entre Robusta con las variedades de *C. arabica*.

El **ácido o-cumárico** también se encontró en todas las variedades de café analizadas, con un promedio de cantidades de 0,1016% para los cafés arábica y 0,3353% en el Robusta, contenidos que mostraron una alta variabilidad. Las diferencias fueron significativas entre *C. arabica* y *C. canephora* para los granos procesados por la fermentación natural. También hubo diferencias entre la variedad Robusta con las variedades Colombia en el estado sobremaduro y entre Robusta y la variedad Caturra rojo, para el estado maduro.

Por su parte, el **ácido p-cumárico** se halló en todos los estados de la variedad Robusta, con un valor promedio de 0,0058%; el máximo valor promedio se encontró en el estado pintón seguido del sobremaduro y el maduro. Este ácido se encontró solo en la variedad Borbón en el estado sobremaduro y en Típica en el estado pintón, en tanto que en las variedades Caturra rojo y Colombia fruto rojo se encontró en los estados verde, pintón y maduro, con promedios en un rango de 0,0003% a 0,0091%. Estos resultados

concuerdan con los autores que afirman que el ácido p-cumárico se encuentra en los granos de café en cantidades inferiores a 0,01% (4). El contenido de ácido p-cumárico fue diferente estadísticamente entre las variedades de *C. arabica* y *C. canephora* procesadas por la fermentación natural, y entre las especies para los estados maduro, pintón y sobremaduro.

Los contenidos totales de los ácidos orto y para cumáricos representaron el 0,84% de los CGAT para Caturra, el 1,52% para Borbón, el 1,66% para Colombia amarillo, el 1,8% para Colombia rojo y el 1,3% para la variedad Típica, mientras que los ácidos cumáricos constituyeron el 3,96% de los CGAT en Robusta. Las diferencias en el contenido total de ácidos cumáricos fueron significativas entre las especies para cada estado (maduro, sobremaduro y pintón), y entre Robusta con la variedad Caturra rojo en estado maduro.

El ácido ferúlico se encontró en los estados maduros y sobremaduros de todas las variedades analizadas, pero en cantidades inferiores a 0,1%, resultados que son similares a los encontrados en otros estudios, donde también se han detectado solo trazas de este ácido en el café tostado, pero no en la bebida (18, 20, 37, 49).

El contenido de los **ácidos 4 y 5-feruloil-quínicos** fue bajo en las variedades analizadas y representó el 0,83% de los CGAT en Borbón y del 1,03 al 1,64% en las otras variedades arábica evaluadas, en tanto que constituyó el 1,05% de los ácidos clorogénicos totales en Robusta. El 4-FQA se detectó en todos los estados evaluados de Robusta con promedios del 0,015% al 0,035%; también se encontró en la variedad Colombia de fruto amarillo con un promedio de 0,0073%, pero no se cuantificó en las variedades Típica y Borbón.

Por otra parte, el 5-FQA se halló en todas las variedades analizadas, con un promedio de 0,0852% en arábica, valor superior al contenido registrado en Robusta (0,0587%). El promedio más bajo en los arábica lo presentó la variedad Colombia amarillo en el estado sobremaduro, y los valores promedios máximos fueron para la variedad Típica, en todos los estados de maduración (0,12%), que es el valor más cercano a los datos reportados en la literatura para el 5-FQA, el cual es considerado como el principal ácido feruloil-quínico en el café, con promedios de 0,15% para arábica y 0,35% para Robusta (4, 16, 17, 28, 49).

El contenido total de 4-FQA y 5-FQA fue de 0,0895% para arábica, en un rango de 0,060% a 0,123%, que correspondieron a las variedades Borbón y Típica, respectivamente, con coeficientes de variación del 53 al 85%, en tanto que Robusta presentó en promedio 0,085%. Los valores cuantificados en este estudio son inferiores a los registrados para cafés de origen africano y asiático, en los cuales para arábica se reportan contenidos de 0,19 a 0,26% de FQA (16, 17, 28), y para Robusta de 0,4 a 1,5% (10, 17, 28).

