

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
FLAVONOIDES Y METILXANTINAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIENCIA - APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE GRANO DE CACAO**

**GERMÁN MAURICIO AYALA JIMÉNEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS  
CICTA  
BUCARAMANGA  
2014**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
FLAVONOIDES Y METILXANTINAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIENCIA - APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE GRANO DE CACAO**

**GERMÁN MAURICIO AYALA JIMÉNEZ**

**Trabajo de grado para optar al título de  
Químico**

**DIRECTORA: JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL  
Química, Magíster en Química, Doctora en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS  
CICTA  
BUCARAMANGA  
2014**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	17
1.1. Polifenoles .....	18
1.2. Metilxantinas .....	22
1.3. Validación de métodos analíticos.....	24
1.4. Antecedentes .....	27
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	30
2.1. Validación del método .....	30
▪ Reactivos .....	30
▪ Equipo.....	30
2.1.1. Pruebas preliminares .....	31
2.1.2. Determinación de las figuras analíticas de mérito .....	32
▪ Especificidad.....	32
▪ Rango dinámico lineal y sensibilidad del método .....	32
▪ Precisión.....	33
▪ Recuperación.....	33
▪ Nivel mínimo de detección y Nivel mínimo de cuantificación.....	34
2.2. Estandarización del proceso de extracción de flavonoides y metilxantinas de grano de cacao. ....	36
2.3. Implementación del método .....	37
<b>3. RESULTADOS</b> .....	38
3.1. Validación del método .....	38
▪ Pruebas preliminares.....	38
▪ Determinación de las figuras analíticas de mérito .....	42
▪ Especificidad.....	42
▪ Rango dinámico lineal y sensibilidad del método .....	44
▪ Precisión.....	48
▪ Recuperación.....	54

▪ Nivel mínimo de detección y Nivel mínimo de cuantificación.....	54
3.2. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y METILXANTINAS .....	59
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	64
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	65
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>ANEXOS</b> .....	72

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles.....	19
<b>Figura 2.</b> Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides.....	20
<b>Figura 3.</b> Flavonoides de interés presentes en el cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ).....	21
<b>Figura 4.</b> Metilxantinas presentes en el cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ).....	22
<b>Figura 5.</b> Cromatograma de los analitos de interés aplicando la metodología reportada por Schinella <i>et al.</i> 2010. ....	39
<b>Figura 6.</b> Cromatograma que muestra la separación de los analitos .....	40
<b>Figura 7.</b> Separación de los patrones de referencia con el último método mencionado.....	41
<b>Figura 8.</b> Cromatograma del material CAU 39 sin fermentar ni secar.....	43
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración del patrón de teobromina con su ecuación promedio.....	44
<b>Figura 10.</b> Curva de calibración del patrón de cafeína con su ecuación promedio.....	45
<b>Figura 11.</b> Curva de calibración del patrón de epicatequina con su ecuación promedio.....	45
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración del patrón de procianidina B2 con su ecuación promedio.....	46
<b>Figura 13.</b> Curva de calibración del patrón de catequina con su ecuación promedio.....	46

<b>Figura 14.</b> Curva de calibración del patrón de procianidina B1 con su ecuación promedio.....	47
<b>Figura 15.</b> Cromatograma que muestra la cuantificación de los analitos por el detector de Arreglo de Diodos. ....	59
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración de la procianidina B2 obtenida nuevamente para rectificar la curva reportada. ....	62
<b>Figura 17.</b> Imagen capturada del software <i>ChemStation</i> , determinando la pureza del pico de la procianidina B2 en el genotipo FSV 25.....	62

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Gradiente aplicado para el desarrollo del método .....	40
<b>Tabla 2.</b> Resolución de los picos del extracto del genotipo CAU 39.....	43
<b>Tabla 3.</b> Evaluación del rango dinámico lineal y la sensibilidad del método por estándar externo.....	48
<b>Tabla 4.</b> Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la teobromina.....	49
<b>Tabla 5.</b> Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la cafeína .....	50
<b>Tabla 6.</b> Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la procianidina B1 .....	51
<b>Tabla 7.</b> Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la catequina .....	51
<b>Tabla 8.</b> Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la procianidina B2.....	52
<b>Tabla 9.</b> Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la epicatequina. ....	52
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la eficiencia del método.....	55
<b>Tabla 11.</b> Datos y Cálculos realizados con la procianidina B1. ....	56
<b>Tabla 12.</b> Datos y Cálculos realizados con la catequina. ....	56
<b>Tabla 13.</b> Datos y Cálculos realizados con la procianidina B2. ....	56
<b>Tabla 14.</b> Datos y Cálculos realizados con la epicatequina.....	57
<b>Tabla 15.</b> Datos y Cálculos realizados con la teobromina. ....	57
<b>Tabla 16.</b> Datos y Cálculos realizados con la cafeína. ....	57

<b>Tabla 17.</b> LOD Y LOQ todos los analitos por el método para cada analito. Se calcularon usando el método de RMSE.....	58
<b>Tabla 18.</b> Contenido de polifenoles totales, flavonoides principales y actividad antioxidante .....	60
<b>Tabla 19.</b> Contenido de metilxantinas, teobromina, cafeína en materiales de cacao .....	61
<b>Tabla 20.</b> Datos obtenidos de la curva de calibración de la procianidina B2 por detector UV-DAD .....	61

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO A . ENSAYOS REALIZADOS PARA COMPROBAR LA PUREZA DE LA PROCIANIDINA B2 .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO B. COMPARACIÓN DE LA FRACCIÓN CON EL PATRÓN DE LA B2....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO C. ESPECTROS INFRARROJOS DE LA FRACCIÓN OBTENIDA DE LA PROCIANIDINA B2, EN COMPARACIÓN CON EL PATRÓN DE REFERENCIA.....</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

**TÍTULO:** VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES Y METILXANTINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - APLICACIÓN EN EL ANALISIS DE GRANO DE CACAO\*

**AUTOR:** Ayala Jiménez, Germán Mauricio\*\*

**PALABRAS CLAVE:** HPLC, Flavonoides, Metilxantinas, Cacao, Polifenoles

### DESCRIPCIÓN

Se validó un método para la determinación de flavonoides y metilxantinas, para lograr analizar los diferentes genotipos de cacao incorporados en el país. En este trabajo se analizó el contenido de los flavonoides catequina, epicatequina, procianidina B1 y procianidina B2, además de las metilxantinas teobromina y cafeína.

Para determinar la concentración de los polifenoles y las metilxantinas, fue necesario estandarizar un método de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que permitiera la determinación simultánea de los seis analitos de interés, cumpliendo en todos los casos con lo establecido por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Es importante resaltar que la temperatura fue uno de los mayores inconvenientes en este método, además de la radiación UV proveniente de lámparas y de la luz solar y la presencia de oxígeno. Debido a esto, se almacenaron las muestras en frascos ámbar, en atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de -20°C.

Se determinó que durante el proceso de fermentación del grano, éste pierde sus propiedades antioxidantes, es decir, disminuye la concentración de los flavonoides, con respecto al grano verde, siendo de gran utilidad esta información para mejorar este proceso.

Los análisis fueron efectuados tanto para genotipos de cacao verde, como de cacao fermentado y seco. De esta forma se contribuyó al desarrollo de las fichas técnicas de los materiales promisorios que fueron estudiados por la UIS y Fedecacao.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Janeth Aidé Perea Villamil

## ABSTRACT

**TITLE:** VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINING FLAVONOIDS AND METHYLYXANTHINES LIQUID CHROMATOGRAPHY AND HIGH EFFICIENCY - APPLICATION IN ANALYSIS OF COCOA BEANS \*

**AUTHOR:** Ayala Jiménez, Germán Mauricio \*\*

**KEY WORDS:** HPLC, Flavonoids, methylxanthines, Cocoa beans, Polyphenols

### DESCRIPTION

A method for the determination of flavonoids and methylxanthines was developed for different cocoa genotypes incorporated in the country. In this work, the content of flavonoids catechin, epicatechin, procyanidin B1 and procyanidin B2, also the methylxanthines caffeine and theobromine was analyzed.

To determine the concentration of polyphenols and methylxanthines, it was necessary to standardize a method of analysis by high performance liquid chromatography (HPLC), which allow the simultaneous determination of six analytes of interest, provided in all cases as provided by Good Laboratory Practice (GLP).

Importantly, the temperature was one of the major drawbacks in this method, in addition to the UV radiation from lamp and sunlight, and the presence of oxygen. Due to this, the samples were stored in amber vials under a nitrogen atmosphere and at a temperature of -20 ° C.

It was determined that during the fermentation process of the beans it loses its antioxidant properties, ie, decreases the concentration of flavonoids with respect to the green bean, is of great use this information to improve this process.

Analyses were performed for both green cacao genotypes as fermented and dried cacao. This has contributed to the development of techniques promising materials were studied by the UIS and FEDECACAO.

---

\* Degree project

\*\*Facultad de Ciencias. Aidé Perea Villamil

## INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción anual de cacao en grano se obtiene de la explotación de alrededor de 90.000 hectáreas sembradas en 24.500 fincas con un rendimiento promedio por hectárea cosechada de 450 kilogramos de cacao en grano. Las causas del bajo rendimiento obtenido por hectárea se relacionan con cuatro aspectos que afectan el cultivo: la avanzada edad de las plantaciones sembradas; el tipo de material de propagación utilizado (cacaos híbridos y comunes con bajos niveles de tolerancia a plagas y enfermedades y clones poco productivos); la baja densidad de árboles en producción por hectárea y las dificultades para que el agricultor pueda poner en práctica las recomendaciones de manejo integral del cultivo (Mojica Pimiento y Paredes Vega, 2006).

Actualmente, Colombia aporta solo el 5% del cacao fino de sabor y aroma comercializado en el mundo según la Organización Internacional del Cacao, ICCO, debido a que tiene sembrados materiales de una amplia variedad genética que afectan la calidad del grano. Sin embargo, el país cuenta con una potencialidad de 2 millones de hectáreas aptas para el desarrollo de este cultivo, lo que lo ubicaría como uno de los principales cultivadores de cacao en el mundo (Proexport Colombia, 2012).

En el año 2010 el Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, y el Ministerio de Comercio Exterior (2010) escogieron este cultivo como uno de los sectores con mayor atractivo para la inversión, teniendo en cuenta que el cacao es una materia prima de gran importancia para la industria de chocolatería y confitería, cosméticos,

productos farmacéuticos y de compuestos bioactivos como los flavonoides. Sin embargo, la amplia diversidad genética que tiene el país afecta la producción de un grano de características homogéneas y por tanto su competitividad.

Ante esta situación las entidades responsables de la promoción del cultivo en el país se propusieron caracterizar los materiales que se consideran promisorios, en cuanto a sus propiedades morfo-agronómicas, físicas, químicas, funcionales y organolépticas. Dentro de las propiedades funcionales se considera hoy de gran valor su papel como antioxidantes, propiedad determinada entre otros compuestos por la presencia de polifenoles especialmente de tipo flavonoides. Otros compuestos de interés en el grano de cacao son las metilxantinas: teobromina y cafeína que además tienen alta incidencia en el perfil sensorial del grano.

Los flavonoides y las metilxantinas se identifican y cuantifican principalmente por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), generalmente usando métodos separados para cada grupo de compuestos (Brunetto *et al*, 2007); pero en el 2009 Belscak *et al*, y Schinella *et al.*, en el 2010 reportaron un método para su determinación de forma simultánea disminuyendo de esta manera costos. Con base en estos trabajos y el de otros autores, y ante la necesidad de determinar estos compuestos en los granos de cacao colombiano, en el presente trabajo se propuso validar un método para el análisis de los compuestos mencionados.

Este trabajo hace parte del macroproyecto “CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA ORGANOLÉPTICA Y FUNCIONAL DE LOS MATERIALES DE CACAO INTRODUCIDOS Y MATERIALES REGIONALES DE CACAO PROMISORIOS MÁS COMERCIALIZADOS EN EL PAÍS” que tuvo como objetivo desarrollar la capacidad del sector cacaotero para diferenciar de manera objetiva los materiales de cacao comercializados en el país y los regionales considerados promisorios por

Fedecacao, mediante la determinación de sus características físicas, químicas, sensoriales, contenido de elementos funcionales y la conformación de un panel de catadores especializado. Dentro de esta caracterización se propuso la evaluación de los flavonoides (catequina, epicatequina, Procianidina B1 y Procianidina B2) y las metilxantinas (cafeína y teobromina) contenidas en 21 materiales de cacao.

## 1. MARCO TEÓRICO

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta tropical originariamente de México, cuyo fruto es una baya elíptica de color amarillo, rojo, morado o café. De las semillas extraídas del fruto, una vez fermentadas, tostadas y molidas, se obtienen mediante procesos industriales, los ingredientes fundamentales para los diferentes preparados de chocolate (Pinzón, J. Rojas, J., 2009).

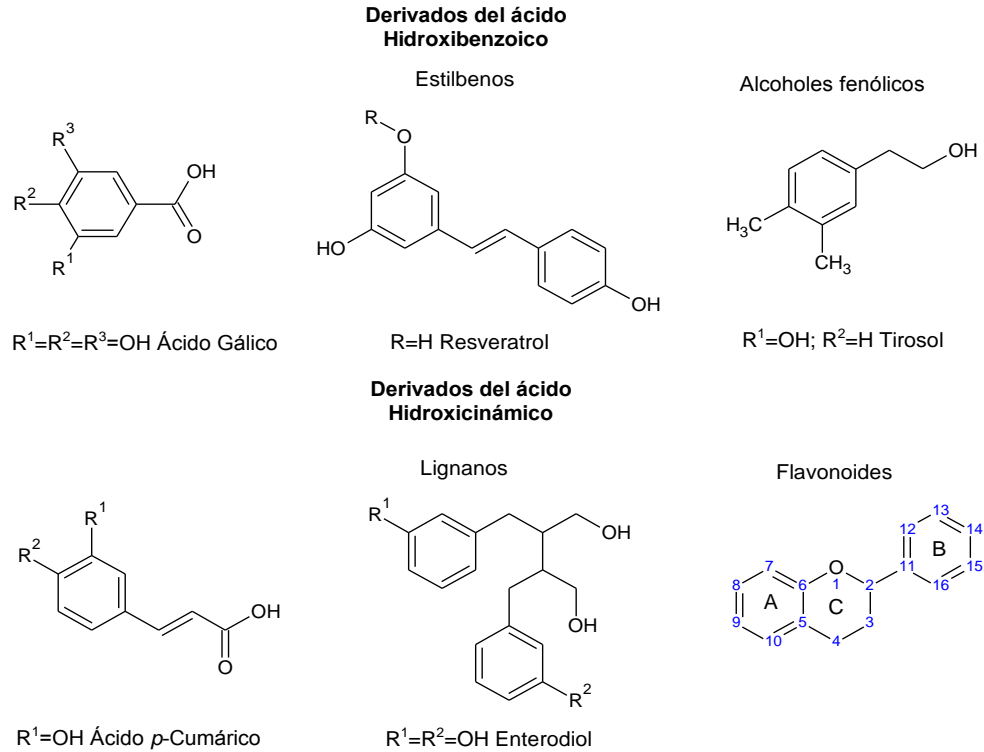
Las variaciones más comunes de cacao son: el criollo, que se cultiva desde México hasta Brasil y en Indonesia, Papua Nueva Guinea y Sri Lanka; el forastero, de cuyas variedades se produce el cacao básico para generar híbridos de mayor productividad y calidad, que se cultivan en las costas del golfo de Guinea en África Occidental y en América Central y Suramérica; y el trinitario, cruce entre criollo y forastero que se cultiva en las Antillas (Corporación Colombia Internacional, 2002).

