

DERIVADOS HIDROXICINÁMICOS PARA LA DISCRIMINACIÓN DE GENOTIPOS DE CAFÉ

Gloria Guerrero A.*; Margot Suárez*; Germán Moreno-Ruiz**

RESUMEN

GUERRERO A., G.; SUÁREZ, M.; MORENO R., G. Derivados hidroxicinámicos para la discriminación de genotipos de café. Cenicafé 54(3):234-241.2003

Se determinó la composición de derivados hidroxicinámicos de la fracción etanólica del café verde en 10 genotipos. La identificación de los constituyentes se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia y técnicas espectroscópicas, encontrándose diferencias cuantitativas y cualitativas que permitieron discriminar los genotipos. Los derivados hidroxicinámicos con mayor discriminación fueron: el ácido 4'-O-[β-D-6''-O-(*trans*-cumaril) glucopiranosil]-5-*p*-*cis*-cumarilquinico, identificado por primera vez en este trabajo, el cual se encontró en la variedad Típica pero no en Caturra; el ácido 3,4-cafeilferuloilquinico, presente en las introducciones 832 y 2252 del Híbrido de Timor, pero no en la 1343; el ácido 4,5-cafeilferuloilquinico, que no se detectó en las variedades de *C. arabica*, pero sí en el resto de genotipos; el ácido 4-feruloilquinico, el cual se encontró en todos los materiales excepto en las introducciones de *C. canephora*, y un glucósido del ácido dicafeilquinico identificado solamente en las introducciones de esta última especie. Se realizó la comparación de estos compuestos en todos los genotipos, por análisis estadístico multivariado. El análisis de componentes principales discriminó los cafés de *C. canephora* de los otros genotipos estudiados, las introducciones BP 46 y Centro 1 de la introducción BP4 de *C. canephora* así como la variedad Típica de la variedad Caturra.

Palabras claves: *Rubiaceae*, *Coffea arabica*, variedad Colombia, derivados hidroxicinámicos, análisis multivariado, cromatografía; cromatografía líquida de alta eficiencia.

ABSTRACT

Hydroxycinnamic derivatives composition of the ethanolic fraction from green coffee beans in ten genotypes was determined. The constituent identification was carried out by high performance liquid chromatography and spectroscopy techniques. Quantitative and qualitative differences, which allowed discriminating among genotypes, were found. The hydroxycinnamic derivatives with highest discrimination were: 4'-O-[β-D-6''-O-(*trans*-coumaroyl) glucopyranosil]-5-*p*-*cis*-coumaroylquinic acid, identified for the first time in this work. It was found in the Típica variety but not in Caturra. The 3,4-caffeoylferuloylquinic acid was found in accessions 832 and 2252 of Híbrido de Timor, but not so in accession 1343; 4,5-caffeoylferuloylquinic acid was not detected in *C. arabica* varieties, but it was found in all the other genotypes. 4-feruloylquinic acid was present in all materials except in *C. canephora* accessions, and a dicaffeoylquinic glucoside was identified only in this last species. Additionally, the chromatographic profile comparisons were done with multivariate analysis using quantitative data. The analysis of main components discriminated *C. canephora* from the other genotypes studied, the BP46 and Centro 1 accessions from the BP4 accession of *C. canephora* and Típica variety from Caturra variety.

Keywords: *Coffea*; variedad Colombia; hydroxycinnamic derivatives; multivariate analysis; high performance liquid chromatography; *Rubiaceae*

* Escuela de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira. A.A. 97. Pereira, Risaralda, Colombia.

** Investigador Principal I hasta junio de 2001. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en el grano de café verde, principalmente como ésteres del ácido quínico (ácidos clorogénicos), en forma libre y/o glicosidada (10, 11). El contenido de ácidos clorogénicos ha sido usado como un posible criterio taxonómico en los géneros *Coffea* y *Psilanthus* (6), en especies silvestres de la región Guineo-Congolés (2), en poblaciones silvestres de Madagascar, en aquellos en los cuales se establecieron diferencias inter e intra específicas (10) y en cafés de diferentes orígenes geográficos y calidades, para valorar la contribución de estos compuestos como marcadores, de acuerdo con la clasificación botánica (1, 3). En algunos de los últimos estudios se ha utilizado cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), y análisis multivariado.