Se presentaron diferencias significativas en el contenido de 4-FQA entre las especies, para los dos procesos de beneficio evaluados. Con relación a los estados de maduración, el 4-FQA del estado pintón de Robusta se diferenció de todos los estados de las variedades arábica.

En cuanto al 5-FQA, se encontraron diferencias significativas entre las variedades Típica y Borbón, procesadas por la fermentación natural. También hubo diferencias para el estado sobremaduro entre Típica con todas las variedades analizadas, excepto Caturra rojo; y se registraron diferencias entre los estados pintón y sobremaduro de la

variedad Colombia fruto rojo. Con respecto al contenido total de 4-FQA y 5-FQA las diferencias fueron significativas para el estado sobremaduro entre Típica con todas las variedades, excepto Caturra rojo, y para la variedad Colombia de fruto rojo entre los estados pintón y sobremaduro.

Los ácidos di-cafeoil-quinicos se encontraron en todas las variedades de café analizadas. Estos ácidos representan del 2,1 al 2,7% de los ácidos clorogénicos totales en las variedades de *C. arabica*, con promedio de contenido del 0,155%, mientras que en *C. canephora* su contenido fue del 0,31%, que representa el 3,6% de los CGAT en esta especie. Estos resultados concuerdan con los reportados para café arábica de El Salvador, y Robusta de Costa de Marfil, (49). Sin embargo, son inferiores a los reportados para cafés comerciales de Brasil e Indonesia, que registran valores del orden de 0,6% para arábica y de 1,3% para Robusta (16, 17).

El 4,5-di-CQA resultó ser el más abundante de los ácidos di-cafeoil-quinicos en los granos de café y representó el 86% de estos ácidos. El valor máximo absoluto de 4,5-di-CQA lo presentó Robusta con 0,3645%, en tanto que las variedades de arábica analizadas presentaron máximos de 0,26% para este ácido. En la mayoría de los estudios se reporta al 4,5-di-CQA como el más abundante de estos di-isómeros en el café, con contenidos del 0,23% para arábica y 0,5% para Robusta (17, 28), aunque en otros estudios se registra al 3,5-di-CQA con los valores promedios más altos en el café (4).

Los ácidos di-cafeoil-quinicos presentaron el máximo valor promedio en el estado maduro de las variedades Borbón, Caturra y Típica, mientras que para las variedades Colombia los mayores valores se encontraron para los estados verdes y pintones. El café Robusta presentó el mayor valor de ácidos di-cafeoil-

quinicos en los estados no seleccionado y pintón, seguido del sobremaduro.

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas para el contenido del 3,4-diCQA, el 3,5-diCQA, el 4,5-diCQA y el total de los di-CQA entre todas las variedades de arábica con Robusta, para el proceso de fermentación natural, con los mayores contenidos en Robusta. Se detectaron diferencias para el 3,4-diCQA entre los estados pintón y sobremaduro entre las variedades de *C. arabica*. En el caso del 3,5-diCQA las diferencias se encontraron en el estado pintón entre Robusta con Caturra y entre los estados maduro y pintón de Caturra.

Las diferencias en el 4,5-diCQA entre las especies fueron significativas tanto cuando se compararon entre sí las variedades beneficiadas por vía seca, como cuando se compararon las especies beneficiadas por fermentación natural. Se detectaron diferencias significativas entre Robusta, proveniente de recolección no selectiva, con el estado verde de la variedad Caturra rojo, y entre Robusta de fermentación natural con las variedades Caturra, Colombia rojo y Borbón. También se registraron diferencias para el estado pintón entre todas las variedades arábica con Robusta, así como diferencias en el estado sobremaduro entre las variedades Colombia rojo, Caturra y Borbón con Robusta.

Para el contenido total de los ácidos di-cafeoil-quinicos se encontraron diferencias entre los estados maduro y sobremaduro de la fermentación natural, entre los pintones de arábica y Robusta y entre los sobremaduros de arábica y Robusta. En los pintones las diferencias encontradas fueron entre café Robusta con Borbón, Típica y Caturra rojo; para el sobremaduro entre Robusta con la variedad Colombia de fruto rojo, Caturra, Típica y Borbón.