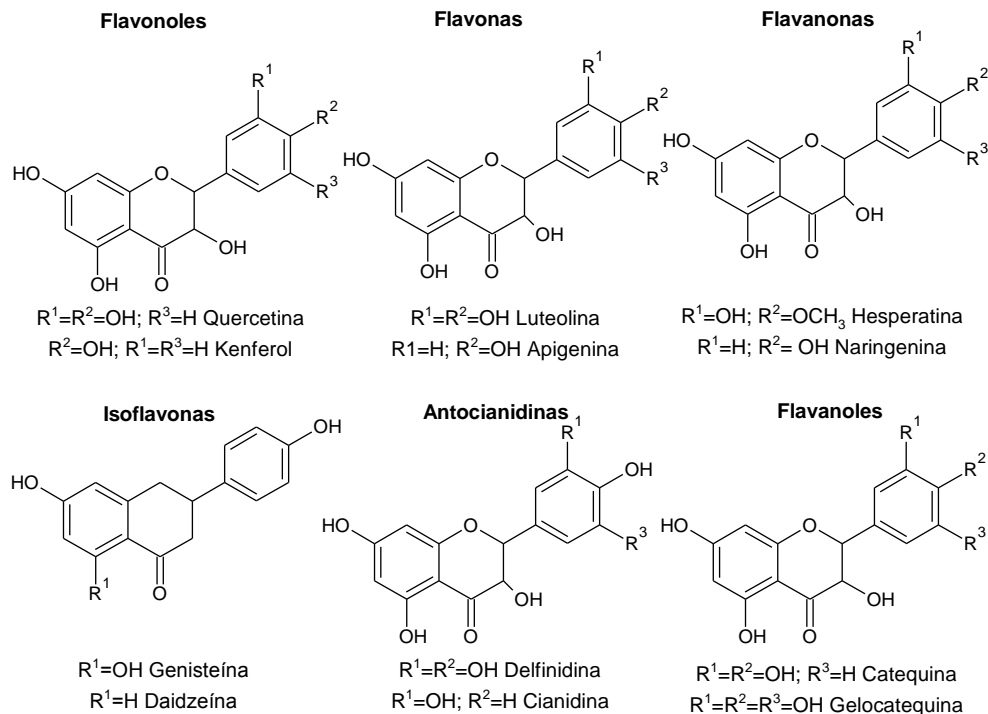
El cacao en grano está compuesto principalmente de grasa, que constituye alrededor de un 50%. El siguiente ingrediente más importante es la proteína, seguida del almidón y los azúcares que aportan del 20 a 25% del peso del grano, mientras que la ceniza asciende a un 4%. Los polifenoles del cacao constituyen en promedio del 12-18% del peso del grano, siendo la catequina y la epicatequina, los flavonoides más abundantes (Meng *et al*, 2009). Otros elementos nitrogenados, como la teobromina y la cafeína, existen en pequeñas cantidades. En cualquier caso, la composición del grano depende de la variedad del cacao y de las condiciones bajo las cuales se realiza el proceso de beneficio (De Muijnck, 2005).

## 1.1. Polifenoles

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. En la naturaleza existe una amplia variedad de polifenoles que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Duarte *et al*, 2011). Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al*, 2012). En la **figura 1**, se relacionan las estructuras de los grupos más importantes. Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más abundante que incluye a más de 5.000 compuestos bien identificados. Todos poseen una estructura de anillos consistentes en 2 centros aromáticos (anillos A y B) y un heterociclo oxigenado central (anillo C).

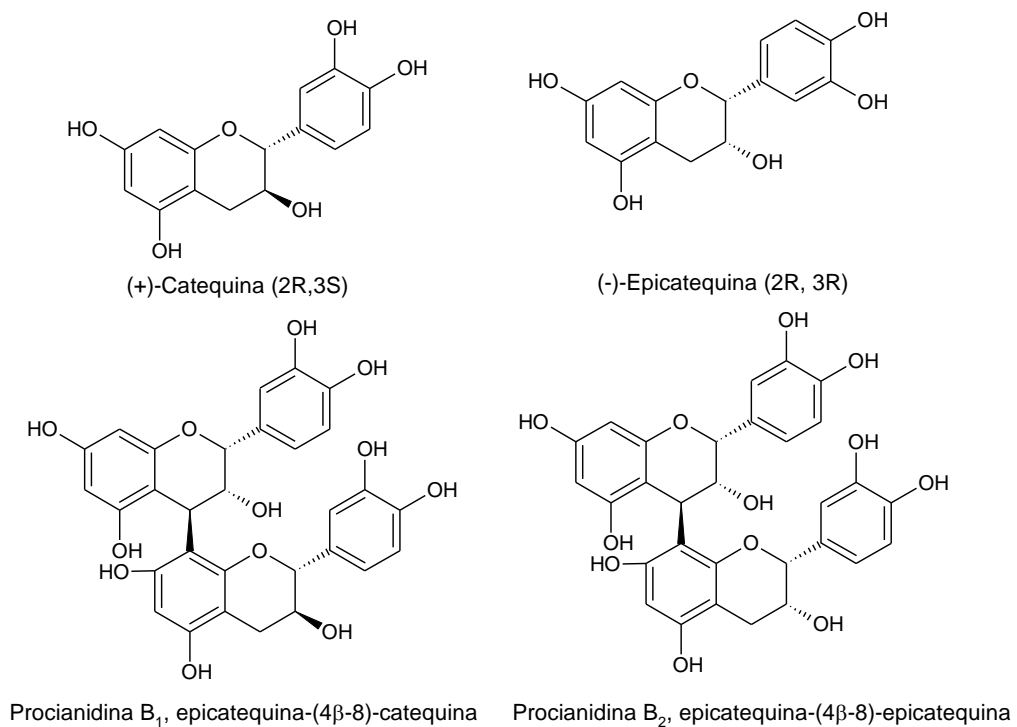




**Figura 2.** Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Se señalan ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo. Fuente: Quiñonez, M., Miguel, M., Aleixandre, A. 2012.

De estos subgrupos, se resaltan los flavonoles. A diferencia de otros grupos de flavonoides, sus combinaciones de tipo heterosídico (entre el grupo reductor del azúcar y un grupo tiol) son poco habituales. Los flavanoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). La epicatequina y catequina son los principales compuestos de este grupo. Recientes estudios han comprobado que dichos compuestos contribuyen a optimizar las funciones cardiovasculares, ya que poseen propiedades antioxidantes (De Muijnck, 2005).

El contenido cualitativo y cuantitativo de polifenoles es diferente en cada especie vegetal. Entre las plantas con alto contenido en polifenoles se encuentran el cacao (*Theobroma cacao*), la uva (*Vitis vinifera*), el té (*Camelia sinensis*), la manzana (*Malus domestica*) y diversas bayas. El vino es rico en catequinas y procianidinas, y en el té los flavanoles se encuentran fundamentalmente como derivados de galatos. En el cacao los flavanoles, están principalmente en forma de epicatequinas, catequinas y procianidinas (**figura 3**).



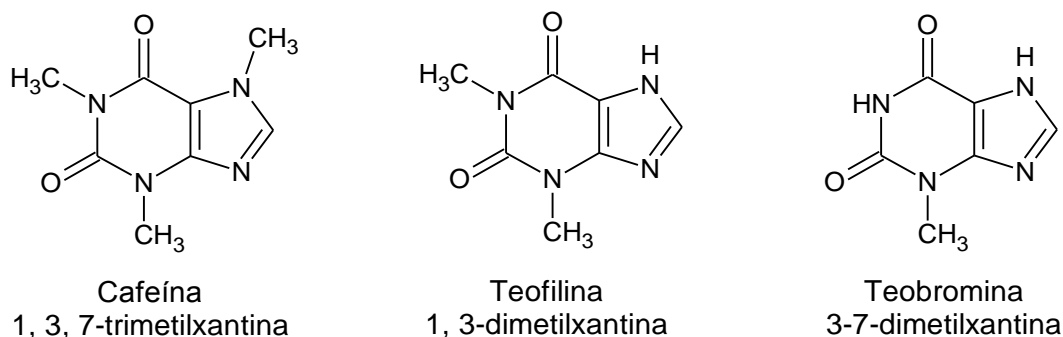
**Figura 3.** Flavonoides de interés presentes en el cacao (*Theobroma cacao*). Fuente: Quiñonez, M., Miguel, M., Alexandre, A. 2012.

Recientemente, se ha demostrado que el cacao y sus derivados son unos de los alimentos más ricos en polifenoles junto con el té y el vino (Quiñones *et al.*, 2012). El chocolate negro por ejemplo, presenta el mayor contenido de polifenoles y es rico en (-)-epicatequina (EC), (+)-catequina, quercetina (incluyendo su glucósido), clovamida, deoxiclovamida, trans-resveratrol, su glucósido y sus respectivas procianidinas B1 y B2 (Maleyki, 2008).

El estudio del cacao y sus derivados suscita gran interés entre los científicos, pues, por su elevado poder antioxidante, hoy día puede considerarse un buen candidato para su uso como alimento funcional en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y patologías asociadas al estrés oxidativo. Adamson *et al.* (2001), encontraron una correlación positiva entre el contenido de polifenoles y sus propiedades antioxidantes, medida por la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

## 1.2. Metilxantinas

Las metilxantinas son un subgrupo de alcaloides purínicos, entre los cuales se destacan la cafeína, la teobromina y la teofilina (**figura 4**). Estructuralmente son xantinas metiladas. La teobromina (3-7-dimetilxantina) es el alcaloide predominante en el cacao. La cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) es el principal alcaloide encontrado en el café y el té, en el cacao, se encuentra en una proporción ocho veces menor que la teobromina (National Nutrient Database for Standard Reference). La teofilina (1, 3-dimetilxantina) es detectada en el cacao y en productos del chocolate, a nivel de trazas. Estos alcaloides son conocidos por sus propiedades estimulantes del sistema nervioso central.



**Figura 4.** Metilxantinas presentes en el cacao (*Theobroma cacao*). Fuente: Maleyki, A. 2008.

Los estudios actuales muestran que las metilxantinas presentes en el cacao y sus productos derivados proporcionan efectos psicoestimulantes, y que estos efectos son mayores en magnitud que los de cualquier otra actividad potencial farmacológica de sus constituyentes (Hendrik *et al.*, 2004). Sin embargo, el consumo de altas concentraciones de estos compuestos causa arritmia cardiaca, excitación, náuseas y acidez gástrica.

Adicionalmente, las metilxantinas muestran una extraordinaria capacidad como agentes terapéuticos y han sido utilizados en muchos fármacos como analgésico, tienen además efectos diuréticos y broncodilatadores (Brunneto *et al.*, 2007) por lo que se usan ampliamente para tratar la enfermedad obstructiva crónica (EPOC), entre otras. Existe controversia en cuanto al mecanismo de acción, efectos no broncodilatadores y toxicidad de estos compuestos (Arellano y García, 2006).

La teobromina, la metilxantina más importante presente en el cacao (Naik, (2001), constituye aproximadamente el 4% de un producto libre de grasa, mientras que el contenido de cafeína es de aproximadamente 0,2% (de Aragao *et al.*, 2005). La teobromina es el alcaloide principal del pericarpio joven y está presente casi exclusivamente en los cotiledones de los granos. La cafeína y la 3-metilxantina son los principales alcaloides en el pericarpio maduro.

La mayoría de los estudios realizados con cacao, atribuyen los beneficios de los productos de cacao a los polifenoles, aún cuando este también contiene metilxantinas. Las posibles interacciones sinérgicas entre los flavonoides y metilxantinas son poco claras y requieren mayor estudio para evaluar su efecto en la salud (Cooper *et al.*, 2008).

### 1.3. Validación de métodos analíticos

Una validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista (Norma técnica colombiana NTC-ISO/IEC 17025, 2005).

Cuando se pretende adaptar un método analítico desarrollado por un tercero, éste debe ser normalizado por el laboratorio que lo va a aplicar, es decir, se debe validar con el fin que sea aceptado por el sector técnico correspondiente. Cada validación de un procedimiento consiste en forma general de tres pasos secuenciales:

- a. Establecimiento de las condiciones del método y/o la técnica a validar
- b. Determinación de las cifras o figuras de mérito mediante parámetros estadísticos del procedimiento
- c. Valoración de los resultados de las cifras de mérito por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos frente a la validez del procedimiento para el propósito establecido.

Las figuras de mérito (Nava y López, 2008), se definen como:

**Especificidad:** Es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.

**Exactitud relativa:** Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido.

**Nivel mínimo de cuantificación:** Es aquel valor de concentración mínimo que puede obtenerse con una imprecisión aceptable.

**Nivel mínimo de detección:** Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

**Rango dinámico lineal:** La capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen. El término Rango dinámico lineal aplicado a un método analítico, se refiere al rango de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este rango (concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable.

**Precisión:** Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas.

**Recuperación:** La recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores (importante especialmente en el caso de procedimientos cromatográficos).

**Robustez:** Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.

**Selectividad:** La habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de prueba.

- **Selectividad Cualitativa.-** Término que indica hasta qué punto otras sustancias interfieren en la determinación de una sustancia de acuerdo a un procedimiento dado.
- **Selectividad Cuantitativa.-** Un término usado en conjunción con otros sustantivos (por ejemplo constante, coeficiente, índice, factor, número) para la caracterización cuantitativa de interferencias.

**Sensibilidad Analítica (o metrológica):** Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito, es decir, la pendiente de la función de calibración y no es sinónimo de Nivel mínimo de detección. Cuando la función de calibración es una recta, la sensibilidad analítica es constante en todo el intervalo de medida. Por el contrario, con funciones de calibración diferentes de la recta, la sensibilidad varía en función de la concentración del analito. El valor absoluto de sensibilidad analítica tiene utilidad para comparar entre sí diferentes procedimientos de medida o métodos basados en la medición de una misma señal física. Cuando se trata de funciones de calibración que no corresponden a una recta, la sensibilidad debe especificarse para una concentración determinada de analito o en forma de función de la concentración de analito.

**Incertidumbre:** es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente, ser atribuidos al mensurando. Un laboratorio de calibración, o un laboratorio de ensayo que realiza sus propias calibraciones, deben tener y debe aplicar un procedimiento para estimar la incertidumbre de la medición basada en la Norma JCGM 100: 2008 (GUM 1995 con ligeras correcciones).

#### 1.4. Antecedentes

El análisis de compuestos fenólicos es muy desafiante debido a la gran variedad y reactividad de sus componentes (Hyötyläined, Kivilompolo; 2010). Se pueden analizar usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), acoplada a espectrometría de masas (MS), UV/VIS con arreglo de diodos o por resonancia magnética nuclear (RMN).