La presente investigación tuvo como propósito, de una parte, explorar la posibilidad de discriminar genotipos de café mediante el análisis de derivados hidroxicinámicos, comparando sus perfiles cromatográficos por medio de técnicas de análisis multivariado y estableciendo los principales compuestos discriminantes, y de otra, ampliar la información sobre la composición del café verde de la variedad Colombia y de otros genotipos de café de interés para el Programa de Mejoramiento Genético de Cenicafé.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se usaron granos de café verde de los siguientes genotipos: a) variedad Colombia (generación avanzada del cruce de *C. arabica* variedad Caturra X Híbrido de Timor), b) primera generación de este cruzamiento, (F_1), c) variedades de *C. arabica* Típica y Caturra, d) introducciones 1343, 832 y 2252 del Híbrido de Timor, un híbrido natural entre *C. arabica* y *C. canephora* y e) tres introducciones de *C. canephora*: BP4, BP46 y Centro 1. Estos materiales hacen parte del banco de germoplasma

de Cenicafé localizado en la Sede Principal en Chinchiná, Caldas, Colombia (4). Los frutos se procesaron en postcosecha (beneficio) en idénticas condiciones. Las semillas se secaron al sol y fueron molidas en presencia de nitrógeno líquido.

Métodos. Los derivados hidroxicinámicos de cada genotipo fueron extraídos de las muestras usando etanol al 80%, siguiendo el método propuesto por Rakotomalala (10), pero con las siguientes modificaciones: la cafeína fue extraída con cloroformo del extracto acuoso antes de la extracción con acetato de etilo; el extracto de acetato de etilo se llevó a sequedad en una corriente de nitrógeno y el residuo se disolvió en 50mL de metanol para el análisis por CLAE (ácidos hidroxicinámicos).

La fracción acuosa residual se conservó para su posterior análisis. Cada fracción acuosa se pasó a través de una columna XAD previamente acondicionada y se lavó con 1L de agua destilada. Los derivados hidroxicinámicos glicosidados se eluyeron con 500mL de metanol y el eluido se concentró hasta sequedad al vacío y liofilización, obteniéndose en promedio 16mg de glicósidos crudos para el análisis por CLAE.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un sistema de CLAE marca Waters constituido por una bomba modelo 600, detector de arreglos de diodos Waters 996, inyector Reodine modelo 7725 con loop fijo de 5 μ L, precolumna RP-18 y una columna RP-18 Novapack (300mm x 3,9mm., 4 μ m). Los solventes de elución fueron: ácido fórmico al 0,5% en acetonitrilo al 6% (A); ácido fórmico al 0,5% en acetonitrilo al 34% (B). Las muestras y los estándares se analizaron a temperatura ambiente (25°C) mediante el siguiente programa de elución: 0% A a 100% A en 42 minutos con gradiente lineal y luego isocrático 100% A hasta los 47 minutos. Flujo de 0,9 μ L min⁻¹. La detección se llevó a cabo en un rango de longitud de onda entre 220-340nm.

La cuantificación de cada compuesto se hizo empleando el método del estándar externo, integrando el área de cada pico del cromatograma y relacionándola con la del ácido 5-cafeilquinico estándar (Ac.5-CQ). La curva de calibración se construyó con cinco puntos del ácido 5-cafeilquinico: 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 y 0,75 mg.mL⁻¹. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada genotipo. Todos los compuestos cuantificados mostraron un espectro ultravioleta característico de derivados hidroxicinámicos.

La identificación de cada compuesto se realizó por comparación de tiempos de retención relativos al ácido 5-cafeilquinico y los principales isómeros fueron identificados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) (6, 7).

La separación e identificación de algunos derivados hidroxicinámicos discriminantes desconocidos se realizó por cromatografía líquida semipreparativa y mediante diferentes técnicas espectroscópicas (7, 8, 9).