Relación CQA/di-CQA. No se encontró ninguna tendencia entre la relación molar de los contenidos de los CQA/di-CQA en los granos de café, según el estado de maduración de los frutos procesados. El promedio de la relación para todos los estados de desarrollo de las variedades de *C. arabica* fue de 72,5 (C.V. 105%), comparado con el Robusta que obtuvo 41,5 (C.V. 37,4%). Aunque al comparar los promedios las diferencias fueron estadísticamente significativas en el estado verde con el maduro y con la recolección no selectiva, entre las variedades de arábica con Robusta de beneficio seco, y también en el estado verde de Caturra con las variedades Colombia.

Los valores máximos y promedios de esta relación fueron diferentes entre las variedades de café, según la maduración. La variedad Borbón presentó el valor máximo promedio en el estado sobremaduro (85,7), la variedad Caturra en el estado verde (106,2), la variedad Colombia de fruto amarillo en el estado maduro (200,1), para Colombia de fruto rojo el valor máximo fue de 66,7 en el estado sobremaduro, para la variedad Típica el máximo fue de 66 en el estado pintón, y para Robusta el valor fue de 50,7 en el estado maduro.

En este trabajo se concluye que la relación CQA/diCQA no parece ser útil como indicativo de calidad del café, contrario a la propuesta de algunos autores de asociar un valor alto de esta relación con una mejor calidad de café. Esta propuesta se basó en el sabor amargo encontrado en el reactivo CQA y el astringente y metálico del di-CQA, y también en la tendencia de encontrar los mayores contenidos de los di-CQA en Robusta y en los frutos verdes, aunque en los datos mostrados de estudios con varias especies de café, procedencias, estados de maduración, así como con café defectuoso y de diferentes grados de tostación tampoco se mostró esta

relación (11, 33, 34, 38). En otros trabajos tampoco se halló correlación de los ácidos fenólicos del café con la astringencia de la bebida (7).

De otra parte, en la literatura se expresa usualmente como **ácidos clorogénicos** en el café a la suma de los contenidos de los tres isómeros 3, 4 y 5-CQA, más los tres isómeros de los di-CQA, más el 5-FQA. Esta suma se denomina en este trabajo CGA (Tabla 3). Al considerar la relación CGA/CGAT se observó que los CGA representan del 93 al 99,4% del contenido de los CGAT en arábica y del 92 al 98% en Robusta.

El valor promedio de los ácidos clorogénicos totales hallado en este trabajo por la espectrofotometría UV para café arábica maduro, beneficiado por la fermentación natural, fue de 6,19%, que es inferior al reportado por el método de colorimetría para el café de Colombia (6,72 a 6,89%) (8). Por el contrario, mediante la cromatografía líquida se encontró un promedio de 7,511%. El contenido de los ácidos clorogénicos totales, obtenidos al sumar los ácidos individuales cuantificados a partir del análisis cromatográfico para las variedades de *C. arabica* resultó mayor en el estado verde (8,296%), seguido del maduro (7,1373%), del pintón (6,8728%) y, el valor más bajo lo obtuvo, el estado sobremaduro (6,9266%).

En el caso de Robusta se encontró mayor cantidad de ácidos clorogénicos en el grano no seleccionado (9,2762%), seguido del sobremaduro (9,0865%), del maduro (8,0787%) y del pintón (6,6746%), con coeficientes de variación entre 13,4 y 18,7%. En promedio, el contenido de los CGAT determinados por HPLC, independiente del estado de desarrollo de los frutos procesados, fue de 7,117% (C.V. 21%) para el café arábica y de 8,4250% (C.V. 18,3%) para Robusta. Las diferencias en los contenidos de los ácidos

clorogénicos totales determinados por HPLC, fueron estadísticamente significativas entre las especies *C. arabica* y *C. canephora* procesadas por la fermentación natural, y para el estado verde de Caturra con los otros estados de desarrollo.

