

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



INFORME DE PRÁCTICAS PRE-PROFESIONALES

Propuesta de método para determinación del antinutriente cafeína en pulpa de café mediante UPLC

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: Br. ZELADA CASTILLO, Stephanie Lorena

ASESOR: Dra. MARÍN TELLO, Carmen Luisa

TRUJILLO- PERÚ

2021

DEDICATORIAS

A mi Dios:

Quien me confortó en los momentos es que estaba confundida, me dio fuerzas para levantarme y seguir. Por guiarme con su sabiduría infinita para no dudar ni torcer mi camino. Quien siempre estuvo allí aun cuando yo no. Por darme la vida y cubrirme de amor.

A mis padres:

Carlos y Lorena

Por los buenos consejos, por estar siempre a mi lado incondicionales, por los días en que me animaron a seguir adelante con paso firme. Por siempre estar orgullosos de mí y celebrar mis triunfos como los suyos propios. Por cuidarme y darme una buena vida llena de amor. Por ser mis ejemplos de vida. A quienes les debo todo lo que soy.

A mis hermanos:

Enzo y Nick

Por acompañarme todo este tiempo y darme ánimos siempre. Por ser mis amigos y buenos hermanos, comprendiéndome y ayudándome en lo que podía. Y por compartir momentos gratos que llevare en el recuerdo.

Stephanie Lorena Zelada Castillo

PRESENTACIÓN

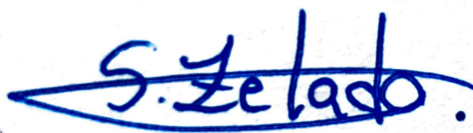
Señores miembros del jurado dictaminador:

Dando cumplimiento a lo establecido por el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo – La Libertad, someto a vuestra honorable consideración y elevado criterio profesional el presente Informe de prácticas pre-profesionales:

Propuesta de método para determinación del antinutriente cafeína en pulpa de café
mediante UPLC

Es propicia la oportunidad para manifestar mi más sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y toda su plana docente que con su capacidad, buena voluntad y enseñanzas que se imparten día a día contribuyen positivamente a nuestra formación profesional.

Dejo a vuestro criterio Señores Miembros de Jurado dictaminador, invocando su comprensión a los errores que involuntariamente haya cometido, esperando su veredicto en la calificación del presente informe.



ZELADA CASTILLO Stephanie Lorena

Trujillo, junio del 2021

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Alma Mater, la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, por ser mi segunda casa y formarme adecuadamente como profesional. Por las enseñanzas brindadas tanto en el ámbito académico como el moral. Y por todas esas experiencias y recuerdos que llevaré siempre en la memoria.

Al Proyecto de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

“Aprovechamiento del subproducto pulpa de café del distrito de Lonya Grande – Amazonas como nueva alternativa alimenticia para combatir la desnutrición y la anemia en poblaciones vulnerables del Perú”. Por brindar el apoyo económico para solventar los gastos que se requirieron para la realización de este trabajo.

A la Dra. Carmen Marín Tello por darme su confianza y brindarme la oportunidad de trabajar con ella. Por las enseñanzas y los consejos brindados a lo largo de este tiempo tanto como profesora, asesora y amiga. Y ayudarme con su experiencia y conocimiento a realizar un buen trabajo.

A la Dra. Ines Castro Dionicio por la ayuda brindada para hacer posible este trabajo, también por los consejos y enseñanzas que llevaré en el recuerdo.

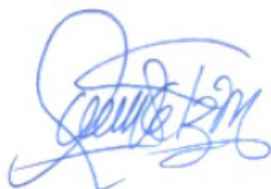
Stephanie Lorena Zelada Castillo

JURADO DICTAMINADOR



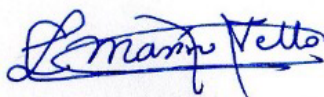
Dr. Curo Vallejos Yuri Freddy

PRESIDENTE



Mg. Danny Daniel Gutiérrez Mendoza

MIEMBRO



Dra. Marín Tello Carmen Luisa

ASESOR

RESUMEN

En los procesos fisiológicos desarrollados en la alimentación, se pueden encontrar antinutrientes que podrían influenciar en el organismo como estimulantes o depresores de algunas funciones, dentro de estos la cafeína, por lo que es necesario, conocer sus concentraciones por métodos confiables que garanticen la inocuidad alimentaria. Se cuantificó cafeína en pulpa de café mediante UPCL (Cromatógrafo Líquido de Ultraperformance). En muestras de variedades y alturas diferentes, Catimor- Colombia y Villa Sarchi, cultivadas a 1606 y 1420 m.s.n.m. respectivamente. Se obtuvo para la muestra de las variedades Catimor-Colombia 452.3 mg/100g de muestra seca y para la muestra de Villa Sarchi se obtuvo 340.9 mg/100g de muestra seca. Se determinó que la muestra de las variedades Catimor-Colombia presentó mayor cantidad de este metabolito en comparación con la muestra de Villa Sarchi. Los resultados presentaron menor contenido de cafeína en comparación a otros autores. Se propone este método que permitiría disminuir el tiempo y el costo de los reactivos utilizados.

Palabras clave: pulpa de café, cafeína, Amazonas, UPCL, desecho.

ABSTRACT

In the physiological processes developed in the diet, antinutrients can be found that could influence the body as stimulants or depressants of some functions, within these caffeine, so it is necessary to know their concentrations by reliable methods that guarantee food safety.

Caffeine was quantified in coffee pulp using UPCL (Ultraperformance Liquid Chromatograph). In samples of different varieties and heights, Catimor- Colombia and Villa Sarchi, cultivated at 1606 and 1420 m.a.s.l.m. respectively. It was obtained for the sample of the varieties Catimor-Colombia 452.3 mg / 100g of dry sample and for the sample of Villa Sarchi was obtained 340.9 mg / 100g of dry sample. It was determined that the sample of the Catimor-Colombia varieties presented a greater amount of this metabolite compared to the sample of Villa Sarchi. The results were lower in caffeine compared to other authors. This method is proposed to reduce the time and cost of the reagents used.

Keywords: coffee pulp, caffeine, Amazon, UPCL, waste.

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

PRESENTACIÓN

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MATERIAL Y MÉTODO	06
III. RESULTADOS	09
IV. DISCUSIÓN	10
V. CONCLUSIONES	13
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
ANEXOS	19

I. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas mundialmente y el segundo producto más comercializado después del petróleo, por ello presenta gran importancia económica y social en países los más de 50 países donde es cultivado. Se estima que anualmente se produce unos 9 millones de toneladas ¹². Esta producción está dividida en un 20% para café robusta y el 80% para café arábica ³.