En la última década, HPLC ha sido la técnica más usada para la separación y caracterización de compuestos fenólicos (Hyötyläined, Kivilompolo; 2010; Stefova *et al.*, 2010). Ésta técnica ofrece la posibilidad de separar todos los componentes analizados de manera simultánea, junto con sus posibles derivados o productos de degradación.

Para el análisis de polifenoles en cacao, en un principio se desarrolló un método sensible para la detección de (-)-epicatequina por espectrofotometría a 280nm y cuantificación mediante el uso de estándares externos (Kim, Keeney; 1994). Posteriormente se usó HPLC para el análisis de polifenoles en diferentes matrices, entre estas el cacao. Hoy en día HPLC es la técnica por excelencia que se aplica para la determinación de flavonoides y metilxantinas (Stefova *et al.*, 2010).

Los primeros reportes del análisis de polifenoles en cacao por HPLC se caracterizaron por usar columnas en fase normal y fases móviles de diclorometano, metanol y ácido acético/agua 1:1, y un detector de arreglo de diodos (Adamson *et al.*, 1999) o un detector API-ES/MS (Hammerson *et al.*, 1999). Natsume *et al.* (2000) reportaron experimentos similares usando una columna en fase directa, usando como fases móviles: (A) diclorometano-metanol-formaldehido agua 5:43:1:1 y (B) diclorometano-metanol-formaldehido agua 5:43:1:1 41:7:1:1, y un detector de arreglo de diodos; mientras que Counet *et al.* (2004) analizaron polifenoles en el cacao usando una columna fase normal, con fases móviles de diclorometano y metanol, y un detector UV.

Sin embargo, las condiciones cromatográficas más comunes usadas en el análisis de flavonoides actualmente, al igual que en las metilxantinas se relacionan con el uso de columnas casi exclusivamente de fase reversa, con una longitud entre 100 a 300 mm y con un diámetro interno de 4.6µm (Naik, 2001, Nazaruddin *et al* 2006). Los sistemas de elución son usualmente binarios, con agua (solvente A) acidulada con ácido acético, ácido perclórico, ácido fosfórico o ácido fórmico, usualmente entre un 0,1-5%, aunque otros recomiendan no sobrepasar el 1% de concentración, además de un solvente orgánico poco polar como metanol o acetonitrilo (Calderón *et al.* 2009, Cienfuegos *et al.* 2009, Ramos *et al.* 2008,).

Los flujos reportados se encuentran entre 0,6-1mL/min, la temperatura de la columna se encuentra entre 22-35°C, y el volumen de inyección entre 10 y 100µL. Los flavonoides absorben en el UV al igual que las metilxantinas, y se cuantifican usualmente con UV-DAD, a 275nm las metilxantinas y 280nm los flavonoides. Se ha reportado además el uso de detector de fluorescencia para flavonoides.

Shumow and Bodor (2011) desarrollaron un método para la cuantificación de los monómeros de (±)-catequina y (±)-epicatequina, contenidas en cacao y productos de chocolate, demostrando que la sensibilidad de los flavonoides al detector, es mayor y se puede efectuar una mejor cuantificación de los analitos en muestras reales, donde las concentraciones en extractos fermentados de cacao son pequeñas pero cuantificables. Cabe resaltar que los flavonoides son susceptibles al calor, a la luz y a la presencia de oxígeno. En caso de ser almacenado, el extracto, debe ser a una temperatura de -18°C en un frasco ámbar sellado y en atmósfera de nitrógeno (Belscak *et al.*, 2009).

La identificación de epicatequina, catequina y procianidinas, entre las cuales se encuentran dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros, además de teobromina y cafeína fueron reportadas por Wollgast (2006) usando una columna de fase reversa

C-18, fases móviles de ácido acético en agua al 0,5% (A) y acetonitrilo-agua-ácido acético concentrado 4:9:1 (B) usando un LC-ESI-MS/MS.

Estudios realizados por Cienfuegos-Jovellanos *et al.*, (2009) e Schinella *et al.*, (2010) muestran la determinación simultánea con buena separación de los compuestos epicatequina, catequina, procianidinas B1 y B2, teobromina y cafeína presentes en cacao, usando una columna Xorbax Eclipse C-18, fases móviles Agua-Acido fórmico (99.9:0.1; v: v) (solvente A) y acetonitrilo (solvente B) por HPLC con detector con arreglo de diodos.

En este trabajo basados en los reportes de Wollgast (2006), Cienfuegos-Jovellanos *et al.*, (2009) e Schinella *et al.*, (2010), se propone la validación de un método para la cuantificación por HPLC, de los flavonoides Catequina, Epicatequina, Procianidina B1 y Procianidina B2 y de las metilxantinas Cafeína y Teobromina e implementarlo para su determinación en el grano de cacao.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Validación del método

#### ▪ Reactivos

**Patrones:** Cafeína, teobromina, catequina, epicatequina, Procianidina B1 y Procianidina B2, de la empresa Sigma-Aldrich, para HPLC.

**Solventes:** Agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico todos grado HPLC, Hexano y Etanol grado analítico todos de marca Merck y Carlo Erba.

Soluciones preparadas:

- **Soluciones stock:** se prepararon soluciones stock de 1000 ppm de catequina, epicatequina, Procianidina B1, Procianidina B2, 400 ppm de teobromina y 1000 ppm cafeína, disueltas en agua tipo 1.
- **Soluciones de trabajo.** Soluciones de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64ppm para cada uno de los polifenoles.  
Soluciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 y 250 ppm para la teobromina y la cafeína.

#### ▪ Equipo

Se empleó un sistema HPLC Agilent 1100 Series controlado por el software *ChemStation*, equipado con una columna en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB de medidas 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5 µm, a una temperatura de 35°C. La teobromina y cafeína fueron cuantificadas a 275nm con un detector UV-DAD, la Procianidina B2 y la epicatequina a 280nm usando UV-DAD, y la Procianidina B1 y la catequina fueron cuantificados por un detector de fluorescencia, usando un  $\lambda$  de 278nm para excitación y un  $\lambda$  de 315nm para emisión.

## ▪ Método

Para la determinación simultánea de flavonoides y metilxantinas se tomaron como referencia los métodos descritos por Schinella *et al.* (2010), Cienfuegos-Jovellanos *et al.* (2009) y Tomas-Barberan *et al.* (2007), utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector ultravioleta con arreglo de diodos (UV-DAD). En la determinación de la (±)-catequina y de las procianidina B1, se usó HPLC con detector de fluorescencia (Shumow and Bodor, 2011).

### 2.1.1. Pruebas preliminares

Previamente se realizaron ensayos bajo las condiciones descritas por Schinella *et al.* (2010) y Tomas-Barberan *et al.* (2007), para evaluar la separación de los compuestos. El método fue evaluado en cuanto a la velocidad de elución y el gradiente de elución para lograr la separación de los compuestos, así:

- Selección de la velocidad de elución de la fase móvil: se evaluó la elución a 0.6 ml/min y 1 ml/min.
- Selección del gradiente y la fase móvil: La fase móvil consiste en agua/ácido fórmico (95:5 v/v) (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B) aplicado a un flujo de 0.6mL/min. El gradiente es el siguiente: 0-20 min, 6-10% B; 20-25 min, 10-13% B; 25-30 min, 13-15% B; 30-40 min, 15-10% B; 40-45 min, 10-6% B, seguido de 10 min de re-equilibrio de la columna antes de una nueva inyección (Cienfuegos-Jovellanos *et al.* , 2009).
- Se pueden presentar impurezas en el cromatograma, debido a que las fases móviles debieron ser filtradas con un equipo de filtración con membrana, usando un ancho de poro de 2µm.
- Además se tomaron las precauciones necesarias para conservar los patrones adecuadamente, como una mejor refrigeración, y protección de los mismos contra la radiación solar, ya que los antioxidantes son propensos a la degradación bajo la influencia de rayos UV.

### 2.1.2. Determinación de las figuras analíticas de mérito

Las *figuras de mérito* que se analizaron fueron:

- Especificidad
- Rango dinámico lineal y Sensibilidad
- Precisión (Expresada como repetibilidad)
- Exactitud (Expresada como porcentaje de recuperación)
- Nivel mínimo de detección
- Nivel mínimo de cuantificación

#### ▪ Especificidad

Para determinar específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes que estén en la muestra, se midió la eficiencia del sistema cromatográfico, la separación (resolución) y el factor *tailing* (coleo) a partir de los platos teóricos.

#### ▪ Rango dinámico lineal y sensibilidad del método

El rango dinámico lineal y la sensibilidad del método se evaluaron mediante las curvas de calibración realizadas con un mínimo recomendado de 5 concentraciones. El rango dinámico lineal del método se reportó como el cuadrado del coeficiente de correlación. El coeficiente de correlación es el cociente entre la covarianza y el producto de las desviaciones típicas de ambas variables.

$$r^2 = \left( \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y} \right)^2$$

La sensibilidad se expresa como el coeficiente angular o la pendiente de la curva de calibración a un límite de confianza determinado, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$b \pm t * S_b$$

Dónde:

$t$ : 2.36 ( $t$  de Student para un nivel de confianza de 95%)

$S_b$ : Desviación estándar de la pendiente de la línea de regresión (representa la precisión en la curva de calibración).

#### ▪ Precisión

Se determinaron los tiempos de retención ( $t_R$ ) y las áreas ( $A$ ) mediante la inyección de los analitos por triplicado, para determinar el promedio de cada medida anteriormente dicha, la desviación estándar de la medida ( $S_m$ ), y por consiguiente la repetibilidad ( $r$ ).

La repetibilidad, medida como CV, se calculó con base en la siguiente relación (Rojas J, 2006):

$$r = \frac{S_m}{P_m} * 100$$

Dónde:

$r$ : repetibilidad, %

$S_m$ : Desviación estándar de la medida (tiempo de retención o área).

$P_m$ : Promedio de la medida.

#### ▪ Recuperación

La recuperación se expresa como porcentaje de recuperación, que consistió en el enriquecimiento de una muestra con los analitos de interés, y recrear las variables que intervienen en la matriz, para realizar un paralelo con la misma muestra no enriquecida. Esto es expresado como porcentaje de recuperación se calculó según la siguiente expresión:

$$\%Recuperación = \frac{CE - CNE}{CSE} x 100\%$$

Donde:

CE: Concentración de polifenol o metilxantina en la muestra enriquecida

CNE: Concentración en la muestra no enriquecida

CSE: Concentración de la solución enriquecedora

#### ▪ Nivel mínimo de detección y Nivel mínimo de cuantificación

El nivel mínimo de detección en una muestra es la concentración más baja que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones experimentales. El nivel mínimo de detección se puede calcular usando la curva de calibración y calcular la medida de la raíz de la sumatoria de los errores al cuadrado (*root mean square error*, RMSE). Éste método puede ser aplicado cuando existe una relación lineal entre la respuesta del detector y la concentración del analito. El método RMSE involucra los siguientes pasos:

1. Generar una curva de calibración de 4 a 5 puntos con patrones dentro del orden de magnitud del Nivel mínimo de detección estimado.
2. Realizar una regresión lineal de la curva y calcular los valores de la pendiente ( $b$ ), el intercepto ( $a$ ) y  $r^2$  con un número  $n$  de patrones.
3. La curva de calibración se define como:

$$y = bx + a$$

4. Basado en el valor de la pendiente  $b$  y el intercepto  $a$ , calcular la respuesta predicha  $y_p$  para cada patrón.
5. Calcular el error absoluto asociado con cada medida  $|y_p - y|$ .
6. Calcular el RMSE para cada patrón. Éste parámetro se calcula de este modo:

$$RMSE = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n E^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

7. Rearreglando la ecuación de la recta, la concentración en el Nivel mínimo de detección ( $x_L$ ) se calcula:

$$x_L = \frac{3 * RMSE}{b}$$

El nivel mínimo de cuantificación (LOQ) se define como:

$$x_c = \frac{10 * RMSE}{b}$$

## **2.2. Estandarización del proceso de extracción de flavonoides y metilxantinas de grano de cacao.**

Para la preparación de los extractos, se retiró manualmente la pulpa de los granos frescos, se escaldaron a 95°C durante 5 minutos para inactivar enzimas oxidantes tales como polifenol oxidasa (PPO), y se dejaron secar a una temperatura controlada de 45°C hasta lograr un contenido de humedad del 7%. (Tomás – Barberán *et al*, 2007) Los granos secos se limpiaron y descascarillaron para obtener los *nibs*. Posteriormente se tomaron 2g de *nibs* y se trataron con 10mL de n-hexano, para desengrasarlos. Este procedimiento se repitió 3 veces y luego se removió el hexano residual con nitrógeno (Belscak *et al*, 2009).

Los compuestos fenólicos y las metilxantinas fueron extraídas 3 veces con 20mL de etanol acuoso (80%), por 15 minutos a 60°C, con agitación constante. Después de cada extracción, la mezcla se centrifugó a 3500rpm por 15 minutos. Después de la filtración, el sobrenadante se rotovaporó a 50°C por 15 minutos, y finalmente se aforó con etanol/agua 50:50 para obtener 25mL de extracto (Perea *et al*, 2009). El frasco se debió llenar con nitrógeno y conservar en un congelador a -18°C (Belscak *et al.*, 2009). Se realizó una dilución adicional de 100µL de extracto en 1000µL de agua destilada, para ser analizada por HPLC. Todas las muestras se debieron pasar a través de un filtro de PTFE de 0.45µm antes de ser inyectados (Schinella *et al*, 2010).

### **2.3. Implementación del método**

La identificación de los compuestos de interés se realizó con base en los tiempos de retención de los patrones, mientras que la cuantificación de los flavonoides Catequina, Epicatequina, Procianidina B1 y Procianidina B2 y de las metilxantinas Cafeína y Teobromina, se llevó a cabo usando el método de estándar externo (Wang, 2009), preparando muestras de patrones de concentración conocida que se analizaron para construir una curva de calibración para cada componente a cuantificar.

Con este método fue necesario medir exactamente los volúmenes inyectados tanto de los patrones como de cada extracto de cacao, para ello se prepararon las siguientes muestras:

#### **2.3. Muestras reales**

Muestras de 2 genotipos de cacao universales ICS 95 y CCN 51, que fueron traídas de lotes de cacao conocido, con la colaboración de FEDECACAO. Los granos fueron descascarillados y molidos de forma manual. Luego se procedió a realizar la extracción de los componentes a analizar y su posterior cuantificación.

#### **2.4. Blancos**

Se utilizó una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar. Con los valores de los blancos se determinó el efecto que posee la línea base sobre el método.