Es de anotar que los CGAT determinados por la espectrofotometría no coincidieron con los datos obtenidos al sumar los ácidos cuantificados por la cromatografía. Para el café arábica el contenido de los CGAT cuantificados por la espectrofotometría resultó, en promedio, el 87% del valor obtenido por HPLC, mientras que para el café Robusta el promedio del contenido de los ácidos clorogénicos totales encontrado por HPLC resultó menor en un 6%, con respecto al valor obtenido por espectrofotometría. Esto se debe a que por cromatografía se puede identificar una mayor cantidad de ácidos clorogénicos que con las técnicas de espectrofotometría y de colorimetría; también es necesario considerar que *C. canephora* presentó en el análisis de cromatografía una mayor cantidad de picos no identificados, que pueden contribuir al contenido total de los ácidos clorogénicos de esta especie.

Por tanto, la espectrofotometría resulta adecuada cuando solo se requiere estimar el contenido de ácidos clorogénicos totales, en tanto que cuando se necesita identificar los contenidos de los ácidos clorogénicos individuales, es necesario usar métodos de cromatografía líquida y gaseosa, o incluso técnicas de resonancia magnética y espectroscopia de masas, que han sido usadas por varios autores (3, 12, 13, 15, 16, 17, 25, 27, 31, 44, 47, 48, 49).

En consecuencia, ya que los ácidos cafeoil-quinicos constituyen el mayor porcentaje del contenido total de los ácidos clorogénicos en el café y el 5-CQA es el predominante, mediante su determinación por HPLC se

estimaría más del 87 al 94,5% del contenido de los ácidos clorogénicos presentes en el café arábica cultivado en Colombia, y además, otra ventaja es que se dispone del estándar comercial de este ácido. Para el café Robusta la determinación del 5-CQA por HPLC representaría el 83% de los ácidos clorogénicos contenidos en esta especie.

En conclusión, se confirmó que los CQA son los mayores ácidos clorogénicos encontrados en el grano de café. Por otra parte, al igual que en otros estudios (34), en este trabajo se observaron comportamientos diferentes en el contenido de los ácidos clorogénicos con la maduración de los frutos de café, lo cual no permitió llegar a una relación o tendencia, según este factor, entre el contenido de los ácidos clorogénicos totales, los CQA o los di-CQA en los granos de café.

No obstante, los resultados obtenidos muestran que los cafés Robusta tienen en promedio mayor cantidad de ácidos clorogénicos totales, cafeoil-quinicos, cafeico, di-cafeoil-quinicos y cumáricos que los cafés arábica (Figura 4). Sin embargo, ninguno de los ácidos clorogénicos identificados permite diferenciar inequívocamente al café por especie, variedad o estado de desarrollo del fruto, ya que los valores máximos de los contenidos de los ácidos en el café arábica, se pueden encontrar dentro de los valores mínimos y promedio del Robusta, según los rangos de variación encontrados. Por tanto, la cuantificación de los ácidos clorogénicos totales y de los di-CQA puede usarse sólo como análisis complementario para la examinación de adulteraciones o de mezclas no declaradas de Robusta en el café arábica.

Por otra parte, debido a que los granos de café provenientes de frutos verdes tienden a presentar mayores contenidos de ácidos clorogénicos, en la tostación se producirán

mayor cantidad de los compuestos químicos derivados de estos ácidos, como el 4-etilcatecol, el catecol que tiene olor a quemado, el guaiacol que presenta olor a cigarrillo y a humo, el 4-etilguaiacol, el fenol, el pirogalol y la hidroquinona (16, 17, 23, 30), que en conjunto imparten sabores amargos y aromas desagradables al café. En consecuencia, con el fin de evitar los sabores acres, ásperos, vinagres y desagradables que usualmente se encuentran en las bebidas preparadas con frutos de café inmaduros (42), y para conservar las características suaves del café de Colombia, es necesario planificar adecuadamente las recolecciones del café, teniendo en cuenta las diferentes floraciones y fructificaciones que

ocurren en las regiones cafeteras del norte, centro y sur del país, así como mejorar los métodos de separación y disposición final de los frutos de café inmaduros, mediante la aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas en el cultivo y beneficio del café.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Martha Henao, a la tecnóloga Luz Fanny Echeverry, al doctor Bernardo Chaves C. y a la doctora Lucelly Orozco (q.e.p.d.) por sus asesorías.