Análisis estadístico. Las pruebas de análisis multivariado se emplearon para realizar la comparación de los perfiles cromatográficos, usando los picos como variables y evaluándolos con base en sus concentraciones. Las pruebas usadas fueron: análisis de componentes principales (ACP), análisis factorial de correspondencias (AFC), clasificación ascendente jerárquica (CAJ) y análisis factorial discriminante (AFD). Los análisis se realizaron mediante el uso de los programas SAS y STAT-ITCF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de derivados hidroxicinámicos, que hicieron posible la discriminación de los genotipos analizados. Los cromatogramas de los ácidos hidroxicinámicos extraídos de la fracción en acetato de etilo (C) (Figura 1) y de los derivados glicosídicos obtenidos de la fracción acuosa (G) (Figura 2), ilustran las diferencias entre los genotipos

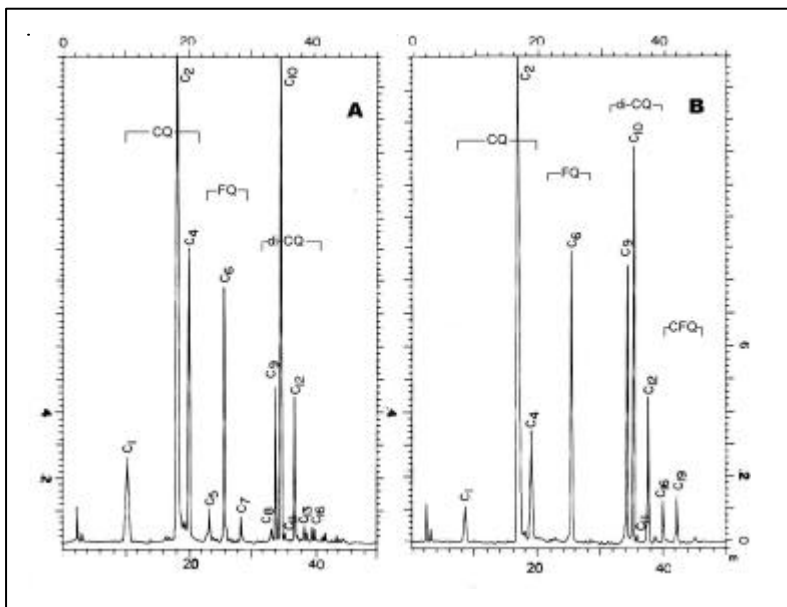
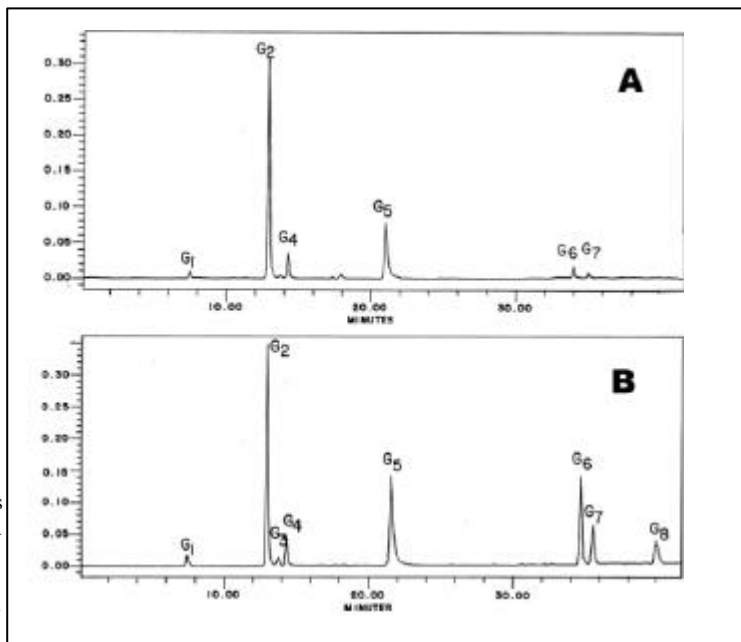


Figura 1. Separación por CLAE de los ácidos hidroxicinámicos de la fracción de acetato de etilo de los granos de café verde. Variedad Típica de *C. arabica* (A); Introducción BP4 de *C. canephora* (B). c₁...c₂₂ (ácidos hidroxicinámicos).

