








## Artículo Original / Original Article

# Validación de una metodología de cuantificación de cafeína por cromatografía líquida (UHPLC/DAD)

## Validation of a methodology for the caffeine quantification by liquid chromatography (UHPLC/DAD)

Oscar Alejandro Tuesta-Hidalgo<sup>1</sup> ; Juan Carlos Tuesta-Hidalgo<sup>1\*</sup> ; Geraldine Morante-Alanya<sup>2</sup> ; Bryan Joel Fermin-Vega<sup>2</sup> ; Nadia Rodríguez-Hamamura<sup>2</sup> ; Marco Antonio Nureña-Hidalgo<sup>1</sup> ; Enrique Alejandro Barbachan-Ruales<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de Alto Amazonas, Yurimaguas, Perú

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Educación "Enrique Guzmán y Valle", Lima, Perú

### RESUMEN

Se realizó la determinación de cafeína en ocho muestras de café procedentes de diferentes ciudades de la Amazonía Peruana, Colombia y Ecuador, con el objetivo de desarrollar una metodología para el análisis de rutina del contenido de cafeína en diversas muestras por cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa. Este estudio se realizó usando una fase móvil de agua: metanol (75:25, v/v), a un flujo de 0,3 mL min<sup>-1</sup> y una temperatura de 45 °C. La cafeína fue isocráticamente separada a 3,8 min. Las concentraciones de cafeína en las muestras se determinaron mediante una curva de calibración con estándar externo, las cuales se encontraron en el rango de 9,74 a 11,12 mg g<sup>-1</sup> en café tostado molido, en 11,08 mg/g en cáscara de café y de 9,17 a 26,59 mg/g en café soluble liofilizado. Se obtuvieron recuperaciones de 68,34, 93,98 y 78,0 % para las fortificaciones de 50, 100 y 150 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos resultados indican que la metodología de cuantificación fue validada a través de un método de separación sencilla y rápida. El estudio permitió obtener concentraciones de cafeína en muestras de café de la región y sugerir el consumo promedio sin superar los límites saludables.

**Palabras clave:** Amazonía; café; cafeína; metodología, UHPLC-DAD

### ABSTRACT

The determination of caffeine in eight coffee samples from different cities of the Peruvian Amazon, Colombia, and Ecuador was carried out developing a methodology for the routine analysis of caffeine content in different samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. This study used a mobile phase of water: methanol (75:25, v/v), at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup> and a temperature of 45 °C. Caffeine was isocratically separated at 3.8 min. The caffeine concentrations in the samples were determined by a calibration curve with external standards, which were found to be in the range of 9.74 to 11.12 mg g<sup>-1</sup> in roasted ground coffee, at 11.08 mg/g in coffee husk and from 9.17 to 26.59 mg/g in freeze-dried soluble coffee. 68.34, 93.98, and 78.0 % were recovered for the 50, 100, and 150 µg mL<sup>-1</sup> fortifications, respectively. These results indicate that the quantification methodology was validated through a simple and rapid separation method. The study made it possible to obtain caffeine concentrations in coffee samples from the region and to suggest average consumption without exceeding healthy limits.

**Keywords:** Amazon; coffee; caffeine; methodology, UHPLC-DAD

**Cómo citar / Citation:** Tuesta-Hidalgo, O. A., Tuesta-Hidalgo, J. C., Morante-Alanya, G., Fermin-Vega, B. J., Rodríguez-Hamamura, N., Nureña-Hidalgo, M. A. & Barbachan-Ruales, E. A. (2024). Validación de una metodología de cuantificación de cafeína por cromatografía líquida (UHPLC/DAD). *Revista Peruana de Investigación Agropecuaria*, 3(1), e56. <https://doi.org/10.56926/repia.v3i1.56>

**Editor:** Dr. Fred William Chu Koo 

**Recibido:** 15/01/2024

**Aceptado:** 14/03/2024

**Publicado:** 20/04/2024

\*Juan Carlos Tuesta-Hidalgo - jtuesta@unaaa.du.pe (autor de correspondencia)