Taxonómicamente, la *Coffea arabica* pertenece a la familia de las *Rubiáceas*, genero *Coffea*, subgénero *Eucoffea* y especie arábica; se encuentra en regiones tropicales y subtropicales del mundo ^{4,5}. Se obtiene el café verde mediante el llamado beneficio húmedo, que consiste en la extracción del grano de café de la cáscara-pulpa y eliminación del mucílago para después secarlo ⁶. La pulpa representa el 29% del total del fruto y un 40 a 42% del peso del fruto fresco, eso lo convierte en el subproducto más voluminoso que junto al mucílago son una fuente importante de desechos y contaminación debido al inadecuado proceso de eliminación ^{2,7-9}.

Se estima que, por cada dos toneladas de café, se produce alrededor de una tonelada de pulpa de café lo que lleva a considerarlo como un riesgo considerable para el medio ambiente. La pulpa y el mucílago generados durante el beneficio húmedo del café, para la obtención de una arroba de café pergamino seco, producen una contaminación equivalente a la generada por los excrementos y orina de 100 personas en un día ¹⁰⁻¹².

Entre las características nutricionales de la pulpa de café está el contenido de proteínas (4-12 g/100g de base seca), carbohidratos (45-89 g/100g de base seca) y lípidos (1-2 g/100g de base seca). También presenta minerales (6-10 g/100 g de base seca) siendo el potasio, calcio, magnesio y fósforo los de mayor cantidad, pero también contiene hierro y zinc ^{8,13}. Además, cuenta con la presencia de antioxidantes, en el que destacan los

polifenoles, alcaloides, ácidos fenólicos, cafeicos, entre otros. Dándole características anticarcinogénicas, anticancerígenas, y antimutagénicas ^{2,3}.

Se han realizado estudios para usos alternativos de este subproducto como la producción de combustible, alimentos para animales, fertilizantes orgánicos, sustratos fermentables para uso de cultivos, cultivo de hongos comestibles, procesos de compostaje y extracción de compuestos activos y minerales ^{2,8}. A pesar de los intentos de usar la pulpa de café como alimento en animales y humanos, se ha visto limitado por la presencia de factores antinutricionales, como la cafeína y los compuestos fenólicos ¹⁴⁻¹⁷.

La cafeína es un alcaloide que dentro de sus propiedades biológicas se considera como un estimulante del sistema nervioso central simpático y cardiaco, un relajante del musculo liso, diurético y vasodilatador. Estas características lo han llevado a ser considerado dentro de la industria farmacéutica como un importante metabolito de uso medicinal. Se debe tener en cuenta también que el consumo crónico en cantidades superiores a 400 mg/día puede generar ansiedad crónica, nerviosismo, insomnio, dolor de cabeza y tensión muscular ^{18,19}.

Naturalmente la cafeína la encontramos en el café, té y cacao, pero existen también bebidas como gaseosas y energizantes donde se encuentra como un aditivo. Por ejemplo, en 250 ml de café, té o bebida energizante encontramos de 80 a 100 mg, de 30 a 50 mg y 40 a 250 mg de cafeína respectivamente, en una lata de gaseosa de 355 ml hay de 30 a 40 mg de cafeína. En cuanto al cacao, puede ser consumido como chocolate, que, dependiendo del tipo, las concentraciones de cafeína varían. Por ejemplo, un chocolate 100% puro de 100 g hay 240 g de cafeína. Según la FDA menciona que la dosis diaria en adultos no debe pasar de los 400 mg/día, que es equivalente a 4 o 5 tazas de café. Por otro lado también hace hincapié en que no recomienda el consumo de cafeína o

estimulantes en niños y adolescentes, aunque algunos estudios recopilaron datos donde, bajo el método de investigación de dosis-respuesta y controlados con placebo, analizaron parámetros como la función cardiovascular, el estado de ánimo y el rendimiento cognitivo; concluyeron en que las dosis aplicadas que iban desde 50 a 300 mg no fueron agudamente dañinas ^{19,20}. Pero se debe tener en cuenta que existen autores que reportan que entre los 100 a 400 mg, los niños pueden presentar ansiedad, náuseas, nerviosismo entre otros síntomas ²¹.

Dentro de las características antinutricionales de la cafeína se destaca su interacción con el hierro, donde afecta la biodisponibilidad de este ¹. Si se toma una taza de 250 ml de café o té, puede disminuir la biodisponibilidad del hierro en un 39 y 60% respectivamente si se toma una hora después de comer ²². También hay estudios que comentan que el consumo de 2 tazas de café diarias (450 ml) en madres lactantes, puede también disminuir el hierro en la leche materna ayudando así a la aparición de anemias infantiles. Sin embargo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria concluyó que el consumo de una dosis única de dos tazas de café (200 mg de cafeína) o menos, no genera problemas en los lactantes ¹⁹.

Otra interacción de la cafeína es con el calcio ya que disminuye su absorción, además que debido a su característica diurética, acelera la eliminación de este mineral ¹²³. Lo que podría presentar un riesgo en la salud ósea, por ejemplo ²⁴. Sin embargo, no se cuenta con la información de a partir de cuanta concentración de cafeína se podría ver este efecto.

El UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), es una técnica relativamente nueva que busca la reducción de tiempo y consumo de disolventes ²⁵. Por ello se ha convertido en una tecnología ampliamente utilizada, que aprovecha al máximo los

principios cromatográficos para realizar la separación, utilizando columnas cortas empaquetadas con partículas más pequeñas (por debajo de 2 μm). Esto ha llevado a un tiempo de análisis más corto, una mayor eficiencia máxima, una mejor resolución y un menor uso de disolventes en comparación con la cromatografía líquida convencional de alto rendimiento (HPLC). Por otro lado, el sistema UPLC permite la detección de analitos a concentraciones muy bajas debido a la mejora de la relación señal/ruido. Además, el volumen de inyección en UPLC se puede reducir significativamente sin pérdida de sensibilidad ²⁶.

Por lo que considerando que la pulpa de café es un contaminante potencial para el medio ambiente que no es utilizado o desechado adecuadamente, que genera la mayor fuente de contaminación ambiental en la zona cafetalera. En el presente trabajo se propone una metodología para determinar al antinutriente cafeína presente en la pulpa de café, con el fin de generar conocimientos sobre la fisiología de la nutrición y el metabolismo de esta sustancia para fortalecer los procesos y en la innovación de productos alimenticios basados en este subproducto. Asimismo, considerando que la forma tradicional de determinar cafeína es mediante HPLC, es necesario encontrar y proponer métodos que permitan ahorrar tiempo y el consumo de reactivos. En este trabajo se propone un nuevo método para su determinación mediante UPLC.

Objetivo General:

Proponer un método para la determinación de cafeína mediante UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) en pulpa de café.

Objetivo Específicos:

- ✓ Extraer cafeína de las muestras de pulpa de café
- ✓ Determinar los parámetros para la determinación de cafeína mediante UPLC

- ✓ Cuantificar cafeína por UPLC en muestras de pulpa de café

Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 MATERIAL:

2.1.1 MATERIAL BOTÁNICO

Se empleó pulpa de café (*Coffea arabica L.*), procedente de Lonya Grande, Amazonas, de las variedades Catimor-Colombia y Villa Sarchi

2.1.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- El de uso común de laboratorio.