Figura 2.
 Separación por CLAE de los compuestos glicosídicos de la fracción acuosa del grano de café verde. Variedad Típica de *C. arabica* (A); Introducción BP4 de *C. canephora* (B).
 $G_1 \dots G_{22}$ (compuestos glicosídicos).



Típica (A) y *C. canephora* BP4 (B), que resultaron ser las más sobresalientes.

Los valores cuantificados de cada compuesto en cada uno de los genotipos se incluyeron en una matriz con el fin de realizar el análisis multivariado. El ACP resumió los datos del total de picos separados en cinco componentes o ejes que representan el 88% de la variación total (7, 9). El eje 1, discriminó las muestras principalmente con base en los contenidos de derivados hidroxicinámicos de la fracción de acetato de etilo mientras que los compuestos glicosídicos tuvieron una participación importante en la construcción del eje 2, a pesar de su baja concentración con relación al contenido total de derivados hidroxicinámicos (1,0 a 4,0%).

El eje 1, separó las introducciones de *C. canephora* del resto de genotipos mientras que el eje 2 mostró una clara separación entre la variedad Típica y los demás cafés (Figura

3). La clasificación ascendente jerárquica conformó cuatro grupos con los genotipos. La agrupación fue confirmada por medio de un análisis factorial discriminante, el cual indicó que los genotipos fueron clasificados correctamente en el 100% de los casos. La caracterización de los grupos formados se realizó con base en los contenidos de los derivados hidroxicinámicos. En la Figura 4, se representan los promedios de los valores destacándose las claras diferencias existentes entre los grupos. En el grupo I, conformado por las tres introducciones del Híbrido de Timor estudiadas, la variedad Caturra de *C. arabica*, la variedad Colombia y la generación F1 de Caturra x Híbrido de Timor, se encontraron los más bajos contenidos, tanto de ácidos hidroxicinámicos como de glicósidos. El grupo II, que contiene las introducciones Centro 1 y BP46, de *C. canephora*, presentó los más altos contenidos de ácidos hidroxicinámicos, principalmente de C15 a C22 (ácidos dicafeilquinicos y cafeilferuloilquinicos) y altos

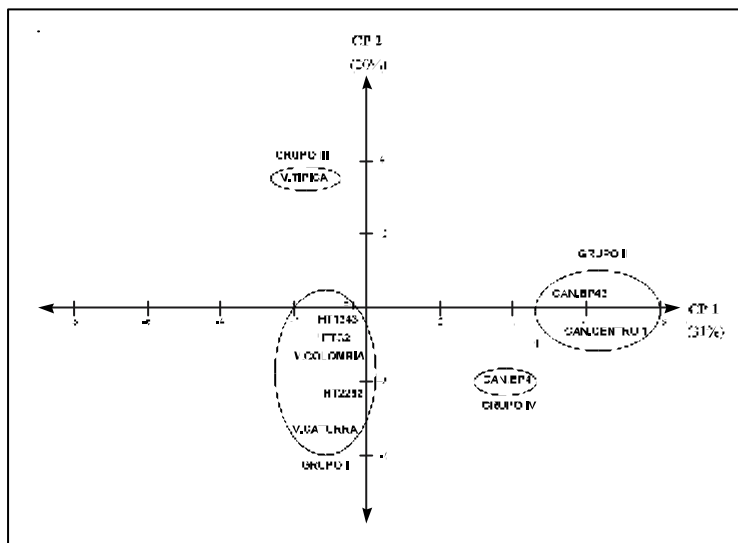


Figura 3. Representación de los genotipos en el plano 1-2 del análisis de los componentes principales y su agrupación de acuerdo con la clasificación ascendente jerárquica. Híbrido de Timor (HT); *C. canephora* (CAN), Variedad (V).