#### **2.5. Patrones**

Se prepararon soluciones de los flavonoides Catequina, Epicatequina, Procianidina B1 y Procianidina B2 y de las metilxantinas Cafeína y Teobromina, a intervalos de concentración establecidos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Validación del método

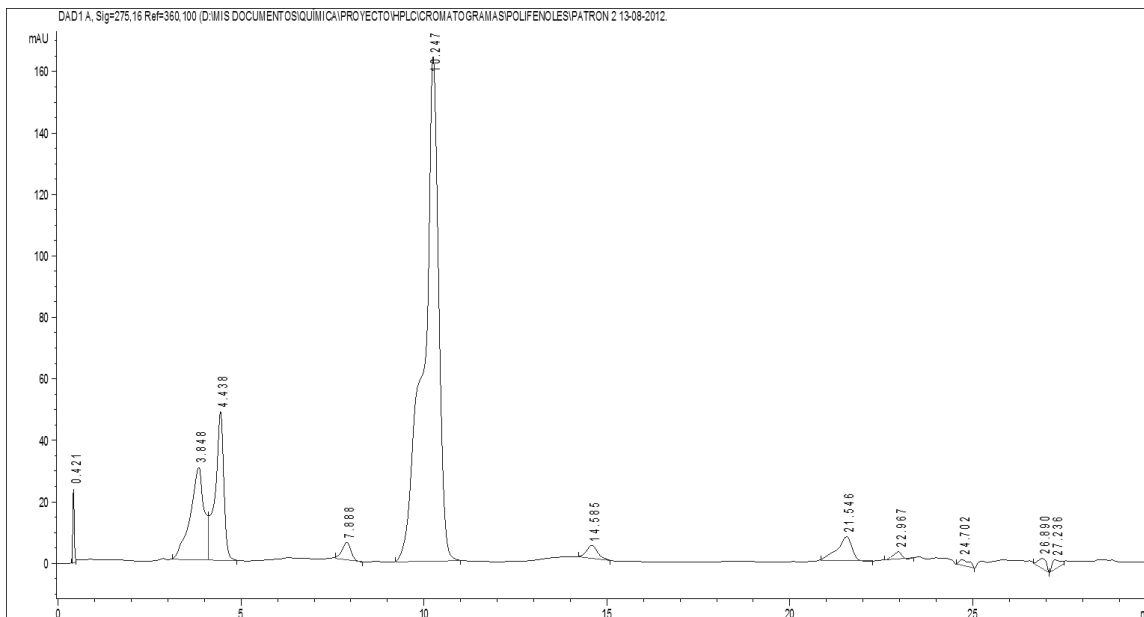
##### ▪ Pruebas preliminares

En la primera etapa de la metodología propuesta, se realizaron los ensayos previos, empleando las mismas condiciones reportadas en la literatura, usando un equipo HPLC Agilent 1100 Series, columna en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5  $\mu$ m, a 35°C. La teobromina y cafeína se detectaron a 275 nm, las procianidinas y los flavan-3-oles a 280nm.

Las condiciones iniciales de fase móvil fueron en agua/ácido fórmico (95:5 v/v) (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B), flujo de 0.6mL/min. El gradiente: 0-20 min, 6-10% B; 20-25 min, 10-13% B; 25-30 min, 13-15% B; 30-40 min, 15-10% B; 40-45 min, 10-6% B, seguido de 10 min de re-equilibrio de la columna antes de una nueva inyección. Sin embargo se encontró una baja eficiencia en la separación de los picos y el tiempo de análisis (**figura 5**), por lo cual fue necesario modificar los parámetros para mejorar las condiciones de análisis.

Los cambios realizados consistieron en:

- Modificación del gradiente: usando ácido fórmico 5% (solvente A) y Acetonitrilo (solvente B), se aplicó un flujo de 1mL/min así: 0-15min, 0-11.8%B; 15-16min, 11.8-15%B; 16-21min, 15% B; 21-26min, 15-0% B, seguido de 5 min de re-equilibrio de la columna para realizar una nueva inyección.
- Cambio de solvente para los patrones empleados: se sustituyó el solvente etanol de grado analítico por agua tipo 1.
- Aumento de la acidez de la fase móvil, llevando de 0.1 al 5%, ya que esto ayuda a la protonación de los grupos hidroxilo y carbonilo, lo que aumenta la polaridad de los analitos y disminuye los tiempos de retención.

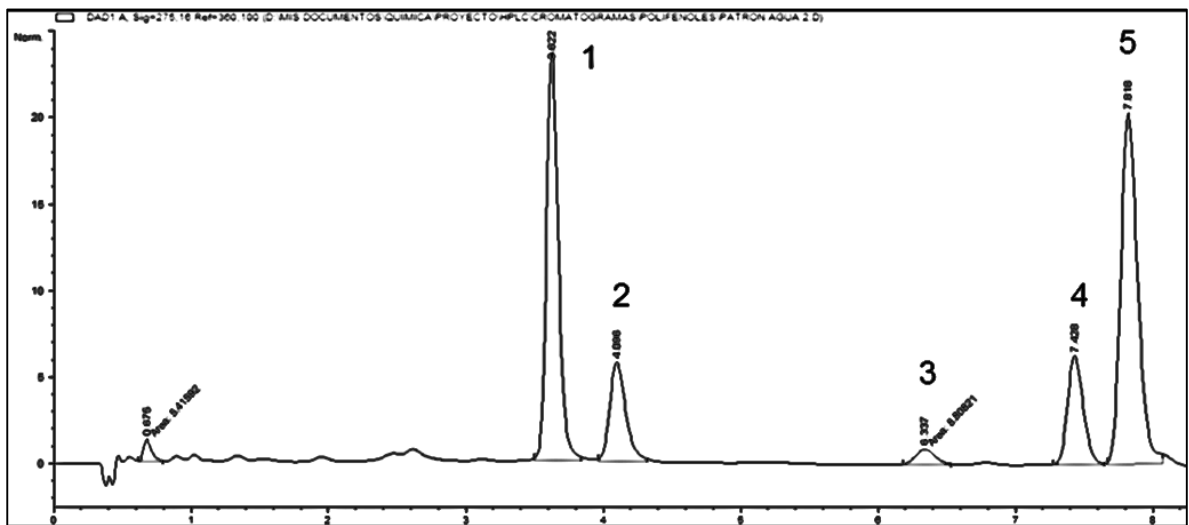


**Figura 5.** Cromatograma de los analitos de interés aplicando la metodología reportada por Schinella *et al.* 2010. Equipo HPLC Agilent 1100 Series, columna en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , a 35°C. La teobromina y cafeína se detectaron a 275 nm, las procianidinas y los flavan-3-oles a 280nm. Condiciones: fase móvil en agua/ácido fórmico (95:5 v/v) (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B), flujo de 0.6mL/min. El gradiente: 0-20 min, 6-10% B; 20-25 min, 10-13% B; 25-30 min, 13-15% B; 30-40 min, 15-10% B; 40-45 min, 10-6% B, seguido de 10 min de re-equilibrio de la columna antes de una nueva inyección.

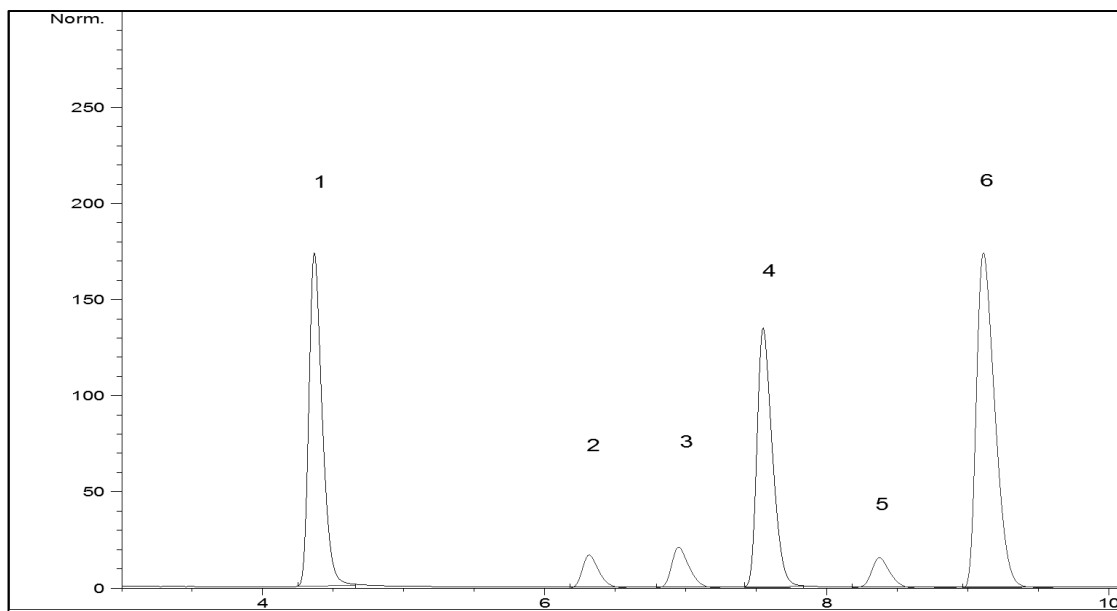
Bajo estas condiciones el tiempo total de análisis por muestra fue de 31 minutos, comparado con los 55 minutos empleados en el método anterior, además que el gradiente es el apropiado para mejorar la resolución de los picos en el cromatograma, tal como se muestra en la **figura 6**. Al aplicar las condiciones anteriores, sin embargo, la procianidina B1 coeluyó con la teobromina por lo que se procedió a revisar otras referencias. Se tuvo en cuenta el aporte de Wolgast (2005), en cuanto a condiciones de elución y gradiente. De modo que con una elución a 0.6 ml/min y un gradiente lineal de acetonitrilo (solución B) sobre el ácido fórmico 0,5% (solución A), ejecutando el gradiente señalado en la **tabla 1** se logró la separación de los compuestos de interés tal como se muestra en la **figura 7**.

**Tabla 1.** Gradiente aplicado para el desarrollo del método

Tiempo (Min)	Fases Móviles	
	%Acetonitrilo	%Ácido Fórmico 0,5%
0	2	98
20	75	25
21	60	40
25	98	2
30	98	2



**Figura 6.** Cromatograma que muestra la separación de los analitos. 1. Teobromina. 2. Catequina. 3. Procianidina B2. 4. Cafeína. 5. Epicatequina.



**Figura 7.** Separación de los patrones de referencia con el último método mencionado. 1. Teobromina. 2. Procianidina B1. 3. Catequina. 4. Cafeína. 5. Procianidina B2. 6. Epicatequina.

En las condiciones mencionadas se observó que la acidez de la fase móvil influye en la intensidad de los picos, lográndose experimentalmente mayor intensidad con una fase móvil con baja acidez, debido a que la adición de una fase móvil ácida permite una mejor separación de los polifenoles, ya que reduce la ionización de los grupos hidroxilo y carboxilo (Belscak *et al.*, 2009), sin embargo, no se debe superar la concentración por encima del 1%, por deterioro de la columna (Wollgast, 2005).

Una vez definidas las condiciones del análisis, se procedió a determinar las figuras de mérito como se enuncia a continuación.

- **Determinación de las figuras analíticas de mérito**

En cada caso se tomó como base la preparación de 1g de muestra aproximadamente, para que cada ensayo fuese reproducible, además que se garantizaron las mismas condiciones de luz, temperatura y tiempo de análisis entre muestreos, entre tiempos de almacenamiento y de inyección de la muestra para evitar descomposición, degradación y resultados no válidos de las mismas.

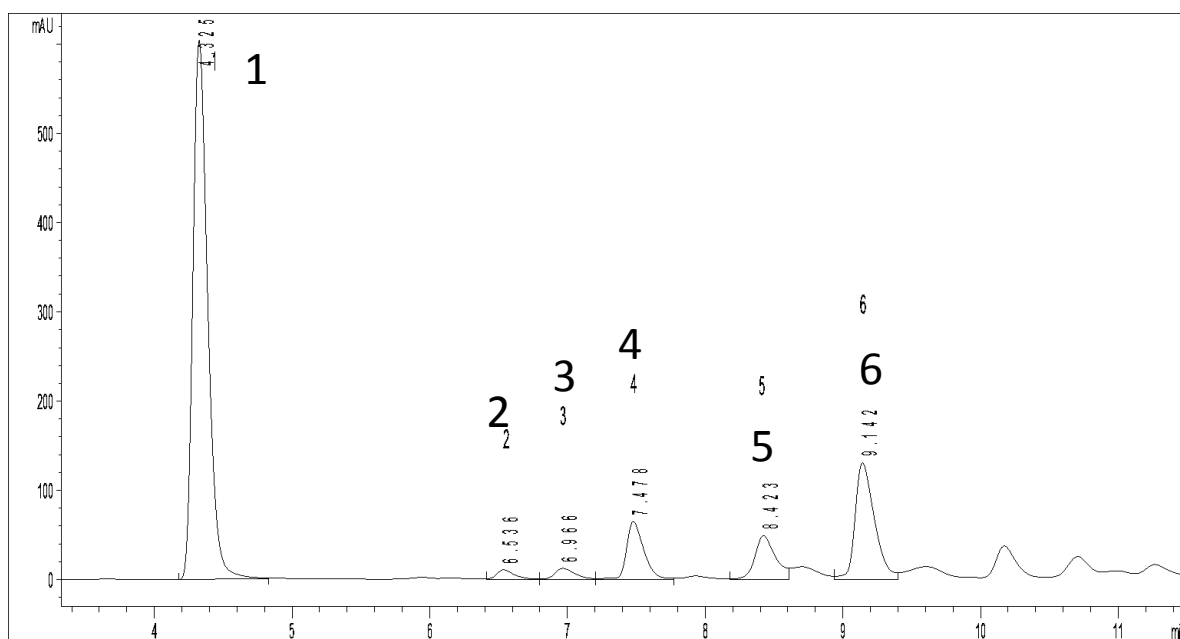
- **Especificidad**

Para los métodos cromatográficos, la especificidad es la capacidad del método para medir con exactitud la respuesta de un analito en presencia de todos los posibles componentes de una muestra. Si la respuesta se distingue de todas las demás, se dice que el método es selectivo (Callejón, R. 2008).

La especificidad se determinó en los extractos tomándose como criterio que los picos adyacentes tuvieran una resolución de al menos 1.5 con respecto a los picos restantes. Para dichos cálculos se tomó como referencia el material CAU 39 sin fermentar ni secar, es decir cacao verde teniendo en cuenta que en este los flavonoides y metilxantinas no han sufrido ningún tipo de modificación. Los resultados obtenidos son mostrados en **tabla 2**, y se observa que aún a una sola longitud de onda (275 nm) se halla una alta resolución en los picos (**figura 8**), y que la mínima resolución obtiene con la procianidina B1, que presenta un valor de 2,95. Lo anterior indica que el método es específico para cada uno de los analitos.