2.1.3 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Balanza analítica marca A&D Weighing GR-200
- Tamiz de 500 μm de diámetro de partícula
- Molino de tornillo
- UPLC ACQUITY H-Class
- Agitador magnético de 10 posiciones IKA RT 10
- Rotaevaporador Heidolph Laborota 4003

2.1.4 REACTIVOS

- Ácido fórmico
- Éter anhidro
- Metanol
- Acetonitrilo
- Estándar de cafeína

2.2 MÉTODO:

2.2.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se utilizaron 2 muestras de pulpa de café de las variedades Catimor-Colombia y Villa Sarchi, colectadas en los meses de agosto y setiembre del 2020, procedentes de Lonya Grande – Amazonas a una altitud de entre 1400-1600 m.s.n.m. Las muestras fueron entregadas secas, con una humedad de entre el 8-10% y con certificación de orgánicas.

2.2.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se molieron con un molino de tornillo las muestras, luego se tamizaron con un tamiz de malla de 500 μm de tamaño de partícula ²⁷.

2.2.3 EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA

Se llevó bajo agitación (150 rpm) 1 g de pulpa de café seca a temperatura ambiente con éter anhidro (3×10 ml, 5 min cada uno), luego con metanol acuoso (40:60, v/v) acidificado con ácido fórmico del 2% (v/v) (4×10 ml, 15 min). Luego los extractos metanólicos se combinaron y concentraron al vacío. Después los extractos se aforaron a 25 ml con metanol puro y se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 0.2 μm para las determinaciones en UPLC. Todas las extracciones se realizaron por triplicado ²⁸.

2.2.4 DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA MEDIANTE UPLC

Se utilizó un sistema UPLC ACQUITY H-Class equipado con una columna ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (10mm x 2.1 mm, 1.8 μm), protegida por un filtro en línea de 0.2 μm . La fase móvil consistió en H₂O que contenía 0,1% de ácido fórmico (disolvente A) y acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico (disolvente

B). El programa de gradiente lineal fue el siguiente: 0-1 min, 3% B; 1-6 min, 3-10% B; 6-15 min, 10- 50% B; 15-20 min, 50-90% B; 20-22 min, 90% B; 22-25 min, 90-3% B; 25-32 min, 3%. La temperatura de la columna se estableció hasta 25°C, las muestras se mantuvieron a 4°C en el gestor de muestras, el caudal fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección fue de 5 µl. El PDA se fijó en 280 nm una tasa de adquisición de datos de 20 Hz. Se utilizó estándar de cafeína a 10 ppm^{28 29}.

Para la curva de calibración de tomaron las siguientes concentraciones: 40, 20, 10, 5 y 2.5 ppm.

2.2.5 ANÁLISIS DE DATOS

Se aplicó una prueba de T de dos colas, con un nivel de significancia de $p < 0.05$ para los promedios de contenido de cafeína.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Contenido de cafeína en pulpa de café en mg/100g muestra seca

Muestra		mg cafeína /100 g pulpa seca	Promedio	Desviación estándar
Catimor-Colombia (1606 m.s.n.m)	A1	443.01	452.33	13.18
	A2	461.65		
Villa Sarchi (1420 m.s.n.m)	B1	341.96	340.93	22.16
	B2	318.27		
	B3	362.56		

IV. DISCUSIÓN

Se cuantificó cafeína presente en la pulpa de café mediante UPLC, para ello se trabajó con dos muestras de variedades y alturas diferentes. Una fue una mezcla de las variedades de Catimor y Colombia cultivada a una altura de 1606 m.s.n.m. y la otra muestra fue de la variedad Villa Sarchi cultivada a 1420 m.s.n.m.

En la tabla 1 se aprecia que el contenido de cafeína para la muestra de las variedades Catimor-Colombia fue 452.33 mg/100 g de muestra seca, mientras que la muestra de la variedad Villa Sarchi fue 340 mg/100 g de muestra seca. En la literatura se menciona que el rango de cafeína va entre 0.7 a 1.8 %, si se hacen las conversiones las muestras presentan datos por debajo de esas cifras ^{2,15,30}. Otros autores como da Silveira y col²⁸ reportaron 5.6 g/kg de muestra seca, por otro lado, Salinas-Rios y col³¹ hallaron 5.72 mg/g, estos datos que se asemeja más a los obtenidos. Sin embargo, Arimurti y col³² mencionan que el contenido de cafeína en *C. arabica* es 0.26%, lo que colocaría los resultados dentro del rango.

También se puede notar que hay una diferencia significativa entre los promedios de contenido de cafeína de las muestras trabajadas. La muestra de más altura de la mezcla de las variedades Catimor-Colombia mostró mayor cantidad de cafeína en relación con la muestra de menor altura de la variedad Villa Sarchi. Esto se puede deber a diversos factores, como las condiciones de suelo donde fueron cultivadas, condiciones ambientales, el uso de abono o incluso las características biológicas propias de cada variedad ²⁷. Ya que según lo revisado anteriormente hay un amplio rango en lo que contenido se refiere.

Lara³³ menciona que hay una relación entre el contenido de cafeína y la altura, a partir de los 880 m.s.n.m. se puede notar esta relación. Así mismo también afirma que la cafeína incrementa con el aumento de niveles de sombra, que se evidencia a partir de niveles de sombra mayores al 55%. Sin embargo, Morales-Ramos y col³⁴ difieren argumentando que

el contenido de cafeína se encuentra influenciado por el contenido de materia orgánica y así mismo, este se asocia al nivel de sombra donde a mayor sombra mayor contenido de materia orgánica en el suelo y menor contenido de cafeína. Además, comenta que, a mayor altura, mayor es el contenido de materia orgánica por lo que se infiere que habrá menor contenido de cafeína en grandes alturas.

Las personas adultas consumen cafeína diariamente en su dieta en el café y el té, aunque también esta presente en los granos de cacao, bebidas gaseosas y energizantes. La FDA recomienda que no se consuma más de 400 mg/día, pues la literatura afirma que al exceder los 250 mg puede haber una intoxicación por cafeína, donde los síntomas incluyen inquietud, excitación, insomnio, aumento de la micción, alteración gastrointestinal, espasmos musculares, latidos del corazón rápidos e irregulares, y agitación psicomotora^{20,35}. Por otro lado, la FDA no recomienda el consumo de cafeína en niños, a pesar de ello, algunos trabajos revelan que el consumo de cafeína en niños y adolescentes a partir de dosis moderadas de 200 a 300 mg se produjo una sensación de bienestar, mejoría en la concentración, aumento de la excitación y energía. Se menciona que la cafeína puede tener efectos positivos en el rendimiento cognitivo en los niños, pero que también que entre los 100 a 400 mg pueden presentar síntomas negativos como los antes mencionados²¹. Si se comparan estos datos con los obtenidos, la pulpa seca presenta una medida segura para un suplemento alimenticio pues en 100 g de muestra hay menos de medio gramo de cafeína, aunque en niños tendría que usarse con cuidado.