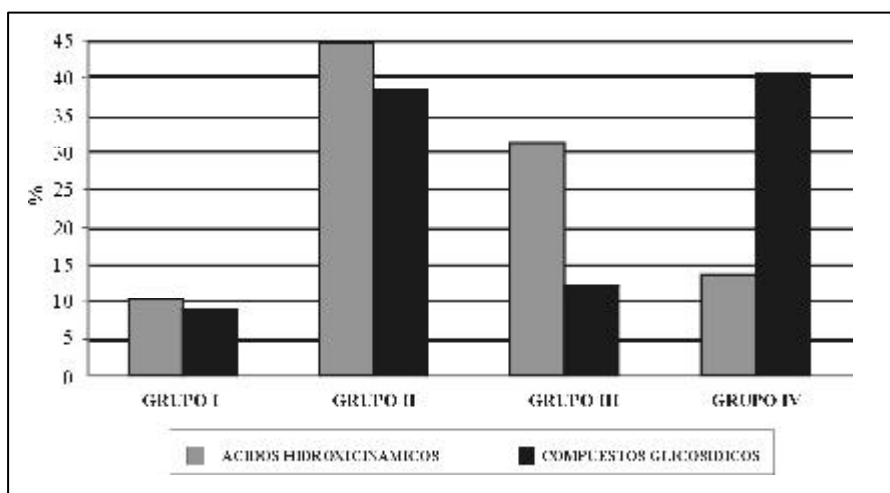


Figura 4. Representación de los contenidos promedio en derivados hidroxicinámicos de los grupos formados por el análisis multivariado. GRUPO I=Variedad Caturra, Variedad Colombia, introducciones del Híbrido de Timor 2252, 832 y 1343; GRUPO II=*C. canephora* control 1 y *C. canephora* BP46; GRUPO III= Variedad Típica; GRUPO IV= *C. canephora* BP4.

contenidos de compuestos glicosídicos. El grupo III, al cual solamente pertenece la variedad Típica, de *C. arabica*, se caracterizó por un contenido intermedio de ácidos hidroxicinámicos, enriquecido particularmente en los ácidos C1, a C10 (ácidos cafeoilquinicos

y feruloilquinicos) y un bajo contenido de compuestos glicosídicos. Finalmente, el grupo IV, formado solo por el genotipo de *C. canephora* BP4, tuvo un bajo contenido de ácidos hidroxicinámicos, pero el mayor contenido en compuestos de la fracción glicosídica.

Los ácidos hidroxicinámicos identificados en cada genotipo se presentan en la Tabla 1. Analizando los compuestos por grupos de isómeros se observa que en el rango correspondiente a los ácidos cafeilferuloilquínicos (CFQ), (trr 2,03 a 2,57, según Clifford), se identificaron los ácidos 3,4-CFQ y 4,5-CFQ. Los contenidos más altos de estos dos ácidos los presentaron las introducciones de *C. canephora*, mientras que en los demás genotipos se encontraron en concentraciones muy bajas o no se detectaron; el compuesto mayoritario dentro de este grupo de isómeros fue el ácido 4,5-CFQ.

En el grupo de los ácidos di-cafeilquínicos (di-CQ) (trr 1,73 a 1,92), se identificaron los ácidos 3,4-diCQ, 3,5-diCQ y 4,5-diCQ, presentes en todos los genotipos; el ácido 3,5-diCQ fue el mayoritario en este grupo y sus contenidos más altos correspondieron a las introducciones de la especie *C. canephora* BP46 y Centro 1.

En el grupo de los ácidos feruloilquínicos (FQ) (trr 1,26 a 1,44) se identificaron los ácidos

5-FQ y 4-FQ. El compuesto mayoritario fue el ácido 5-FQ, el cual se encontró en todos los genotipos y las concentraciones más altas de este compuesto las presentaron las introducciones BP46 y Centro 1 de *C. canephora*.

Finalmente, en el grupo de los ácidos cafeilquínicos (CQ) (trr 0,72 a 1,13) solamente se identificó el ácido 5-CQ, que es el compuesto mayoritario en todos los cafés estudiados, con un contenido que varió entre 45% y 75% de los ácidos fenólicos totales; el compuesto de trr 1.13, no se encontró en las introducciones BP46 y Centro 1 de *C. canephora*, mientras que en la introducción BP4 su concentración fue la mayor.