**Tabla 2. Resolución de los picos del extracto del genotipo CAU 39**

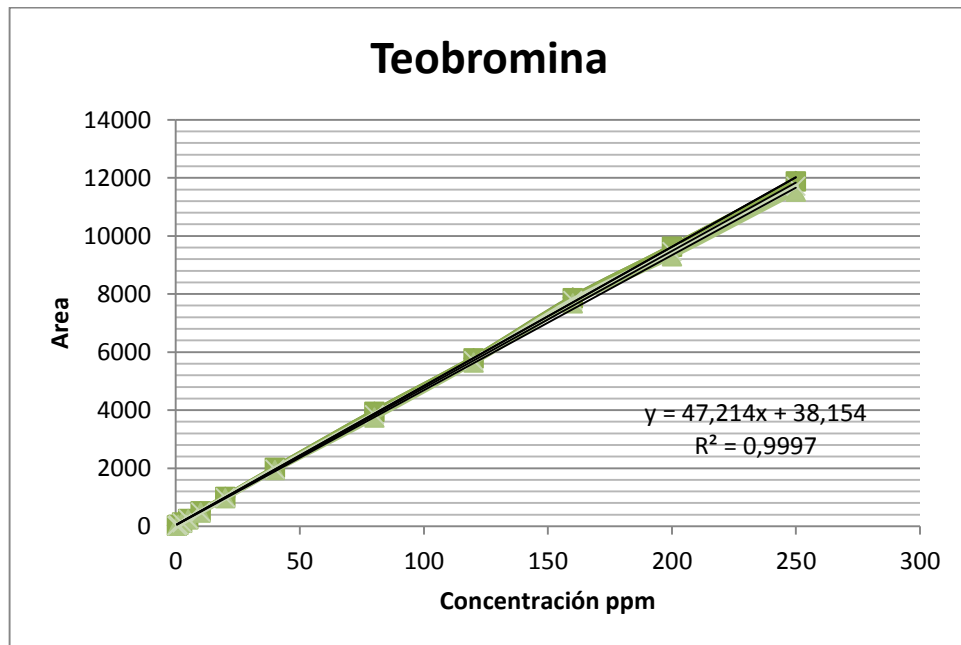
Compuesto	t <sub>r</sub> 1 (min)	t <sub>r</sub> 2 (min)	t <sub>r</sub> 3 (min)	t <sub>r</sub> Prom (min)	Anchura del pico 1 (min)	Anchura del pico 2 (min)	Anchura del pico 3 (min)	Anchura del pico Prom (min)	Resolución
Teobromina	4,33	4,36	4,35	4,35	0,12	0,12	0,12	0,12	16,92
Procianidina B1	6,53	6,58	6,53	6,55	0,14	0,13	0,13	0,14	2,86
Catequina	6,96	7,01	6,96	6,98	0,16	0,15	0,15	0,16	3,45
Cafeína	7,47	7,50	7,47	7,48	0,13	0,13	0,13	0,13	6,33
Procianidina B2	8,41	8,45	8,42	8,43	0,16	0,19	0,16	0,17	4,50
Epicatequina	9,13	9,17	9,14	9,15	0,15	0,15	0,15	0,15	3,56



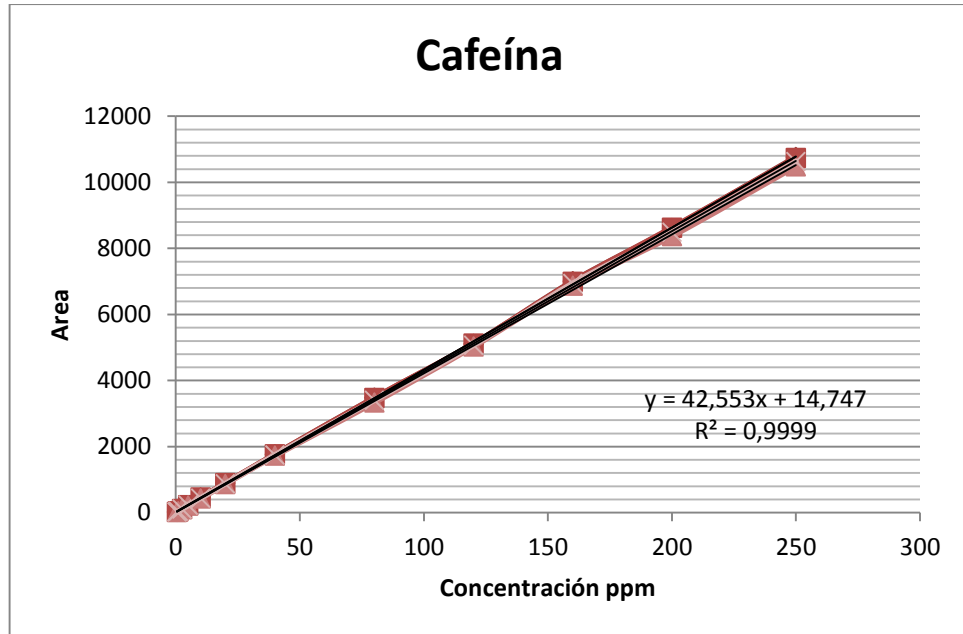
**Figura 8.** Cromatograma del material CAU 39 sin fermentar ni secar. 1. Teobromina. 2. Procianidina B1. 3. Catequina. 4. Cafeína. 5. Procianidina B2. 6. Epicatequina.

- **Rango dinámico lineal y sensibilidad del método**

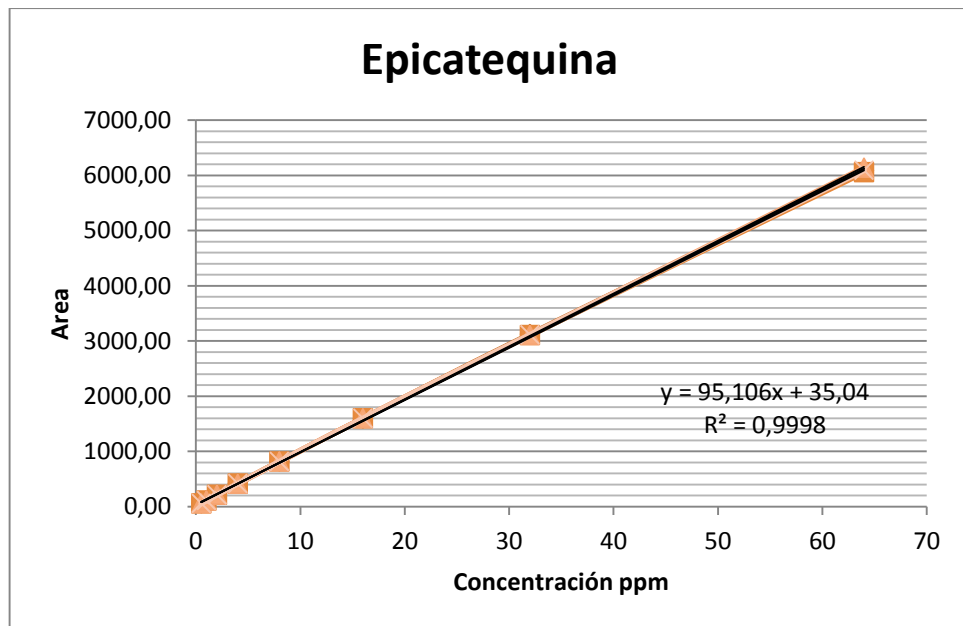
En este caso la variable dependiente es el área ( $y$ ) y la variable independiente es la concentración ( $x$ ). Para determinar inicialmente la relación lineal entre las dos variables se elaboró un diagrama de dispersión para cada uno de los analitos (**Figuras 9-14**). De acuerdo a los gráficos de dispersión obtenidos, se puede asumir que existe una relación línea entre la concentración de los analitos de interés y el detector en el rango de concentraciones manejadas.



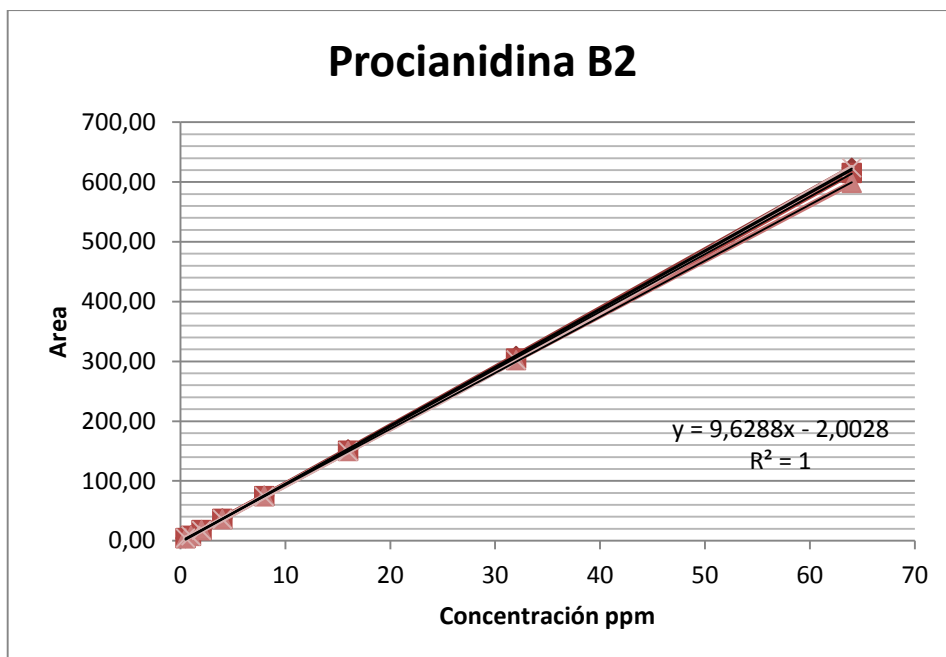
**Figura 9. Curva de calibración del patrón de teobromina con su ecuación promedio.**



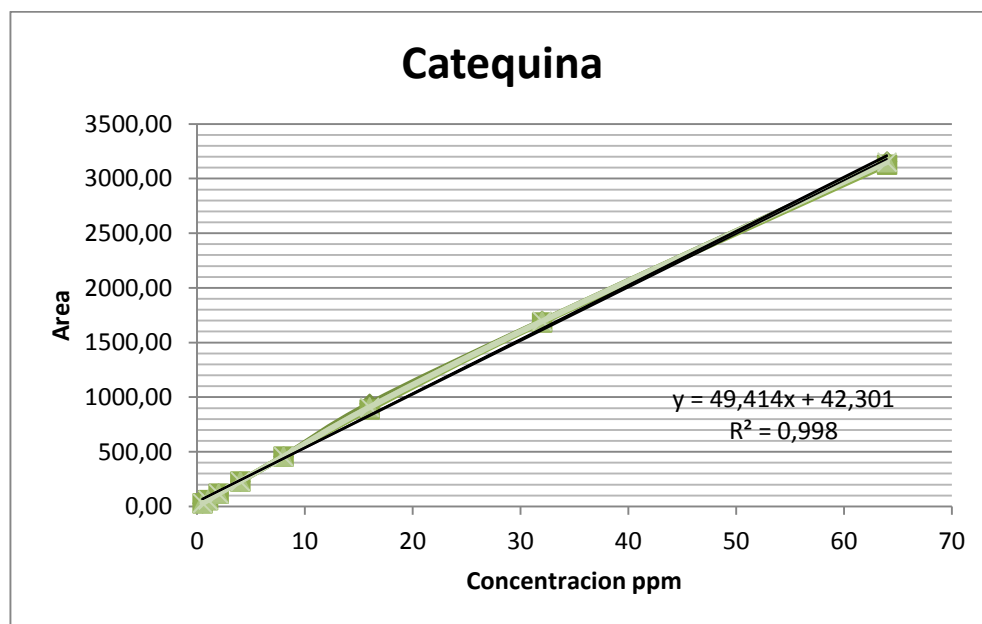
**Figura 10.** Curva de calibración del patrón de cafeína con su ecuación promedio.



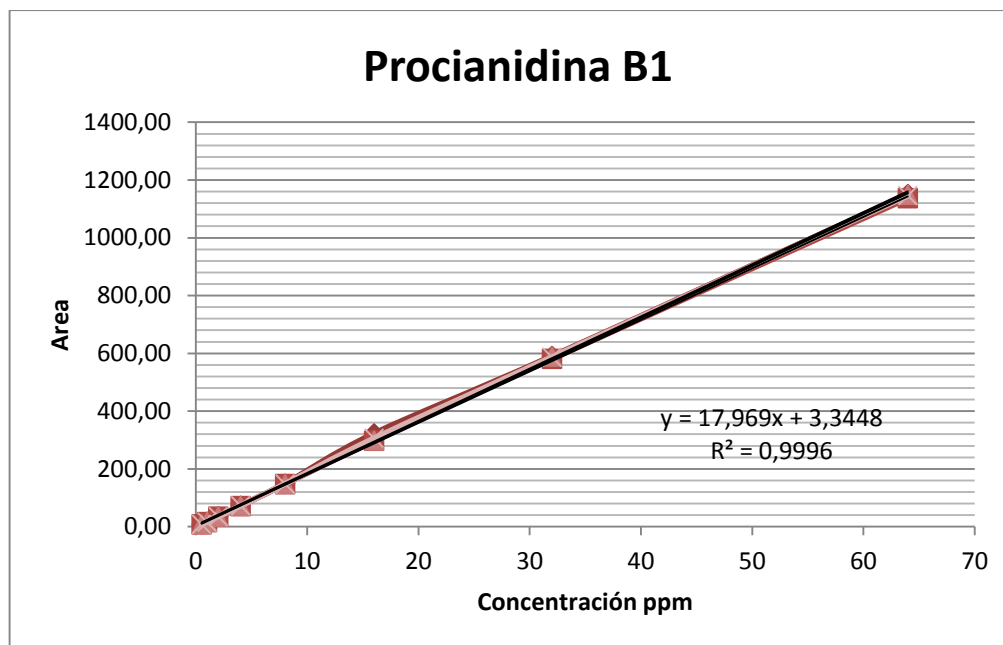
**Figura 11.** Curva de calibración del patrón de epicatequina con su ecuación promedio.



**Figura 12.** Curva de calibración del patrón de procianidina B2 con su ecuación promedio.



**Figura 13.** Curva de calibración del patrón de catequina con su ecuación promedio.



**Figura 14.** Curva de calibración del patrón de procianidina B1 con su ecuación promedio.

Los factores que se determinan en principio son el rango dinámico lineal y la sensibilidad del método, el primero se evalúa con el coeficiente de correlación, que debe ser mayor de 0,99. La sensibilidad se calcula con la desviación estándar de la regresión de la curva (sección 3.2.3.) y son presentadas en la **tabla 3**.

Para esta figura de mérito, es importante observar la pendiente, ya que entre más grande sea, significa que el analito es más sensible al detector del equipo, y sus desviaciones demuestran la precisión de la curva de calibración. A partir de este punto se pueden comparar detectores o parámetros de un mismo detector (longitud de onda por ejemplo) para obtener las mejores condiciones para el tratamiento de los datos. Ello permite concluir que el método es aplicable bajo los intervalos analizados de concentración.

**Tabla 3.** Evaluación del rango dinámico lineal y la sensibilidad del método por estándar externo.

Analito	Ecuación promedio	R <sup>2</sup>	Pendiente	S <sub>b</sub> *	b ± tS <sub>b</sub>
Teobromina	y = 47,214x + 38,154	0,9997	47,214	0,7932	47,214 ± 1,83
Cafeína	y = 42,553x + 14,747	0,9999	42,553	0,5893	42,553 ± 1,36
Procianidina B1	y=17,969x + 3,3448	0,9996	17,969	0,1275	17,969 ± 0,2945
Catequina	y = 49,414x + 42,301	0,998	49,414	0,2383	49,414 ± 0,55
Procianidina B2	y = 9,6288x - 2,0028	1	9,6288	0,2134	9,6288 ± 0,4929
Epicatequina	y = 95,106x + 35,04	0,9998	95,106	0,5695	95,106 ± 1,3155

\* S<sub>b</sub>: Desviación estándar de la pendiente de la línea de regresión (representa la sensibilidad en la curva de calibración).