Con respecto al método usado, una de las características a destacar es la rapidez con la que analizó la cafeína, a los 10 min se pudo observar el pico de cafeína. Si se compara con el tiempo en que reportaron otros autores mediante HPLC, de entre 20 a 25 min, por UPLC se realizó en la mitad de tiempo^{9,12,28}. Además, otro beneficio encontrado fue la cantidad de muestra, inicialmente se usó 1 g de pulpa de café, pero al momento de hacer las lecturas

debido a la sensibilidad del equipo se tuvo que disolver 100 μ l/2 ml. Por lo que se recomienda que se haga una optimización del tiempo de corrido y de la cantidad de muestra a usar en solo 100 mg de pulpa seca. Con estos ajustes se estaría reduciendo el uso de reactivos durante la extracción, el cual es un contaminante del medio ambiente, como fueron el éter anhidro y el metanol acidificado con ácido fórmico. También se ahorraría en los solventes usados durante las lecturas en el UPLC, obteniéndose un beneficio monetario, medio ambiental y de ahorro de tiempo ^{25,26}.

Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

V. CONCLUSIONES

Se cuantificó cafeína en pulpa de café mediante UPLC, obteniéndose para la muestra de las variedades Catimor-Colombia mayor cantidad de este metabolito en comparación con la muestra de Villa Sarchi. Los valores fueron 452.33 mg/100 g de muestra seca y 340 mg/100 g de muestra seca, respectivamente.

Las muestras trabajadas tuvieron menor contenido de cafeína en comparación a otros autores.

Se determina que la propuesta con UPLC es más costoefectiva, ahorra tiempo y es más amigable con el medio ambiente que el utilizado con el método de HPLC.

Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Ramírez Prada DM. Café, cafeína vs. Salud Revisión de los efectos del consumo de café en la salud. Univ y Salud. 2010;1(12):156–67.
- (2) Rodríguez-Durán L V., Favela-Torres E, Aguilar CN, Saucedo-Castañeda G. Coffee Pulp as Potential Source of Phenolic Bioactive Compounds. In: Chávez-González ML, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilar CN, editors. Handbook of Research on Food Science and Technology. Apple Academic Press Inc.; 2019. p. 107–30.
- (3) Serna-Jiménez JA, Torres-Valenzuela LS, Martínez Cortínez K, Hernández Sandoval MC. Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. Rev Ion, Investig Optim y Nuevos procesos en Ing. 2018 Nov 30;31(1):37–42.
- (4) Burbano Alvear E. Transferencia de conocimientos en propagación de café (coffea) variedad catimore e implementación de buenas prácticas agrícolas en 15 familias del programa red unidos de la vereda el pensil del Municipio de la Argentina Huila. [Tesis de grado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]; 2014.
- (5) Hernández-Acosta E, Trejo-Aguilar D, Ferrera-Cerrato R, Rivera-Fernández A, González-Chávez MC. Hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento del café (Coffea arabica L.). Agroproduktividad. 2018;11(4):61–7.
- (6) Torres-Valenzuela LS, Martínez KG, Serna-Jimenez JA, Hernández MC. Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Fisicoquímicas. Inf tecnológica. 2019 Mar;30(2):189–200.
- (7) Yoplac I, Yalta J, Vásquez H V., Maicelo JL. Efecto de la alimentación con pulpa de café (Coffea arabica) en los índices productivos de cuyes (Cavia porcellus L)

- raza Perú. Rev Investig Vet del Peru. 2017;28(3):549–61.
- (8) Fierro-Cabrales N, Contreras-Oliva A, González-Ríos O, Rosas-Mendoza ES, Morales-Ramos V. Caracterización química y nutrimental de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.). Agroproductividad. 2018;11(4):9–13.
- (9) Ruesgas-Ramón M, Suárez-Quiroz ML, González-Ríos O, Baréa B, Cazals G, Figueroa-Espinoza MC, et al. Biomolecules extraction from coffee and cocoa by- and co-products using deep eutectic solvents. J Sci Food Agric. 2020 Jan 15;100(1):81–91.
- (10) Martínez-Alemán S, Hernández-Castillo F, Aguilar-González C, Rodríguez-Herrera R. Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. Investig Cienc. 2019;27(77):73–9.
- (11) Blandón-Castaño G, Dávila-Arias MT, Rodríguez-Valencia N. Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. Cenicafé. 1999 Mar;50(1):5–23.
- (12) Kieu Tran TM, Kirkman T, Nguyen M, Van Vuong Q. Effects of drying on physical properties, phenolic compounds and antioxidant capacity of Robusta wet coffee pulp (*Coffea canephora*). Heliyon. 2020 Jul;6(7):e04498.
- (13) Oliveira LS, Franca AS. An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. In: Preedy VR, editor. Coffee in Health and Disease Prevention. 1st ed. London, United Kingdom: Elsevier Inc.; 2014. p. 283–91.
- (14) Clifford MN, Ramirez-Martinez JR. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. Food Chem. 1991;40(1):35–42.

- (15) Elías LG, Bressani R. Coffee Pulp: Composition, Technology and Utilization. Braham JE, Bressani R, editors. Ottawa, Canada: International Development Research Centre; 1979. 11–16, 83–88 p.
- (16) Marín-Tello C, Zelada-Castillo L, Vásquez-Arqueros A, Vieira A, Siche R. Coffee Pulp: An Industrial By-product with Uses in Agriculture, Nutrition and Biotechnology. *Rev Agric Sci.* 2020;8:323–42.
- (17) Augur C, Gutiérrez-Sánchez G, Ramirez-Coronel A, Contreras-Dominguez M, Perraud-Gaime I, Roussos S. Analysis of antipysiological components of coffee pulp. In: Laroche C, Pandey A, Dussap CG, editors. *Current Topics in Bioprocesses in Food Industries.* New Delhi, India: Asiatech; 2006. p. 391–402.
- (18) Vega A, Reyes S, Le J De, Bonilla A, Franco H. Cuantificación de cafeína en cafés comerciales de panamá. 2014;30(2):57–64.
- (19) Temple JL, Bernard C, Lipshultz SE, Czachor JD, Westphal JA, Mestre MA. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Front Psychiatry.* 2017 May 26;8(May):1–19.
- (20) FDA. Al grano: ¿cuánta cafeína es demasiada? [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 31]. Available from: <https://www.fda.gov/consumers/articulos-en-espanol/al-grano-cuanta-cafeina-es-demasiada>
- (21) Temple JL. Review: Trends, Safety, and Recommendations for Caffeine Use in Children and Adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2019 Jan;58(1):36–45.
- (22) González Urrutia R. Biodisponibilidad del hierro. *Rev Costarric Salud Pública.* 2005;14(26).