La presencia, o ausencia, de algunos compuestos abre la posibilidad de emplearlos como discriminantes en determinados casos. En este sentido, el isómero 4,5-CFQ, presente en la mayoría de materiales, a excepción de las variedades Caturra y Típica, serviría para separar estas variedades del resto de genotipos. Su presencia en la variedad Colombia y en la F1 de Caturra x Híbrido de Timor, sugiere que el

Tabla 1. Identificación y cuantificación de los derivados de ácidos hidroxicinámicos (AH) de cada genotipo de café, por comparación de los tiempos de retención relativos al ácido 5-cafeilquínico reportados por Clifford (5), ($\mu\text{g/g}$ en base seca).

ISÓMEROS DE AH	Trr	GENOTIPOS DE CAFÉ										
		V. CATURRA	V. TÍPICA	V. COLOMBIA	F1	HT 1343	HT 831	HT 2352	CAN BP1	CAN BP46	CAN CEN1	
DESCONOCIDO	0,72	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
Ac.5-CQ	1,00	++++	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++	++++	++++
DESCONOCIDO	1,13	+	+	-	+	+	+	+	++	ND	ND	ND
Ac.4-FQ	1,26	++	+	-	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND
DESCONOCIDO	1,30	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ac. 3+4	1,36	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DESCONOCIDO	1,44	ND	++	++	+	++	++	++	NU	++	NU	NU
Ac.3,5-diCQ	1,73	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ac.3,5-diCQ	1,89	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ac.4,5-diCQ	1,92	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Ac.3,4-GFQ	2,03	ND	+	ND	ND	ND	++	+	++	++	++	++
DESCONOCIDO	2,04	+	ND	-	ND	+	++	+	ND	ND	ND	ND
DESCONOCIDO	2,13	ND	ND	ND	ND	++	ND	ND	+++	++	+++	+++
DESCONOCIDO	2,21	ND	ND	ND	ND	+	++	+	++	++	++	++
Ac.4,5-GFQ	2,30	ND	ND	-	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
DESCONOCIDO	2,57	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++	ND	++	++

+ < 150; ++ 150-250; +++ 250-500; ++++ 500-1000; +++++ > 1000

*Tiempo de retención relativo (trr), Variedad (V), Híbrido de Timor (HT), *C. canephora* (CAN),

Primer generación del cruce de Caturra x Híbrido de Timor (F1), No detectado (ND)

compuesto proviene de la especie *C. canephora*, a través del progenitor Híbrido de Timor.

A su vez, las variedades Típica y Caturra podrían diferenciarse entre sí por medio del ácido 3,4-CFQ y del compuesto con trr 1.44, identificado en este estudio por primera vez como el ácido 4'-O-[β -D-6''-O-(*trans*-cumaril) glucopiranosil]-5-*p-cis*-cumarilquinico, presentes en la primera variedad pero no detectados en la segunda. De igual forma, el ácido 4-FQ podría emplearse para diferenciar los materiales de *C. canephora* del resto de genotipos, ya que no se detectó en ninguna de las tres introducciones de esta especie.

Las introducciones del Híbrido de Timor 832 y 2252, presentan la misma composición en ácidos hidroxicinámicos, pero difieren de la introducción 1343 en los compuestos 3,4-CFQ, ausente en la introducción 1343 y el compuesto con trr 2.13 no identificado, presente solamente en la introducción 1343. La ausencia del ácido 3,4-CFQ en la progenie F1 de Caturra x Híbrido de Timor 1343 y en la variedad Colombia, que procede de este cruce, sugiere la posibilidad de usar este compuesto para identificar los materiales según la introducción del Híbrido de Timor empleada en los cruzamientos.

Con relación a los glicósidos de la fracción acuosa se encontraron diferencias entre los genotipos en las concentraciones de los ácidos mayoritarios: 4'-O-(α -D-glucopiranosil)-5-*trans*-cafeoilquinico (G2) y el 4'-O-(α -D-glucopiranosil)-5-*trans*-feruloilquinico (G5), identificados por primera vez en este estudio (7,9). Sin embargo, fueron los compuestos G6 y G7 y G8 los que se detectaron solamente en las introducciones de *C. canephora* y podrían servir para discriminar estos cafés del resto de materiales estudiados. El compuesto G8 se identificó parcialmente como un glicósido del ácido dicafeilquinico.