#### ▪ Precisión

Este ensayo se realizó por tres días seguidos, a la misma hora, la misma muestra, el mismo método, el mismo equipo y el mismo analista. Se evaluó la precisión en condiciones de repetibilidad. Este ensayo no tiene en cuenta la concentración, sino el área y los tiempos de retención de cada uno de los analitos. En las **tablas 4 a 9** se muestran los resultados obtenidos para la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de los analitos de interés. El coeficiente de variación debe ser inferior al 5% para las variables presentes. Los resultados demuestran la precisión del método, según las buenas prácticas de laboratorio, por lo tanto se confirma la aptitud del sistema analítico para el método desarrollado, dada la buena repetibilidad de las áreas relativas y los tiempos de retención. Este ensayo se realizó para 3 medidas por concentración de los analitos.

**Tabla 4.** Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la teobromina

# Pico	Concentración Teobromina	Área Prom [mAu*s]	Desviación Estándar, S	Coefficiente de Variación %CV	Tiempo promedio	Desviación Estándar S	Coefficiente de Variación %CV
1	0,5	26,66	1,38	5,18	4,35	0,06	1,44
2	1	50,67	0,35	0,70	4,35	0,05	1,16
3	2,5	123,49	4,88	3,95	4,36	0,03	0,73
4	5	248,95	7,26	2,91	4,37	0,04	0,85
5	10	498,85	23,29	4,67	4,36	0,03	0,64
6	20	991,11	23,85	2,41	4,36	0,02	0,56
7	40	1973,11	43,16	2,19	4,35	0,03	0,66
8	80	3845,36	116,01	3,02	4,37	0,00	0,07
9	120	5714,70	85,81	1,50	4,37	0,02	0,45
10	160	7781,33	106,10	1,36	4,38	0,01	0,14
11	200	9464,15	183,79	1,94	4,36	0,00	0,02
12	250	11712,75	203,94	1,74	4,36	0,01	0,25

**Tabla 5.** Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la cafeína

# Pico	Concentración Cafeína	Área Prom [mAu*s]	Desviación Estándar, S	Coficiente de Variación %CV	Tiempo promedio	Desviación Estándar S	Coficiente de Variación %CV
1	0,5	23,93	0,96	4,03	7,55	0,01	0,12
2	1	45,30	0,88	1,95	7,55	0,04	0,48
3	2,5	110,15	3,22	2,92	7,55	0,04	0,53
4	5	221,63	4,22	1,90	7,55	0,04	0,58
5	10	442,46	15,35	3,47	7,55	0,03	0,45
6	20	879,16	13,22	1,50	7,54	0,04	0,47
7	40	1747,59	24,82	1,42	7,54	0,03	0,38
8	80	3405,49	80,82	2,37	7,54	0,02	0,23
9	120	5072,28	47,37	0,93	7,54	0,02	0,33
10	160	6939,28	69,46	1,00	7,54	0,02	0,29
11	200	8491,24	142,48	1,68	7,53	0,02	0,22
12	250	10627,80	152,77	1,44	7,52	0,01	0,16

**Tabla 6.** Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la procianidina B1

# Pico	Concentración B1	Área Prom [mAu*s]	Desviación Estándar, S	Coficiente de Variación %CV	Tiempo promedio	Desviación Estándar S	Coficiente de Variación %CV
1	0,5	8,10	0,25	3,11	6,28	0,02	0,33
2	1	16,21	0,26	1,62	6,32	0,01	0,21
3	2	35,19	0,63	1,78	6,35	0,00	0,05
4	4	71,90	0,44	0,61	6,35	0,01	0,20
5	8	148,14	0,95	0,64	6,37	0,00	0,02
6	16	305,86	14,66	4,79	6,34	0,06	0,95
7	32	586,59	5,12	0,87	6,37	0,03	0,52
8	64	1145,80	7,59	0,66	6,36	0,02	0,29

**Tabla 7.** Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la catequina

# Pico	Concentración Catequina	Área Prom [mAu*s]	Desviación Estándar, S	Coficiente de Variación %CV	Tiempo promedio	Desviación Estándar S	Coficiente de Variación %CV
1	0,5	28,87	0,53	1,84	6,91	0,02	0,24
2	1	57,11	0,16	0,29	6,94	0,02	0,24
3	2	116,38	0,55	0,47	6,98	0,01	0,07
4	4	228,14	0,85	0,37	6,98	0,01	0,21
5	8	455,65	1,29	0,28	7,00	0,01	0,09
6	16	907,52	27,53	3,03	6,98	0,06	0,88
7	32	1693,96	9,61	0,57	7,01	0,04	0,62

8	64	3151,01	20,63	0,65	6,99	0,02	0,33
---	----	---------	-------	------	------	------	------

**Tabla 8.** Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la procianidina B2

# Pico	Concentración Procianidina B2	Área Prom [mAu*s]	Desviación Estándar, S	Coefficiente de Variación %CV	Tiempo promedio	Desviación Estándar S	Coefficiente de Variación %CV
1	0,5	4,28	0,08	1,90	8,29	0,00	0,05
2	1	8,35	0,11	1,32	8,32	0,02	0,23
3	2	17,57	0,23	1,30	8,35	0,00	0,04
4	4	36,20	0,77	2,12	8,35	0,01	0,16
5	8	74,59	0,72	0,96	8,36	0,01	0,10
6	16	150,65	1,66	1,10	8,35	0,06	0,70
7	32	304,62	3,95	1,30	8,37	0,04	0,46
8	64	615,38	14,58	2,37	8,35	0,02	0,29

**Tabla 9.** Medición de la repetibilidad en áreas y tiempos de retención de la epicatequina.

# Pico	Concentración Epicatequina	Área Prom [mAu*s]	Desviación Estándar, S	Coefficiente de Variación %CV	Tiempo promedio	Desviación Estándar S	Coefficiente de Variación %CV
1	0,5	55,08	0,07	0,12	9,05	0,01	0,06
2	1	107,53	0,18	0,17	9,08	0,02	0,26
3	2	212,71	0,16	0,08	9,11	0,00	0,04

4	4	413,77	0,71	0,17	9,10	0,01	0,15
5	8	814,96	1,40	0,17	9,11	0,01	0,07
6	16	1596,71	1,87	0,12	9,09	0,06	0,64
7	32	3111,70	9,53	0,31	9,10	0,03	0,37
8	64	6093,89	42,21	0,69	9,06	0,03	0,29

- **Recuperación**

Los resultados obtenidos de la evaluación de la eficiencia del método, expresada como porcentaje de recuperación de cada flavonoide y metilxantinas en los *nibs* desengrasados del genotipo SCC 61, para la calibración por estándar externo, se muestran en la **tabla 10**.

Los porcentajes de recuperación demuestran la eficiencia de la extracción de la mayoría de los flavonoides y metilxantinas, según lo recomendado por la literatura, donde se aceptan porcentajes de recuperación en el rango 70-120%, sin embargo en el caso de la procianidina B2, el porcentaje de recuperación esta por fuera de los límites permitidos. Esto puede deberse a factores como la temperatura que afecta la extracción de los polifenoles, y hace estos compuestos se polimericen (Cooper et al, 2007). Situaciones similares han sido detectadas por Hellström, and Mantilla, 2008, quienes encontraron que la determinación de procianidinas por HPLC es problemática porque aparecen como mezclas complejas y son frecuentemente despolimerizadas antes del análisis para evitar interferencias.

- **Nivel mínimo de detección y Nivel mínimo de cuantificación**

Los criterios utilizados para la determinación de los LOD (*Limit of Detection*) y LOQ (*Limit of Quantification*) se describieron en la sección **2.1 del desarrollo experimental**. Los límites de detección y cuantificación estimados se reportan en las **tablas 11-17**.

**Tabla 10.** Evaluación de la eficiencia del método

<b>Analito</b>	<b>CE*</b> <b>(ppm)</b>	<b>CNE**</b> <b>(ppm)</b>	<b>CSE***</b> <b>(ppm)</b>	<b>R, %</b>	<b>X</b>	<b>S</b>
Teobromina	10,51	9,71	1	79,80	81,62	1,62
	10,51	9,69	1	82,14		
	10,51	9,69	1	82,91		
Cafeina	2,05	1,86	0,25	77,40	75,23	3,56
	2,04	1,85	0,25	77,16		
	2,03	1,85	0,25	71,13		
Procianidina B2	1,66	1,50	0,05	333,56	314,37	18,26
	1,65	1,49	0,05	312,35		
	1,64	1,49	0,05	297,21		
Epicatequina	0,32	0,28	0,05	80,25	79,37	0,81
	0,32	0,28	0,05	78,67		
	0,32	0,28	0,05	79,18		
Procianidina B1	0,19	0,15	0,05	72,82	70,98	3,71
	0,19	0,16	0,05	66,71		
	0,19	0,16	0,05	73,40		
Catequina	0,16	0,12	0,05	80,80	80,40	0,98
	0,16	0,12	0,05	79,28		
	0,16	0,12	0,05	81,11		

\*CE: Concentración del analito en la muestra enriquecida

\*\*CNE: Concentración del analito en la muestra no enriquecida

\*\*\*CSE: Concentración de la solución enriquecedora

**Tabla 11.** Datos y Cálculos realizados con la procianidina B1.

# Pico	Concentración B1	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Respuesta predicha mAu*s	Error Abs	LOD	LOQ
1	0,5	8,35	8,09	7,85	8,10	7,624	0,47	B1 LOD: $y = 18,347x - 1,5495$ $R^2 = 0,9998$	
2	1	16,49	16,17	15,98	16,21	16,79	-0,58		
3	2	35,91	34,74	34,93	35,19	35,14	0,05		
4	4	72,38	71,79	71,53	71,90	71,83	0,06		
RMSE							0,54	0,09	0,29

**Tabla 12.** Datos y Cálculos realizados con la catequina.

# Pico	Concentración Catequina	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Respuesta predicha mAu*s	Error Abs	LOD	LOQ
1	0,5	29,42	28,83	28,37	28,87	29,79	-0,92	Catequina LOD: $y = 56,663x + 1,4663$ $R^2 = 1$	
2	1	57,30	57,00	57,03	57,11	58,13	-1,02		
3	2	116,87	115,79	116,47	116,38	114,79	1,59		
4	4	228,58	227,16	228,69	228,14	228,12	0,02		
RMSE							1,48	0,08	0,26

**Tabla 13.** Datos y Cálculos realizados con la procianidina B2.

# Pico	Concentración Procianidina B2	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Respuesta predicha mAu*s	Error Abs	LOD	LOQ
1	0,5	4,38	4,25	4,22	4,28	3,98	0,29	B2 LOD: $y = 9,172x - 0,5977$ $R^2 = 0,9997$	
2	1	8,47	8,31	8,26	8,35	8,57	-0,23		
3	2	17,81	17,54	17,36	17,57	17,74	-0,18		
4	4	37,08	35,85	35,67	36,20	36,09	0,11		
RMSE							0,30	0,09	0,33

**Tabla 14.** Datos y Cálculos realizados con la epicatequina.

# Pico	Concentración Epicatequina	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Área [mAu*s]	Respuesta predicha mAu*s	Error Abs	LOD	LOQ
1	0,5	55,15	55,02	55,06	55,08	56,46	-1,39	Epicatequina LOD: $y = 102,41x + 5,2617$ $R^2 = 0,9999$	
2	1	107,70	107,55	107,33	107,53	107,67	-0,14		
3	2	212,75	212,54	212,86	212,71	210,08	2,63		
4	4	414,58	413,48	413,26	413,77	414,90	-1,13		
RMSE							2,25	0,07	0,22

**Tabla 15.** Datos y Cálculos realizados con la teobromina.

# Pico	Concentración Teobromina	Área 1 [mAu*s]	Área 2 [mAu*s]	Área 3 [mAu*s]	Área [mAu*s]	Respuesta predicha mAu*s	Error Abs	LOD	LOQ
1	0,5	27,85	27,87	25,47	26,66	25,94	0,72	Teobromina LOD: $y = 49,428x + 1,2309$ $R^2 = 0,9999$	
2	1	50,34	50,41	50,99	50,67	50,65	0,01		
3	2,5	127,62	127,99	119,37	123,49	124,80	1,31		
4	5	255,20	255,33	242,70	248,95	248,37	0,58		
RMSE							1,13	0,07	0,23

**Tabla 16.** Datos y Cálculos realizados con la cafeína.

# Pico	Concentración Cafeina	Área 1 [mAu*s]	Área 2 [mAu*s]	Área 3 [mAu*s]	Área [mAu*s]	Respuesta predicha mAu*s	Error Abs	LOD	LOQ
1	0,5	24,78	24,69	23,07	23,93	23,32	0,61	Cafeina LOD: $y = 43,96x + 1,3418$ $R^2 = 0,9999$	
2	1	44,54	44,50	46,05	45,30	45,30	0,00		
3	2,5	113,02	112,67	107,29	110,15	111,24	1,09		
4	5	225,33	225,11	217,92	221,63	221,14	0,49		
RMSE							0,94	0,07	0,2

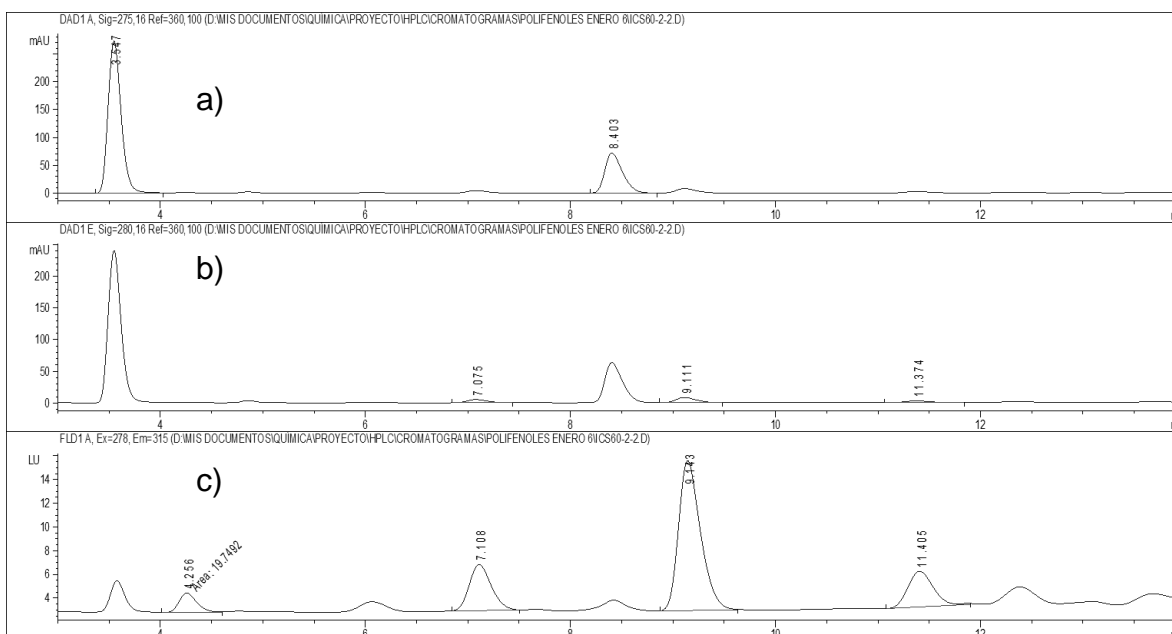
**Tabla 17.** LOD Y LOQ todos los analitos por el método para cada analito. Se calcularon usando el método de RMSE.