- (23) Moss M. Drugs as anti-nutrients. *J Nutr Environ Med*. 2007 Jan 13;16(2):149–66.
- (24) Nuclear EDM. Cafeína y salud ósea. 2014;10(2):119–21.
- (25) Nováková L, Matysová L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2006;68(3):908–18.
- (26) Klimczak I, Gliszczynska-wiglo A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chem*. 2015;175:100–5.
- (27) Molina Jaramillo EV. Evaluación de la actividad nootrópica del extracto de la Pulpa del café arabica (*Coffea arabica*). [Quito, Ecuador]: Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador; 2018.
- (28) da Silveira JS, Mertz C, Morel G, Lacour S, Belleville M-P, Durand N, et al. Alcoholic fermentation as a potential tool for coffee pulp detoxification and reuse: Analysis of phenolic composition and caffeine content by HPLC-DAD-MS/MS. *Food Chem*. 2020 Jul;319:126600.
- (29) Pan H-B, Zhang D, Li B, Wu Y-Y, Tu Y-Y. A Rapid UPLC Method for Simultaneous Analysis of Caffeine and 13 Index Polyphenols in Black Tea. *J Chromatogr Sci*. 2017 May 1;55(5):495–6.
- (30) Juliastuti SR, Widjaja T, Altway A, Sari VA, Arista D, Iswanto T. The effects of microorganism on coffee pulp pretreatment as a source of biogas production. Kumoro AC, Hadiyanto, Roces SA, Yung L, Rong X, Lothongkum AW, et al., editors. *MATEC Web Conf*. 2018 Mar 14;156:03010.
- (31) Salinas-Rios T, Sánchez Torres T, Ortega Cerrilla ME, Soto Hernández M, Díaz Cruz A, Hernández Bautista J, et al. Changes in composition, antioxidant content,

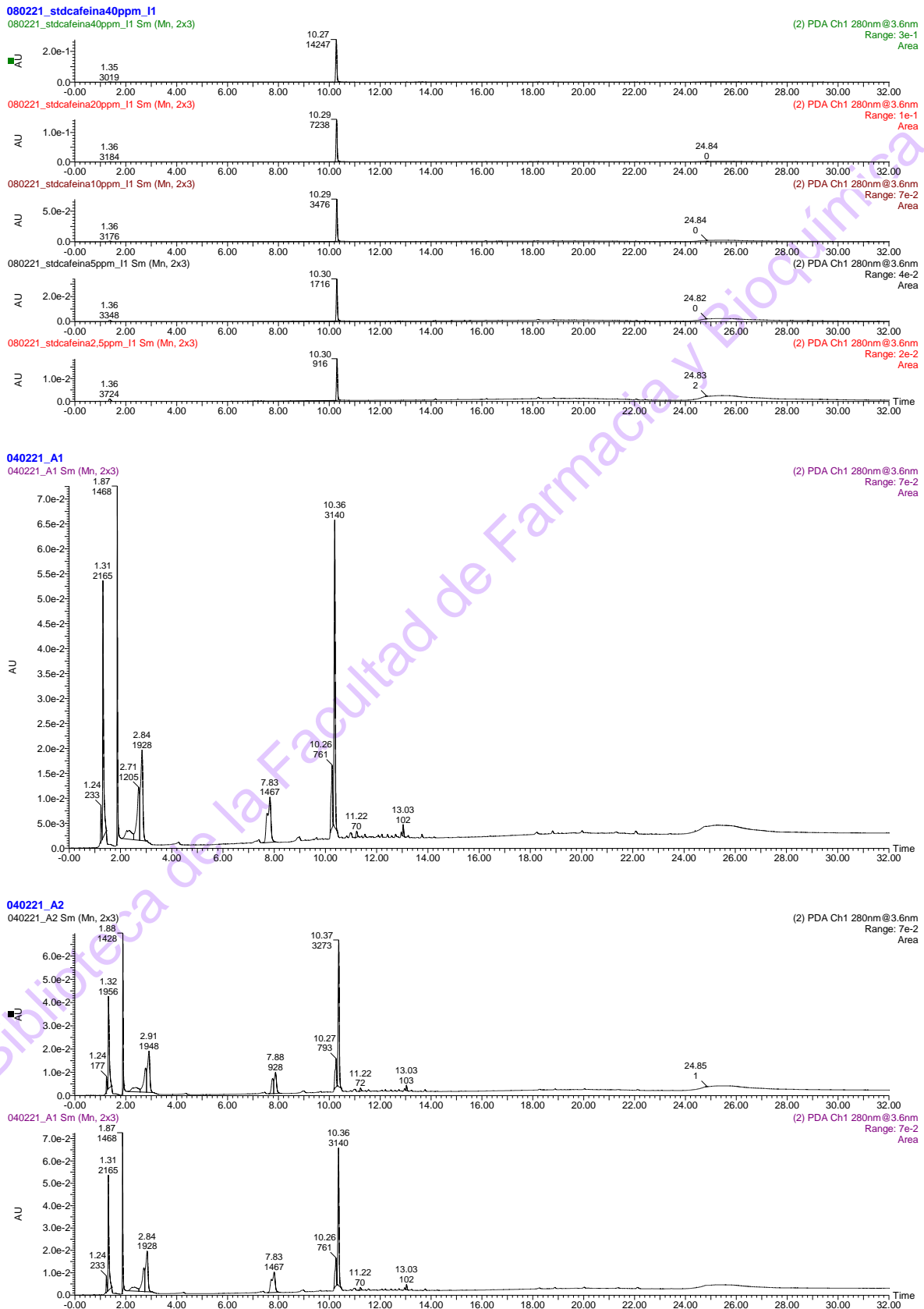
- and antioxidant capacity of coffee pulp during the ensiling process. *Rev Bras Zootec.* 2014 Sep;43(9):492–8.
- (32) Arimurti S, Nurani Y, Ardyati T, Suharjono S. Screening and identification of indigenous cellulolytic bacteria from Indonesian coffee pulp and investigation of its caffeine tolerance ability. *Malays J Microbiol.* 2017;13(2):109–16.
- (33) Lara Estrada LD. Efectos de la altitud, sombra, producción y fertilización sobre la calidad del café (*Coffea arabica* L. var. Caturra) producido en sistemas agroforestales de la zona cafetalera norcentral de Nicaragua. [Turrialba, Costa Rica]: Tesis de maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; 2005.
- (34) Morales-Ramos V, Escamilla-Prado E, Ruiz-Carbajal RA, Pérez-Sato JA, Velázquez-Morales JA, Servín-Juárez R. On the soil–bean–cup relationships in *Coffea arabica* L. *J Sci Food Agric.* 2020 Dec 25;100(15):5434–41.
- (35) AlAteeq DA, Alotaibi R, Al Saqer R, Alharbi N, Alotaibi M, Musllet R, et al. Caffeine consumption, intoxication, and stress among female university students: a cross-sectional study. *Middle East Curr Psychiatry.* 2021 Dec 15;28(1):30.