En general, no se encontraron diferencias importantes en la composición de derivados hidroxicinámicos de la generación F1 de Caturra x Híbrido de Timor y de la variedad Colombia (generación F6 de este cruzamiento), lo que podría indicar que la selección por caracteres agronómicos realizada para obtener esta variedad no afectó la composición de estos compuestos.

De acuerdo con el análisis multivariado de todos los derivados hidroxicinámicos, las variedades Caturra, Colombia, las introducciones del Híbrido de Timor y la generación F1 de Caturra x Híbrido de Timor se clasificaron en el mismo grupo, lo que puede explicarse por el parentesco existente entre ellos. En el caso del Híbrido de Timor indica una mayor proximidad con la especie *C. arabica* que con la *C. canephora*. La variedad Típica, de *C. arabica*, se clasificó en un grupo diferente al de la variedad Caturra, resultado de interés que vale la pena destacar considerando la homogeneidad de la especie *C. arabica*.

Las introducciones de *C. canephora*, se caracterizaron por la alta concentración en los isómeros de ácidos di-cafeilquinico y cafeilferuloilquinico así como por la presencia de algunos glicósidos como el del ácido dicafeilquinico, diferenciándose claramente del resto de genotipos. Igualmente se evidenciaron diferencias entre las introducciones debidas a la variabilidad propia de esta especie.

Las introducciones del Híbrido de Timor presentaron una variación mínima en la composición de los derivados hidroxicinámicos, que hizo imposible su discriminación.

Se concluye que fue posible discriminar los genotipos estudiados utilizando el análisis de derivados hidroxicinámicos, tanto con la información de los perfiles cromatográficos como con compuestos específicos, algunos de és-

tos, identificados por primera vez en este trabajo. Además, la similitud en la composición química entre la variedad Colombia y los genotipos de *C. arabica* estudiados confirma el comportamiento de la variedad Colombia como una variedad más de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean ofrecer sus agradecimientos a COLCIENCIAS por el apoyo económico y a CENICAFÉ por proveer los materiales y todos los medios para hacer posible esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. ANDRADE, P. B.; LEITAO, R.; SEABRA, R. M.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M.A. 3,4-dimetoxicinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. Robusta and *Coffea arabica*. Food Chemistry 61: 511-514. 1998.
2. ANTHONY, F.; CLIFFORD, M.R.; NOIROT, M. Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. Genetic Resource. Crop Evolution 40: 61-70. 1993.
3. BICCHI, C.P.; BINELLO, A.E.; PELLEGRINO, G.,M.; VIANNI, 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: 1549-1555. 1995.
4. CASTILLO Z.,J.; MORENO R., L.G. La variedad Colombia selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. Chinchiná, Cenicafé, 1988. 171 p.
5. CLIFFORD, M.,N. ; KELLARD, B. ; BIRCH, G. Characterisation of caffeoylferuloylquinic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxyde. Food Chemistry 34: 81-88. 1989.
6. CLIFFORD, M., N.; WILLIAMS, T.; BRIDSON, D.M. Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. Phytochemistry 28: 829-838. 1989.
7. GUERRERO A., G. Metabolitos secundarios que diferencian la Variedad Colombia de otros genotipos de café. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 2001. 191 p. (Tesis: Doctor en Química).
8. GUERRERO A., G.; SUÁREZ, M.; MORENO R., L.G. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:2454-2458. 2001.
9. GUERRERO A., G.; SUÁREZ, M.; MORENO R., L.G. Hydroxycinnamic acids as a genotype discrimination criteria for green coffee beans *In: Colloque Scientifique International sur le Café*, 19. Trieste, Mayo 14-18, 2001. Paris, ASIC, 2001. 7 p.
10. RAKOTOMALALA, J. Diversité biochemique des cafeiers. Montpellier, Université de Montpellier II, 1992. 213 p. (Tesis : Doctorado).
11. RAKOTOMALALA, J. ; CROSS, E. ; CLIFFORD, M.N. ; CHARRIER, A. Quelques acides phenols particuliers des fèves de caféiers sauvages malgaches et africaines. *In: Colloque Scientifique International sur le Café*, 15. Montpellier, Juin 6-11, 1993. Paris, ASIC, 1993. p. 637-643.