<b>Analito</b>	<b>LOD (ppm)</b>	<b>LOQ (ppm)</b>
Teobromina	0,07	0,22
Cafeína	0,06	0,21
B1	0,09	0,29
Catequina	0,07	0,26
B2	0,09	0,32
Epicatequina	0,07	0,22

Un aspecto que hay que resaltar, es que en los métodos reportados y tomados como base, no se reportan las figuras de mérito razón por la cual no se puede hacer una comparación. Se pueden realizar otros tipos de cálculos para los límites de detección, sin embargo, el método RMSE (*root-mean-square error*) es utilizado en sistemas dinámicos, esto incluye HPLC (Corley, J., 2002).

### 3.2. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y METILXANTINAS

Previo a la aplicación del método se corroboró que en las muestras reales de materiales de cacao la concentración de analitos se encontrara dentro de los límites definidos. También se evaluó el impacto de hacer la lectura usando simultáneamente el detector de fluorescencia en una longitud de excitación de 278nm y una longitud de emisión de 315nm, basados en los estudios publicados por Shumow, y Bodor, (2011). Lográndose una mejor resolución de los picos (**ver figura 15**).



**Figura 15.** Cromatograma que muestra la cuantificación de los analitos por el detector de Arreglo de Diodos. a) 275 nm. b) a 280nm. c) Usando el detector de fluorescencia con una longitud de absorción de 278nm y una de emisión de 315nm.

El método definido previamente fue usado en el análisis de flavonoides y metilxantinas de materiales de cacao sin fermentar ni secar y cacao fermentado y seco. Los valores obtenidos (**tabla 18**) fueron similares para los reportados en la literatura para cafeína, teobromina, epicatequina y catequina, pero no para las procianidinas B1 y B2.

**Tabla 18.** Contenido de polifenoles totales, flavonoides principales y actividad antioxidante

		<b>Cacao fermentado y seco</b>		<b>Cacao verde</b>	
	<b>Material</b>	<b>Epicatequina (mg/g)</b>	<b>Catequina (mg/g)</b>	<b>Epicatequina (mg/g)</b>	<b>Catequina (mg/g)</b>
<b>Introducidos</b>	<b>ICS 1</b>	0,19	0,12	1,05	1,57
	<b>ICS 6</b>	0,26	0,16	0,96	1,64
	<b>ICS 39</b>	0,22	0,15	1,01	1,57
	<b>ICS 60</b>	0,29	0,18	0,74	1,46
	<b>ICS 95</b>	0,15	0,11	1,43	1,70
	<b>CCN 51</b>	0,21	0,16	1,30	1,62
	<b>IMC 67</b>	0,04	0,04	1,49	1,69
	<b>TSH 565</b>	0,11	0,09	1,01	1,88
	<b>EET 8</b>	0,23	0,14	1,58	1,67
	<b>EET 96</b>	0,15	0,13	1,01	1,45
<b>Regionales</b>	<b>FLE 2</b>	0,10	0,07	0,86	1,57
	<b>FLE 3</b>	0,06	0,06	1,86	1,09
	<b>FEC 2</b>	0,10	0,07	1,88	0,87
	<b>CAU 39</b>	0,11	0,07	2,01	1,30
	<b>FSA 13</b>	0,14	0,09	1,68	1,04
	<b>FTA 2</b>	0,06	0,05	2,02	1,14
	<b>FEAR 5</b>	0,07	0,05	2,14	1,17
	<b>FSV 41</b>	0,09	0,07	1,99	1,15
	<b>SCC 61</b>	0,14	0,09	1,81	1,06
	<b>FSV 25</b>	0,13	0,10	1,40	0,92
	<b>FSV 155</b>	0,39	0,22	1,49	0,71

Fuente: datos reportador por Laura Noquera, Duvan Peñaranda y Lady Sierra (2013)

**Tabla 19.** Contenido de metilxantinas, teobromina, cafeína en materiales de cacao

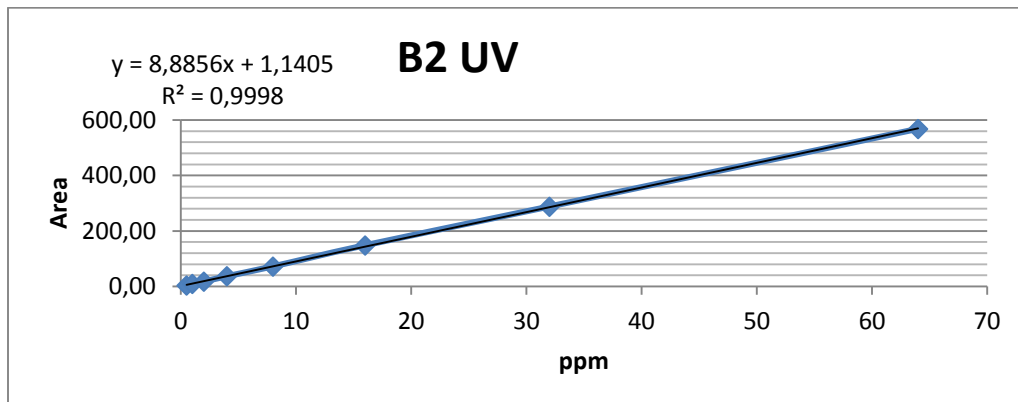
Material	Teobromina (mg/g <sub>ms</sub> )	Cafeína (mg/g <sub>ms</sub> )	Material	Teobromina (mg/g <sub>ms</sub> )	Cafeína (mg/g <sub>ms</sub> )
ICS 1	8,7	2,9	FLE 2	8,3	4,1
ICS 6	13,3	3,1	FLE 3	9,8	2,4
ICS 39	11,8	4,2	FEC 2	9,5	1,6
ICS 60	11,1	3,9	CAU 39	11,5	1,9
ICS 95	10,9	2,9	FSA 13	10,0	1,4
CCN 51	10,9	2,5	FTA 2	8,3	1,2
IMC 67	10,6	1,9	FEAR 5	8,9	2,2
TSH 565	9,1	2,1	FSV 41	8,1	3,0
EET 8	10,6	4,0	SCC 61	10,6	1,8
EET 96	11,1	2,6	FSV 25	9,9	2,4
			FSV 155	9,1	3,3

Fuente: datos reportador por Laura Noguera (2013)

**Tabla 20. Datos obtenidos de la curva de calibración de la procianidina B2 por detector UV-DAD**

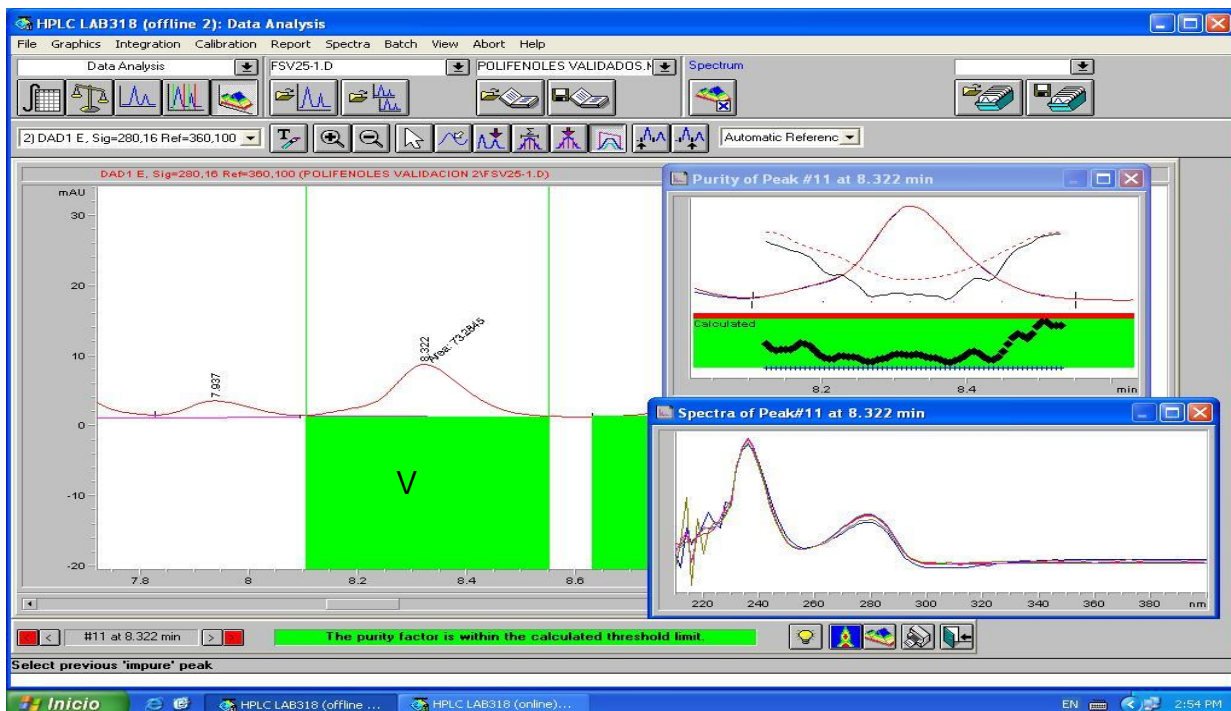
Concentración Procianidina B2	Area [mAu*s]	Area [mAu*s]	Area Prom [mAu*s]
0,5	3,77	3,76	3,76
1	8,71	8,63	8,67
2	17,80	17,10	17,45
4	36,83	36,51	36,67
8	71,69	72,29	71,99
16	149,15	147,21	148,18
32	288,08	287,36	287,72
64	568,44	566,74	567,59

Por último para tratar de elucidar los resultados obtenidos con la procianidina B2, se verificaron varios aspectos: la veracidad de la curva, para lo cual se repitió por duplicado, dando resultados similares, por lo que se descartó que el error fuera del operador (**Tabla 20**).



**Figura 16.** Curva de calibración de la prociandina B2 obtenida nuevamente para rectificar la curva reportada.

Se verificó la pureza del pico, ya que el software *ChemStation* posee una herramienta que ve si existen interferencias que hagan que el pico sea asimétrico. Este factor verifica el 99% de pureza como se ve en la **figura 17**.



**Figura 17.** Imagen capturada del software *ChemStation*, determinando la pureza del pico de la prociandina B2 en el genotipo FSV 25. El color verde (V) indica que su factor de pureza se encuentra entre los límites establecidos.

Al notarse que el pico es simétrico, su espectro (que se encuentra pequeño en la imagen anterior) se formularían dos hipótesis: coelución con otros analitos y que el patrón estuviese degradado. Para verificar la coelución, se realizó una cromatografía semi-preparativa, donde se recogió la fracción del pico en cuestión, desde su inicio hasta su terminación (8.2 a 8.5 min) y se creó un método con un gradiente de 0 a 100%, variando la polaridad y separando lo más posible la coelución. Debido a que estaba muy diluido, se repitió tantas veces como se pudo, ya que la columna, aunque se lava cuidadosamente, presenta trazas de los analitos de interés, que se retienen debido a los tantos componentes de la matriz de la muestra. También se procedió a hacer identificación mediante los IR de patrón vs. Fracción, que mostraron resultados satisfactorios, dando a conocer que el problema proviene del patrón. Estos espectros se encuentran en los anexos A, B y C.

Se puede observar que en el reporte hecho por Venter *et al.* (2013) que la pendiente de la ecuación de la curva de calibración de la procianidina B2 no es tan baja, en comparación con la epicatequina, aunque no sea a las mismas condiciones de análisis, se podría concluir que la pendiente de la epicatequina es 1.5 veces más grande que la pendiente de la B2. En los resultados obtenidos la relación entre ambas pendientes es de 10 a 1.

Cooper *et al.* (2007) demostraron que existe una alta correlación entre la epicatequina y la procianidina B2, aunque uno de los requisitos del estándar interno sea que no se encuentre en la matriz, se puede utilizar debido a que ya se encuentra cuantificado. También posee características similares y se encuentran a tiempos de retención similares, características muy importantes, además que son cromatográficamente distinguibles.

## **CONCLUSIÓN**

La validación del método para la determinación simultánea de las metilxantinas cafeína y teobromina y los flavonoides epicatequina, catequina y procianidinas B1 y B2, se cumplen con las figuras de mérito evaluadas excepto para la recuperación de la procianidina B2. Por lo cual es confiable únicamente para la determinación de cafeína, teobromina y epicatequina y catequina y procianidina B1.

## RECOMENDACIONES

Se debe evaluar y comparar el método de extracción de las metilxantinas y de los flavonoides de forma simultánea, y por separado, para definir el efecto de las variables de extracción y la efectividad de la extracción simultánea.

Se debe evaluar el comportamiento de las procianidinas a través del método de extracción y de análisis dada su alta sensibilidad a la luz y al oxígeno.

Se pueden adquirir para estos próximos análisis, mezclas de patrones, en vez de obtenerlos los patrones individuales, ya que los primeros son más económicos, y proveen información de su separación.

Revisar el método ya en el equipo adquirido en el laboratorio de alimentos las condiciones y proceso de análisis ya que no se requiere trasladar las muestras o extractos hasta la sede central, por lo cual los extractos que son muy sensibles a la luz y al oxígeno se podrían analizar inmediatamente se hayan obtenido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamson, G. 1999. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*.
2. Aránzazu, F., Martínez, N., Palencia, G., Coronado, R., and Rincón, D. 2009. Mejoramiento genético para incrementar la producción y productividad del sistema de cacao en Colombia, pp. 13-123, FEDECACAO, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Corpoica., Bogotá (Colombia).
3. Arellano, J., García, M. 2006. Evidencia Del Uso De Metilxantinas En Las Exacerbaciones De La EPOC. *Revista Institucional Nacional de Enfermedades Respiratorias*.
4. Ariza, A. 2006. El cacao en Cifras. Federación Nacional de Cacaoteros Bogotá (Colombia).
5. Belscak, A., Domes, K., Horzic, D., Ganic, K., and Karlovic, D. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research Intenational*.
6. Buenaventura, A., Gutierrez, M. 2002. Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salud. *Acta Farmacológica Bonarense*.
7. Brunetto, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Galignania, M, Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G., Romero, C. 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*.
8. Cala, M., Vasquez, A. 2008. Estudio Comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante. *Universidad Industrial de Santander*.
9. Calderón, A., Wright, B., Hurst, W., Van Breemen, B. 2009. Screening Antioxidants Using LC-MS: Case Study with Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

10. Callejón, R. Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
11. Cienfuegos-Jovellanos, E., Quiñones, M., Muguerza, M., Moulay, L., Miguel, M., Aleixandre, A. 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
12. Corley, J. 2002. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. Rutgers, The State University of New Jersey, North Brunswick, NJ, USA
13. Cooper, K.A.; Donovan, J.L.; Waterhouse, A.L.; Williamson, G. 2008. Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*.
14. Corporación Colombia Internacional. Perfil del Producto. 2002. Sistema de Inteligencia de Mercados. Bogotá, Colombia.
15. De Aragao N., Veloso, M., Souza, M., Ferreira, S., de Andrade, J. 2005. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
16. De Muijnck, L. 2005 *Cocoa. Encapsulated and Powdered Foods*. Taylor & Francis Group, LLC. 2005. Page 462.
17. Duarte, J., Galindo, Pilar. Pérez-Vizcaíno, F. 2011. Efecto de los polifenoles de los alimentos sobre el riesgo vascular. *Nutrición Clínica en Medicina*
18. El mundo quiere cacao. *Revista IAlimentos*, Edición 22. 2011. Bogotá, Colombia. Página 30.
19. Federación Nacional de Cacaoteros. 2005. Caracterización físico-Química y beneficio del grano de cacao (*Theobroma Cacao*) en Colombia, FEDECACAO, Bogotá (Colombia).
20. Hellström, J. and Mantilla, P. 2008. HPLC Determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
21. Hendrik J. Smit Elizabeth A. Gaffan Peter J. Rogers. 2004. Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. Springer-Verlag.