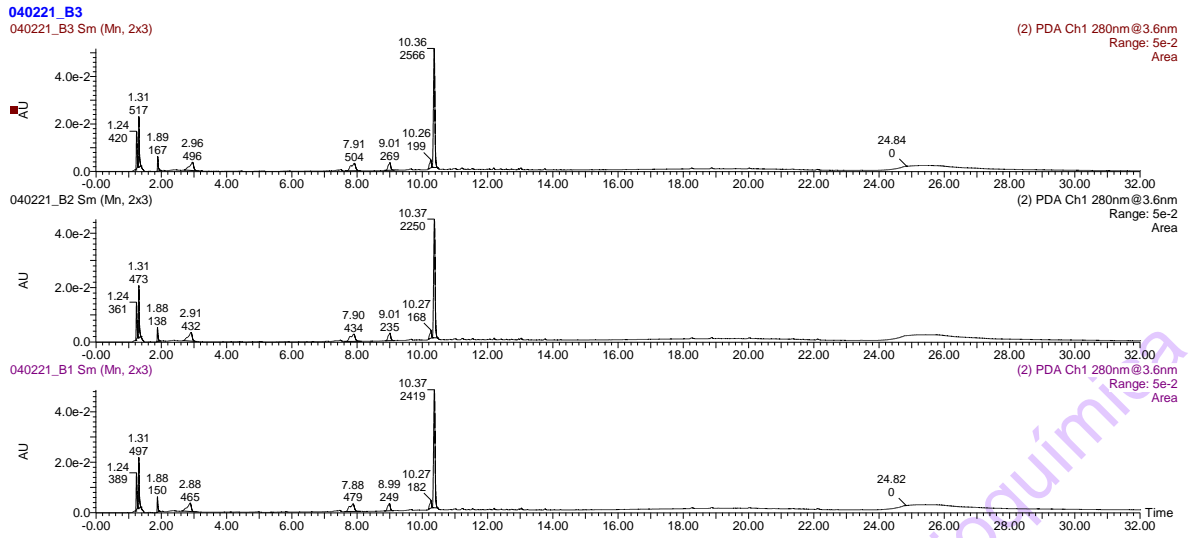
ANEXOS

Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

ANEXO 1

CROMATOGRAMAS DE LOS ESTANDARES Y MUESTRAS

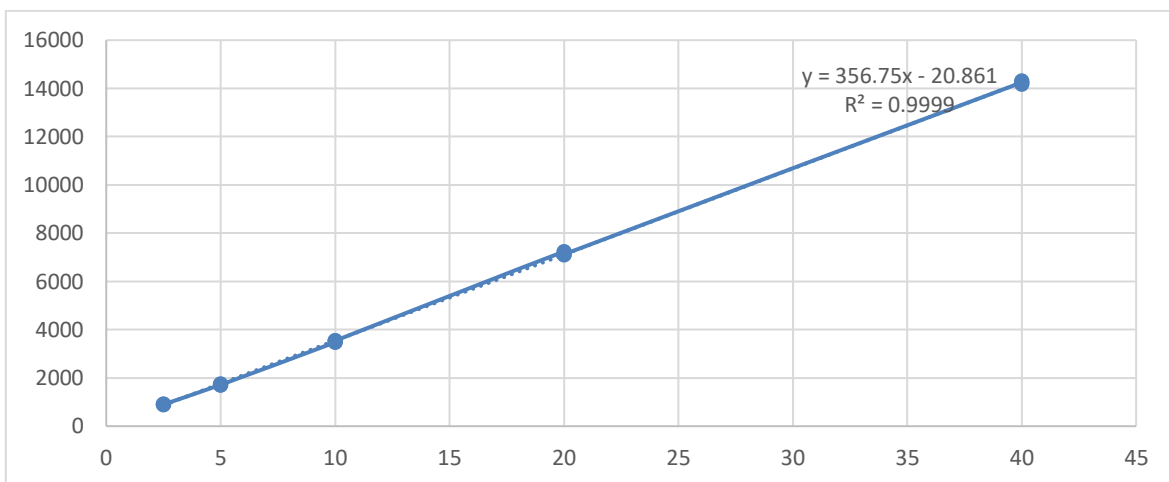




Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN



Concentracion (ug/mL)	Area (AU)
2.5	916
2.5	904
2.5	900
5	1716
5	1750
5	1715
10	3476
10	3534
10	3541
20	7238
20	7105
20	7121
40	14247
40	14166
40	14303

ANEXO 3
DATOS ESTADÍSTICOS

Muestra	Área	Concentración (ug/mL)	mg cafeína /100 g pulpa seca	Promedio	Desviación estándar
A1	3140	8.86	443.01	452.33	13.18
A2	3273	9.23	461.65		
B1	2419	6.84	341.96	340.93	22.16
B2	2250	6.37	318.27		
B3	2566	7.25	362.56		

SISA

T-test

Mean 1: 452.33

Mean 2: 340.93

N1: 2

N2: 3

Std Dev.1: 13.18

Std Dev.2: 22.16

t (0.025) for 95% CI= 4.9392

declare p larger than alpha=0.05 not significant.

mean1 eq: 452.33 (var1= 173.712) (se= 9.32)

mean2 eq: 340.93 (var2= 491.066) (se= 12.794)

Difference between means:

M1-M2=452.33-340.93=111.4

sd=25.697; se=15.829

95% CI of difference:

33.219 <111.4< 189.58 (Wald)

t-difference: 7.038

df-t: 2.1; p= 0.98721

(left p: 0.0128; two sided: 0.0256)

[T-test online. Compare two means, two proportions or counts online. \(quantitativeskills.com\)](http://www.quantitativeskills.com)