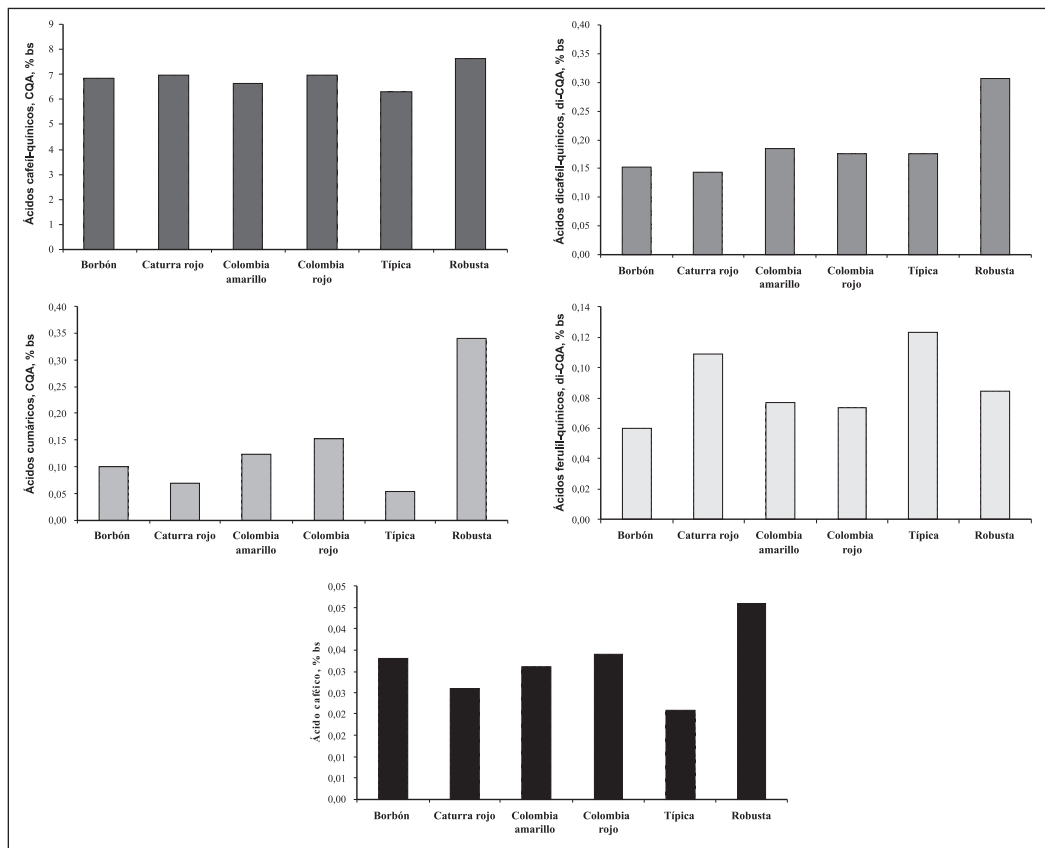


Figura 4. Promedios de los contenidos de ácidos clorogénicos (CQA, di-CQA, cumáricos, FQA, y cafeico) en el café almendra (% b.s.), de las variedades de café arábica y Robusta. Mediciones efectuadas por HPLC.