22. Hyötyläinen, Tuulia. Kivilompolo, Maarit. 2011. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Taylor and Francis Group, LLC.
23. Jensen, O. 2005. Estimación y expresión de la incertidumbre de la medición en análisis químico. Procedimiento NMKL.
24. Kim, H.; Keeney, P.G. 1983. Methods of analysis for (-)-epicatechin in performance liquid chromatography. Journal of Food Science.
25. Maleyki, A. 2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health?. Molecules.
26. Meng, C, Maleyki, A., Ismail, A. 2009. Phenolic and Theobromine Contents of Commercial Dark, Milk and White Chocolates on the Malaysian Market. Molecules.
27. Merken, H. and Beercher, G. 2000. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. Journal of agricultural and food chemistry.
28. Miller, K., Stuart, D., Smith, N., McHale, N., and Hurst W. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry.
29. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, 2010. Planes de Desarrollo para cuatro sectores clave de la agroindustria de Colombia. Sector Confitería, chocolatería y materias primas
30. Mojica Pimiento, P. Paredes Vega, J. 2006. CARACTERISTICAS DEL CULTIVO DEL CACAO EN SANTANDER. ENSAYOS SOBRE ECONOMIA REGIONAL Centro Regional de Estudios Económicos. Bucaramanga.
31. Nazaruddin, R., Ayub, Y., Mamot, S., Heng Cheng, H. 2001. HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products. Malaysian Journal of Analytical Sciences.
32. Nava, H., Lopez, M. 2008. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Centro Nacional de Metrología, entidad mexicana de acreditación, a.c.

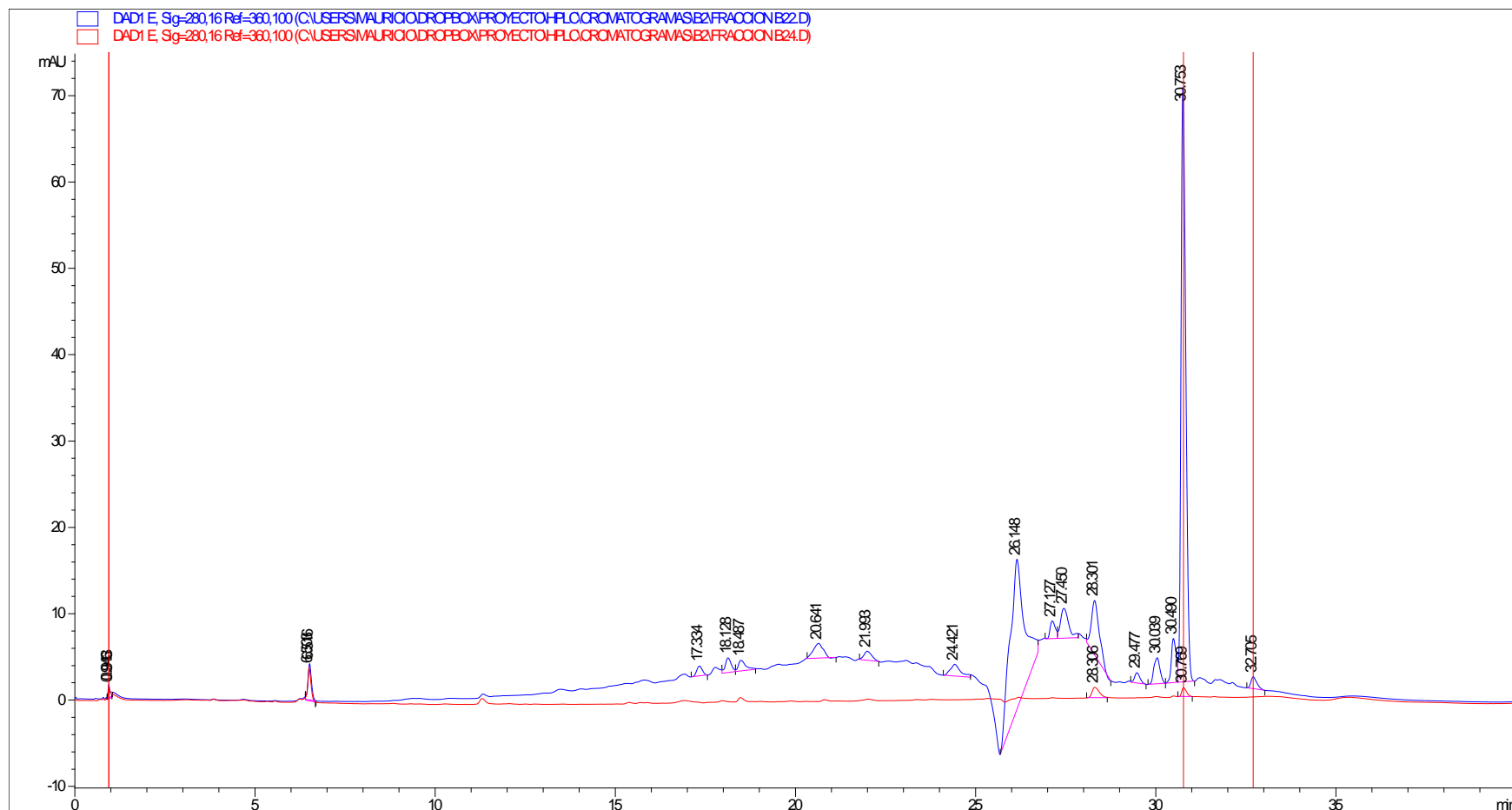
33. Naik, P.J. 2001. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.
34. National Institute of Standards & Technology. Standard Reference Material 2384. Baking Chocolate.
35. Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumou, D., Lieberei, S. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal Of Composition And Analysis*.
36. Norma técnica colombiana NTC-ISO/IEC 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC.
37. Norma JCGM 100: 2008. Evaluación de datos de medición Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida. Edición en Español. Centro Español de Metrología.
38. Perea, J. 2011. Caracterización fisicoquímica organoléptica y funcional de los materiales de cacao introducidos y materiales regionales de cacao promisorios más comercializados en el país. *Colciencias*.
39. Perea, J., Cadena, T., Herrera, J. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista Salud UIS*.
40. Pinzón, J. and Rojas, J. 2009. Guía técnica para el cultivo del cacao, 4 edn., pp. 9-186, FEDECACAO, Bogotá (Colombia).
41. Pinzón, J. 2009. El cacao fino y de aroma: poco y bien pago. *Colombia Cacaotera* 4, 8-10.
42. Proexport Colombia. 2012. Cacao colombiano fino y de aroma
43. Quiñonez, M., Miguel, M., Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*.
44. Van Iterson, R.A. Drenthe College Emmen Holland. A Guide to Validation in HPLC. Based on the work of G. M. Hearn PERKIN ELMER. For <http://www.standardbase.com/tech.htm>

45. Ramos, S., Martín, M., Mateos, R., Granado, B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L. 2008. Protection of Human HepG2 Cells against Oxidative Stress by Cocoa Phenolic Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
46. Rojas Ardila, J. 2010 *El Cacao En Colombia*. Federación Nacional De Cacaoteros.
47. Rojas, J. 2006. Determinación por HPLC de Naringina, Hesperidina, Naringerina y Hesperetina en jugos cítricos y aplicación de Naringinasa en el jugo de mandarina. Universidad Industrial de Santander.
48. Robbins, J.; Leonczak, J.; Jhonson, C.; Kiwick-Urbe, C.; Prior, R Y Liwei, G. 2009. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *Journal of Chromatography*.
49. Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M., Muguera, B., Ramón, D., Ríos, J. 2010. Antioxidant Properties Of Polyphenol-Rich Cocoa Products Industrially Processed. *Food Research International*.
50. Sección de laboratorio y asuntos científicos Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. 2010. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. NACIONES UNIDAS.
51. Serrano, F. 2012. Implementación de métodos cromatográficos para la determinación y cuantificación de pesticidas en mora castilla (*Rubus Glaucus Benth*). Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander.
52. Stefova, M., Stafilov, T., Kulevanova, S. 2010. Flavonoids: HPLC Analysis *Encyclopedia of Chromatography, Third Edition*. Taylor and Francis Group, LLC. Page 882-883.
53. Shumow, L. and Bodor, A. 2011. An industry consensus study on an HPLC fluorescence method for the determination of (±)-catechin and (±)-epicatechin in cocoa and chocolate products. *Chemistry Central Journal*.
54. Tao Wang. 2009 Quantitation by External Standard. *Encyclopedia of Chromatography, Third Edition (Print Version)*. CRC Press.

55. Tomas-Barberan F.A., Cienfuegos-Jovellanos E., Marín A., Muguerza B., Gil-Izquierdo A., Cerda B., Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Ibarra A., Pasamar M.A., Ramón D., Espín J.C. 2007. A New Process to Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.
56. USDA. United States Department of Agriculture, Nutrient Data Laboratory, 2008; <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
57. Vallejo, F. 2009. Validación de la metodología analítica de cuantificación de Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrato, Fenilefrina Clorhidrato y Guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía líquida de alta resolución. Universidad de San Carlos de Guatemala.
58. Wollgast, J. and Anklam, E. 2000. Review on Polyphenols in Theobroma cacao. *Food Research International*.
59. Wollgast, J. 2005. The contents and effects of polyphenols in chocolate. Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health. Justus Liebig University Giessen.

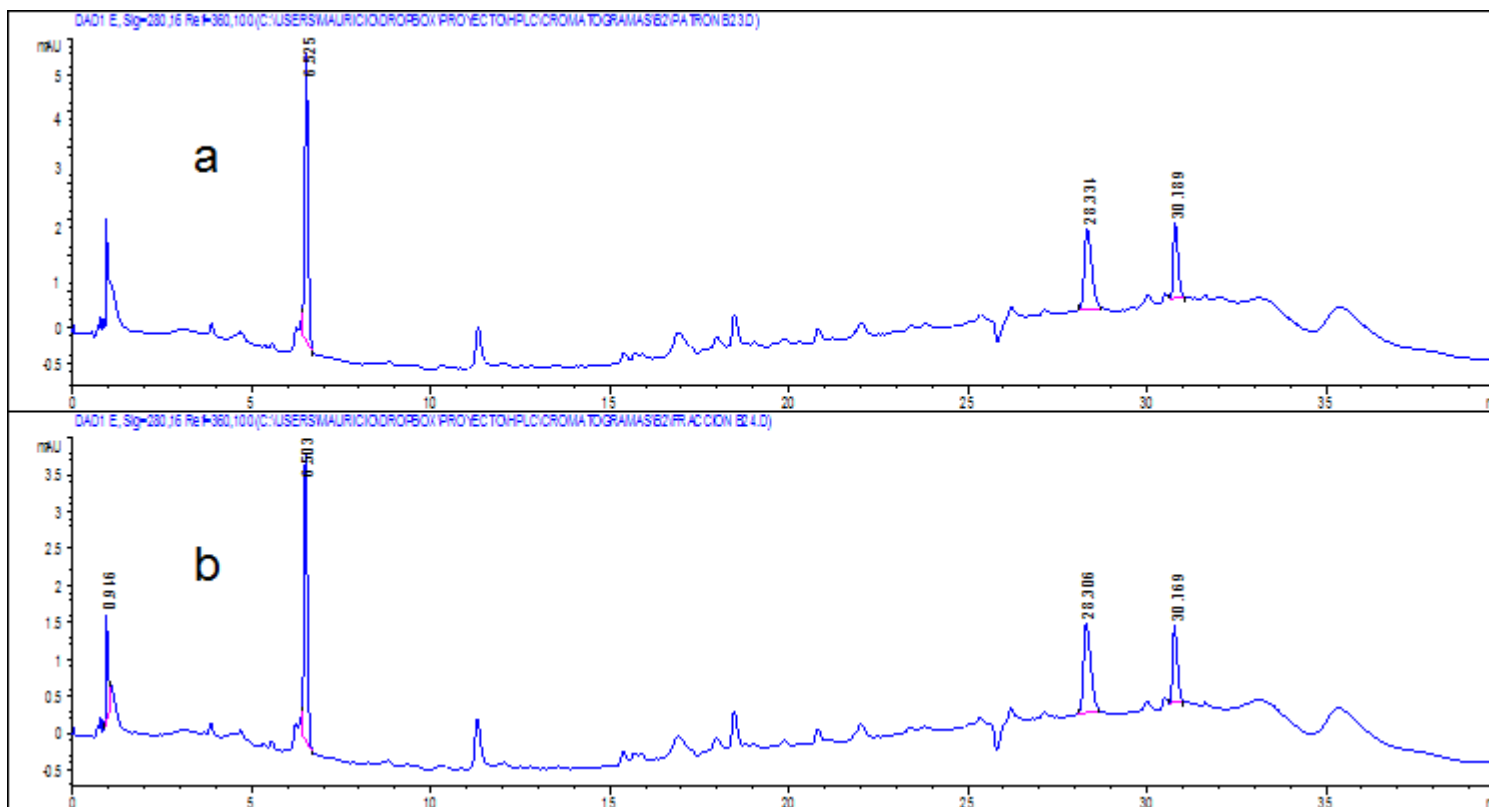
# **ANEXOS**

## ANEXO A . ENSAYOS REALIZADOS PARA COMPROBAR LA PUREZA DE LA PROCIANIDINA B2\*



\*Cromatograma de la fracción. El gradiente corrido fue de 0 a 30 min, variando de 0 a 100% de acetonitrilo. La parte azul representa la suciedad de la columna, por lo que se procedió a volver a pasar la fracción, representado por la parte roja. Nótese que el pico correspondiente a la B2 sale a los 6 minutos, y se puede afirmar que no existe coelución.

## ANEXO B. COMPARACIÓN DE LA FRACCIÓN CON EL PATRÓN DE LA B2.\*\*



\*\*Se comprobó usando el espectro UV-Vis, siendo idénticos. Los dos picos finales no corresponden sino al ruido y suciedad de la columna, comprobado con el espectro Uv-Vis. Éste es un acercamiento al espectro, aparece el pico principal y por tanto se puede afirmar que la fracción suministró suficiente información para comprobar la pureza de la procianidina B2.

**ANEXO C. ESPECTROS INFRARROJOS DE LA FRACCIÓN OBTENIDA DE LA PROCIANIDINA B2, EN COMPARACIÓN CON EL PATRÓN DE REFERENCIA.** Se usó esta técnica debido a la no disponibilidad de un HPLC-MS.