ANEXO 4

FOTOGRAFÍAS DEL PROCEDIMIENTO

Proceso de molienda



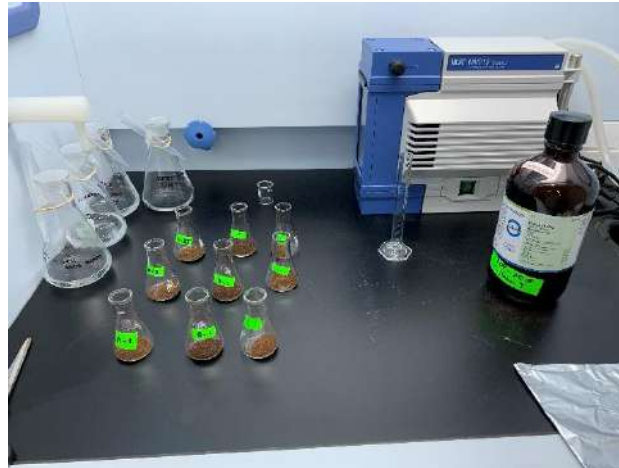
Proceso de tamizado

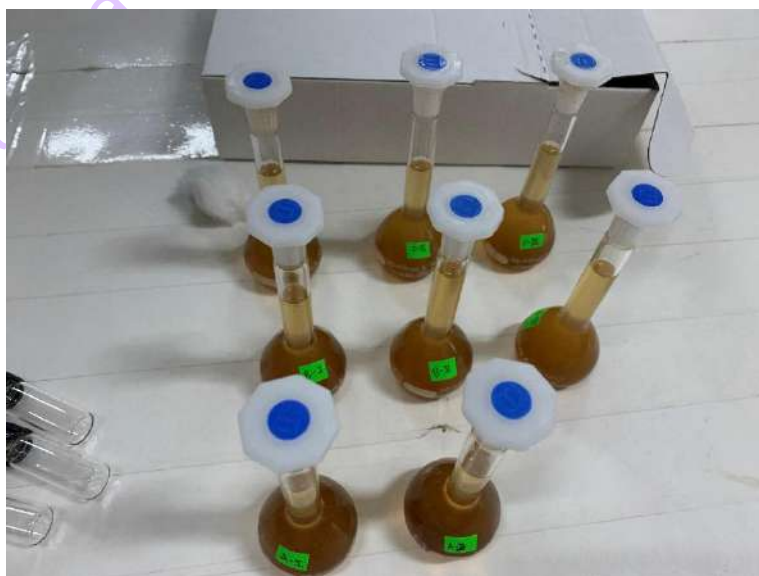


Pesado de la muestra



Extracción de cafeína

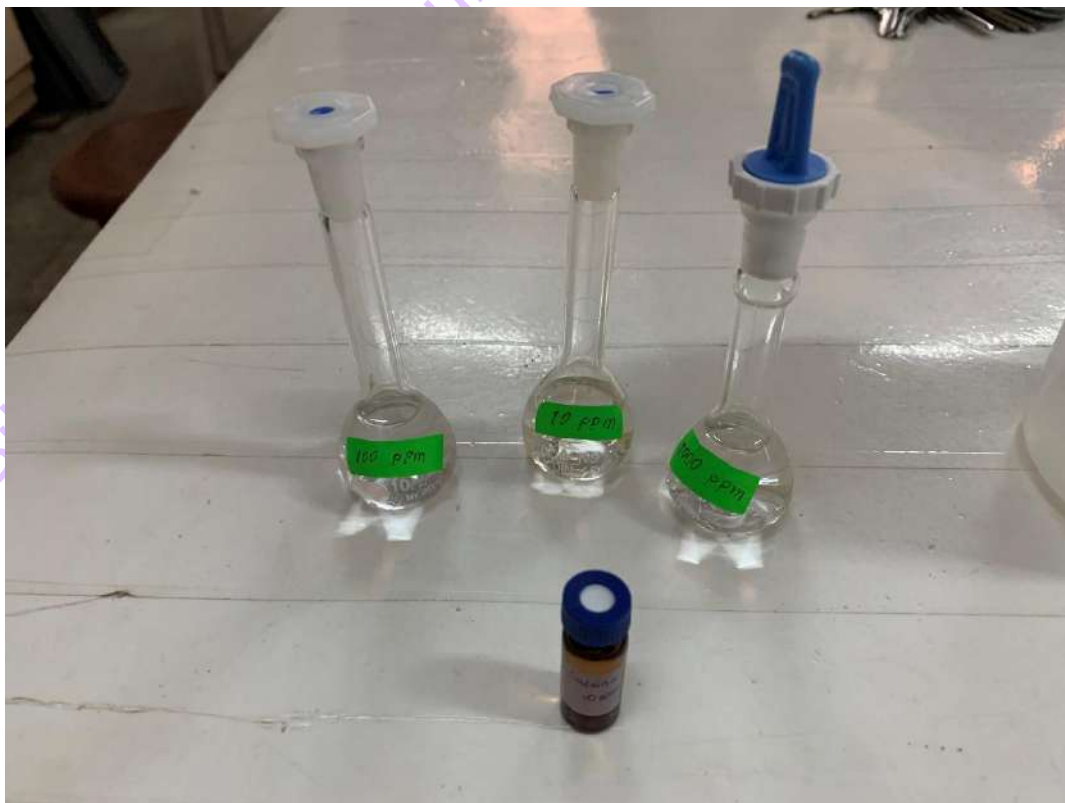


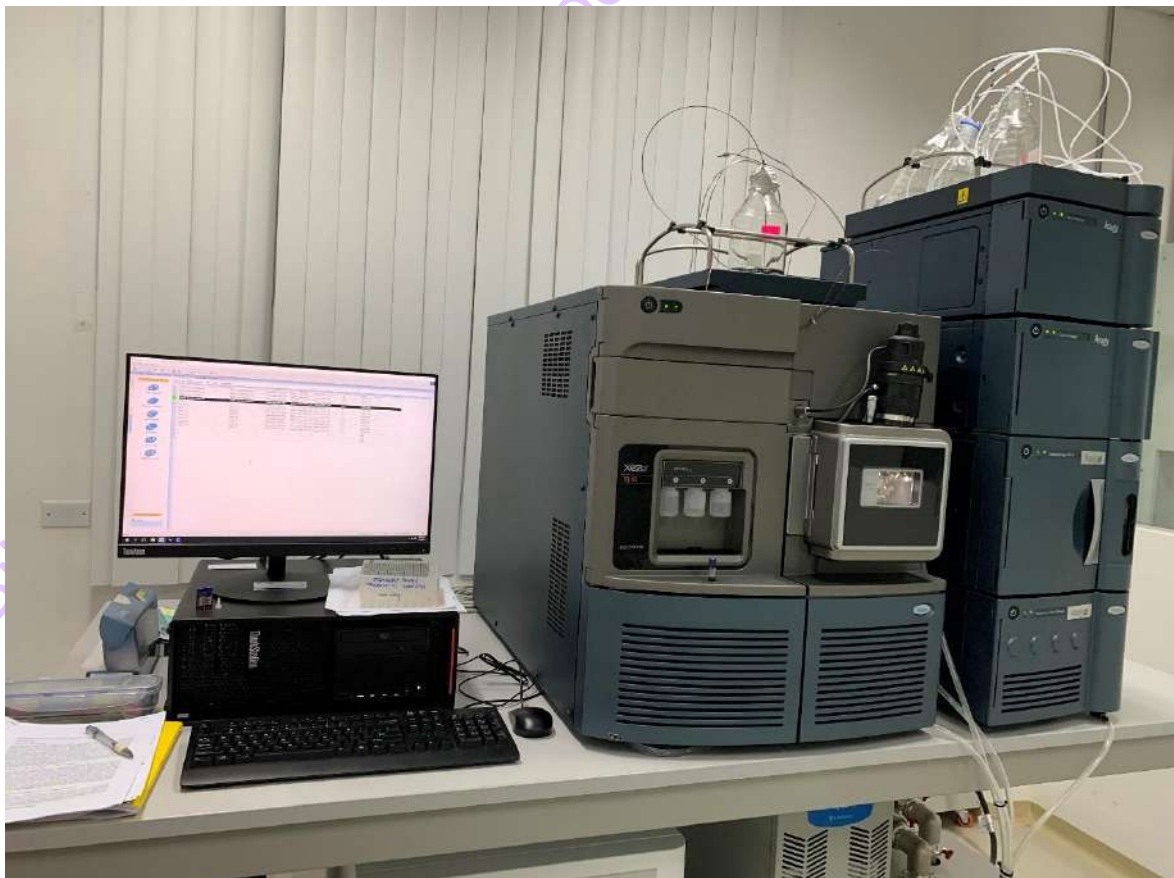


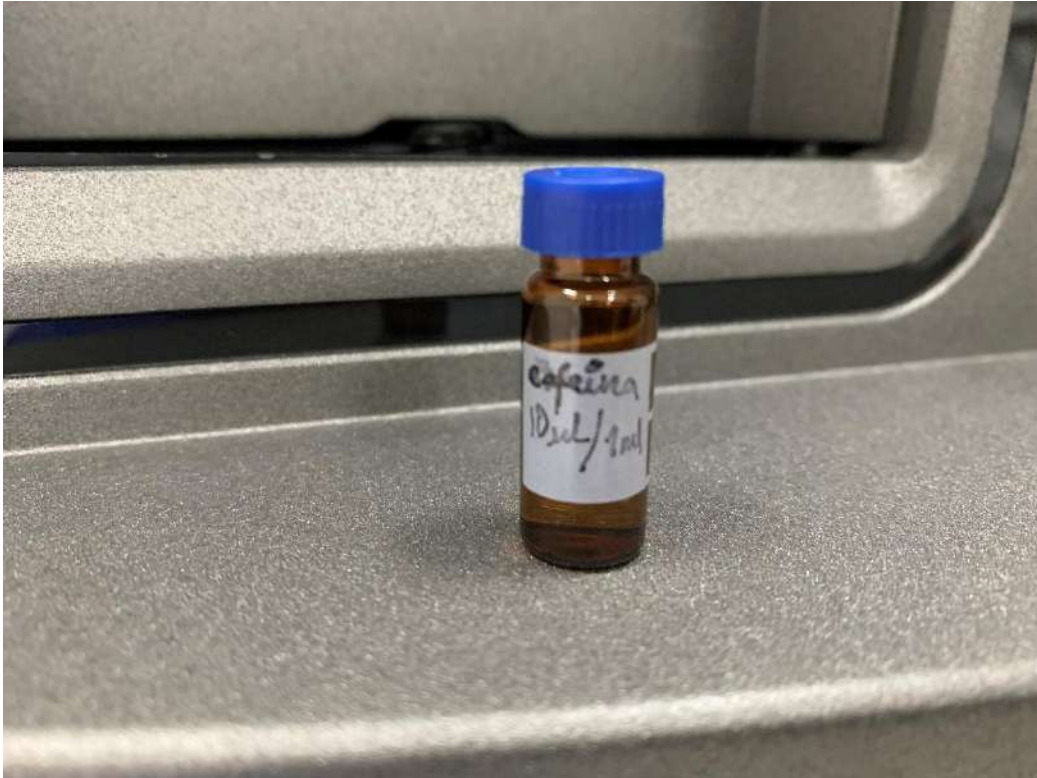
Determinación de los parámetros

Gradient							
Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve	
1	initial	0.300	97.0	3.0	0.0	0.0	initial
2	1.00	0.300	97.0	3.0	0.0	0.0	6
3	6.00	0.300	90.0	10.0	0.0	0.0	6
4	15.00	0.300	50.0	50.0	0.0	0.0	6
5	20.00	0.300	10.0	90.0	0.0	0.0	6
6	22.00	0.300	10.0	90.0	0.0	0.0	6
7	25.00	0.300	97.0	3.0	0.0	0.0	6
8	32.00	0.300	97.0	3.0	0.0	0.0	6
9							
10							
11							
12							
13							
14							

Cuantificación de cafeína







Curva de calibración





Biblioteca de la Facultad de I



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

UNT

RECTORADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

DECLARACIÓN JURADA

Los AUTORES suscritos en el presente documento **DECLARAMOS BAJO JURAMENTO** que somos los responsables legales de la calidad y originalidad del contenido del Proyecto de Investigación Científica, así como, del Informe de la Investigación Científica realizado.


TITULO: Propuesta de método para determinación del antinutriente cafeína en pulpa de café mediante UPLC

<u>PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA</u>		<u>INFORME FINAL DE INVESTIGACION CIENTIFICA</u>	
PROY DE TRABAJO DE INVESTIGACION (PREGRADO)	()	TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)	(X)
PROYECTO DE TESIS PREGRADO	()	TESIS PREGRADO	()
PROYECTO DE TESIS MAESTRIA	()	TESIS MAESTRIA	()
PROYECTO DE TESIS DOCTORADO	()	TESIS DOCTORADO	()

Equipo Investigador Integrado por:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	DEP. ACADÉMICO	CATEGORIA DOCENTE ASESOR	CÓDIGO Docente asesor Numero Matricula del estudiante	Autor Coautor asesor
1	Zelada Castillo Stephanie Lorena	Farmacia y Bioquímica			1011101314	Autor