LITERATURA CITADA

1. AERTS, R.J.; BAUMANN, T.W. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 45(273): 497-503. 1994.
2. ANTHONY, F.; CLIFFORD, M.N.; NOIROT, M. Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: Chlorogenic acids, caffeine and mozamboside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution* 40(2): 61-70. 1993.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. WASHINGTON. ESTADOS UNIDOS. Official methods of analysis. 15. ed. Washington, AOAC, 1990. 2 vols.
4. BALYAYA, K.J.; CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and caffeine contents of monsooned indian Arabica and Robusta coffees compared with wet and dry processed coffees from the same geographic area. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 16. Kyoto, Avril 9-14, 1995. Paris, ASIC, 1995. p. 316-325.
5. BAUMANN, T.W.; MOSLI, S.S.; SCHULTHESS, B.H.; AERTS, R.J. Interdependence of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) metabolism in coffee. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 15. Montpellier, Juin 6-11, 1993. Paris, ASIC, 1993. p. 134-140.
6. BENNAT, C.; ENGELHARDT, V.H.; KIEHNE, A.; WIRRIES, F.M.; MAIER, H.G. HPLC Analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 199:17-21. 1994.
7. BICCHI, C.P.; BINELLO, A.E.; PELLEGRINO, G.M.; VANNI, A.C. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(6): 1549-1555. 1995.
8. CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: Clarke, R.J.; Macrae, R. (Eds.). *Coffee: Chemistry*. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1985. p. 153-202.
9. CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (3): 362-372. 1999.
10. CLIFFORD, M.N. The nature of chlorogenic acids. Are they advantageous compounds in coffee? In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 17. Nairobi, Juillet 20-25, 1997. Paris, ASIC, 1997. p. 79-91.
11. CLIFFORD, M.N.; KAZI, T. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acid, caffeine and trigonelline. *Food Chemistry* 26(1): 55-69. 1987.
12. CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6): 1957-1969. 2006.
13. CLIFFORD, M.N.; OHIOKPEHAI, O.; MENEZES, H. DE The influence of extraction method and analytical method on the chlorogenic acid content of green coffee beans. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 11. Lomé, Février 11-15, 1985. Paris, ASIC, 1985. p. 252-262.
14. DECAZY, F.; AVELINO, J.; GUYOT, B.; PERRIOT, J.J.; PINEDA, C.; CILAS, C. Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. *Journal of Food Science* 68(7): 2356-2361. 2003.
15. DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG - DIN. BERLIN. ALEMANIA. Untersuchung von Lebensmitteln. Untersuchung von Kaffee und Kaffee - Erzeugnissen. Bestimmung des Gehalts an Chlorogensäuren. HPLC -Verfahren. Berlin, DIN 46.00-2, 1992. 4 p. (German Federal Republic Standard, basado en la norma DIN 10767 Teil 3).
16. FARAH, A.; DE PAULIS, T.; MOREIRA, D.P.; TRUGO, L.C.; MARTIN, P.R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(2): 374-381. 2006.
17. FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L.C.; MARTIN, P.R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5): 1505-1513. 2005.
18. FELDMAN, J.R.; RYDER, W.S.; KUNG, J.T. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17(4): 733-739. 1969.
19. FREEDMAN, S.O.; KRUPPEY, J.; SEHON, A.H. Chlorogenic acid: an allergen in green coffee bean. *Nature* 192(4799): 241-243. 1961.

20. FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(16): 6054-6058. 2006.
21. GUTIÉRREZ M., A. Café, antioxidantes y protección a la salud. *MEDISAN (Cuba)* 6 (4): 72-81. 2002. On line Internet. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_4_02/san11402.pdf (Consultado en Febrero de 2007).
22. GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J.C.; PERRIOT, J.J.; GIRON, J.; VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arábica. *Plantations, Recherche, Développement* 3(4): 272-280. 1996.
23. GUYOT, B.; PETNGA, F; VINCENT, J.C. Analyse qualitative d'un café *Coffea canephora* Var. Robusta en fonction de la maturité. Partie I. Evolution des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques. *Café Cacao Thé* 32(2): 127-139. 1988.
24. HOLSCHER, W.; VITZTHUM, O.G.; STEINHART, H. Identification and sensorial evaluation of aroma-impact-compounds in roasted Colombian coffee. *Café Cacao Thé* 34(3): 205-212. 1990.
25. HUMPHREY, C.J.; MACRAE, R. Determination of chlorogenic acid in instant coffee using derivative spectrophotometry and its application to the characterization of instant coffee/ chicory mixtures. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 12. Montreux, Juin 29 - Juillet 3, 1987. Paris, ASIC, 1987. p. 179-186.
26. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. GINEBRA. SUIZA. Green coffee. Determination of loss in mass at 105 °C. Ginebra, ISO, 1983. 2 p. (International Standard ISO 6673)
27. KY, C.L.; NOIROT, M.; HAMON, S. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans *Coffea* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(3): 786-790. 1997.
28. KY, C.L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry* 75: 223-230. 2001.
29. KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 355-361. 1999.
30. LELOUP, V.; LOUVRIER, A.; LIARDON, R. Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 16. Kyoto, Avril 9-14, 1995. Paris, ASIC, 1995. p. 192-198.
31. MARÍA, C.A.B. DE; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Química Nova* 27(4): 586-592. 2004.
32. MARÍN G., C. Determinación de ácidos clorogénicos en el café colombiano. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Ingeniería, 2001. 162 p. (Tesis: Ingeniero de Alimentos).
33. MENEZES, H.C. DE; CLIFFORD, M.N. The influence of stage of maturity and processing method on the relation between the different isomers of caffeoylquinic acid in green coffee beans. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 12. Montreux, Juin 29 - Juillet 3, 1987. Paris, ASIC, 1987. p. 377-381.
34. MENEZES, H.C. DE The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquinic acid. *Food Chemistry* 50(3): 293-296. 1994.
35. MOREIRA, D.P.; MONTEIRO, M.C.; RIBEIROA., M.; DONANGELO, C.M.; TRUGO, L.C. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5): 1399-1402. 2005.
36. MORISHITA, H.; KIDO, R. Antioxidant activities of chlorogenic acids. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 16. Kyoto, Avril 9-14, 1995. Paris, ASIC, 1995. p. 119-124.
37. NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCISI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(20): 5735-5741. 2002.
38. OHIOKPEHAI, O.; BRUMEN, G.; CLIFFORD, M.N. The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 10. Salvador, Octubre 11 -14, 1982. Paris, ASIC, 1982. p. 177-185.
39. PARR, A.J.; BOLWELL G.P. Phenols in the plant and in the man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols

content or profile. Review. Journal of the Science of Food and Agriculture 80(7): 985-1012. 2000.

40. PLUMB, G. W.; GARCIA C., M.T.; KROON, P. A.; RHODES, M.; RIDLEY, S.; WILLIAMSON, G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(3): 390-392. 1999.
41. PUERTA Q., G.I. Calidad de mezclas de café *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Chinchiná, Cenicafé, 1999. 20 p.
42. PUERTA Q., G.I. Influencia de los granos de café cosechados verdes, en la calidad física y organoléptica de la bebida. Cenicafé 51(2): 136-150. 2000.
43. ROFFI, J.; SANTOS, A.C. DOS; MEXIA, J.T.; BUSSON, F.; MAIGROT, M. Cafés verts et torrefiés de l'Angola étude chimique. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 5. Lisbonne, Juin 14-19, 1971. Paris, ASIC, 1971. p. 179-200.
44. REES, D.I.; THEAKER, P.D. High pressure liquid chromatography of chlorogenic acid isomers in coffee. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 8. Abidjan, November 28 - Décembre 3, 1977. Paris, ASIC, 1977. p. 79-84.
45. SCIENLAB.COM. Material safety data sheet. Chlorogenic acid MSDS. On line Internet. Disponible en: http://www.sciencelab.com/xMSDS-Chlorogenic_Acid-9923423 (Consultado en Julio de 2007).
46. SIGMA-ALDRICH CO. Online Product catalog. On line Internet. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/homepage/Site_level_pages/CatalogHome.html (Consultado en Febrero de 2007).
47. SCHRADER, K.; KIEHNE, A.; ENGELHARDT, U.H.; MAIER, H.G. Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee. Journal of the Science and Food and Agriculture 71: 392-398. 1996.
48. TRUGO, L.C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. Analyst 109: 263-266. 1984.
49. VANDERSTEGEN, G.H.D.; DUIJN, J. VAN. Analysis of chlorogenic acids in coffee. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 9. Londres, Juin 16-20, 1980. Paris, ASIC, 1980. p. 107-112.