2	Marín Tello Carmen Luisa	Farmacia y Bioquímica	Farmacología	Auxiliar TC	5716	Asesora

Trujillo, 13 de Julio de 2021....


.....
FIRMA

70558256
.....
DNI


.....
FIRMA

18221129
.....
DNI

.....
FIRMA

.....
DNI

.....
FIRMA

.....
DNI

! Este formato debe ser llenado, firmado, adjuntado al final del documento del PIC, del Informe de Tesis, Trabajo de Investigación respectivamente





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
UNT

RECTORADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL RENATI-SUNEDU

Trujillo, 13 de Julio de 2021

Los autores suscritos del INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA

Titulado: Propuesta de método para determinación del antinutriente cafeína en pulpa de café mediante UPLC

AUTORIZAMOS SU PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL, REPOSITORIO RENATI-SUNEDU, ALICIA-CONCYTEC, CON EL SIGUIENTE TIPO DE ACCESO:

- A. Acceso Abierto:
- B. Acceso Restringido (datos del autor y resumen del trabajo)
- C. No autorizo su Publicación

Si eligió la opción restringido o NO autoriza su publicación sírvase justificar _____

ESTUDIANTES DE PREGRADO: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TESIS
 ESTUDIANTES DE POSTGRADO: TESIS MAESTRIA TESIS DOCTORADO
 DOCENTES: INFORME DE INVESTIGACIÓN OTROS
 El equipo investigador Integrado por:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	CONDICIÓN (NOMBRADO, CONTRATADO, EMÉRITO, estudiante, OTROS)	CÓDIGO Docente Numero Matricula del estudiante	Autor Coautor asesor
1	Zelada Castillo Stephanie Lorena	Farmacia y Bioquímica	Estudiante	1011101314	Autor
2	Marín Tello Carmen Luisa	Farmacia y Bioquímica	Nombrada	5716	Asesora

S. Zelada
FIRMA

70558256
DNI

C. Marín Tello
FIRMA

18221129
DNI

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI

¹ Este formato debe ser llenado, firmado Y adjuntado en el informe de Tesis y/o Trabajo de Investigación respectivamente

¹ Este formato en el caso de Informe de investigación científica docente debe ser llenado, firmado, scaneado y adjuntado en el sistema de www.picfedu.unitrु.edu.pe