©Los autores. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional

## 1. INTRODUCCIÓN

El café, un bien agrícola de vital importancia, impulsa la economía de numerosos países, ocupando el segundo lugar en términos de comercio internacional después del petróleo (Andrade et al., 2009). En el contexto peruano, el café se erige como el octavo mayor productor a nivel mundial (Queirolo Bobadilla, 2011), desempeñando un papel crucial en la subsistencia de alrededor de 223 mil familias, cuya principal fuente de ingresos proviene de su cultivo en 11 regiones distintas (Del Aguila et al. 2018; MINAGRI, 2018)

Las plantaciones de café en Perú abarcan más de 420 mil hectáreas y suelen cultivarse en sistemas agroforestales o bajo sombra, contribuyendo así a la mitigación de los impactos del cambio climático al absorber carbono atmosférico (Ojeda et al., 2019). El café orgánico peruano supone el 10% de la producción mundial, siendo las variedades arábicas las de mayor difusión en el país (MINAGRI, 2015). En el año 2021 la producción de café se incrementó en un 17%, siendo las regiones con clima templado o tropical las que tuvieron mejor rendimiento, aportando en su conjunto el 71,1% de la producción total nacional (INEI, 2021).

Las variedades de café cultivadas en Perú exhiben cualidades distintivas en términos de color, aroma y sabor, válidos para la obtención de reconocimiento mundial frente a otras variedades. Estas cualidades singulares son el resultado de las condiciones edafoclimáticas del área de cultivo, así como de prácticas de manejo agronómico, densidad de siembra y otros factores (Castro et al., 2004). Estos elementos influyen en la concentración de los componentes que conforman el café, especialmente la cafeína.

En este sentido, la producción de café representa una importante fuente de ingresos para aproximadamente el 30% de la población en la región amazónica peruana (Valdivia, 2021). Una investigación previa, que empleó cromatografía líquida para cuantificar la concentración de cafeína en tres variedades de café cultivadas en la Amazonía, reveló que la variedad Caturra exhibió una concentración de 17,963 mg g<sup>-1</sup>, el Bourbonn 13,200 mg g<sup>-1</sup> y la Typica alcanzó 13,587 mg g<sup>-1</sup> (Félix Zamora, 2012).

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un compuesto alcaloide derivado natural de la xantina (Müller & Jacobson, 2011), la cual es altamente conocida debido a su constante presencia en la dieta humana, principalmente mediante el consumo de gaseosas, bebidas energizantes y café, siendo esta última, la mayor vía de obtención en varias personas (Mitchell et al., 2014). En respuesta a estos hallazgos, se han llevado a cabo diversos estudios con el objetivo de determinar los beneficios que el consumo de café puede aportar a la salud, incluyendo mejoras en el equilibrio energético (Harpaz et al., 2017), prevenir la fibrosis hepática (Chan et al., 2006) y disminución del riesgo de depresión (Kang et al., 2018).

Sin embargo, de manera afín existen investigaciones acerca de los efectos adversos en el consumo de cafeína en altas concentraciones, las cuales han concluido que ingerir menos de 400 mg por día no representa algún peligro para los adultos no gestantes, mientras que, para las mujeres gestantes, este límite se encuentra en 200 mg por día (EFSA NDA Panel, 2015), debido a la gran variedad de problemas que puede llegar a generar en el organismo humano, incluso llegando a causar la muerte

(Pardo Lozano et al., 2007). El café tostado en grano o molido debe cumplir, según el subcapítulo 6.2 de la NTP 209.028:2015 CAFÉ (INACAL, 2021), que el contenido de cafeína para café sin descafeinar debe tener como mínimo 1% m/m en base seca y para café descafeinado debe tener como máximo 0.1% m/m en base seca y una humedad de 4 % m/m como máximo. Es por esto que la determinación de cafeína en muestras de café es necesaria para conocer la cantidad ingerida por los consumidores.

Para ello, se han empleado diferentes métodos para el análisis cuantitativo de cafeína, tales como métodos espectroscópicos UV-Visible para su determinación en café verde (Navarra et al., 2017), métodos electroquímicos (Amare & Admassie, 2012) y HPLC para su determinación en café tostado e instantáneo (Belguidoum et al., 2014). El análisis HPLC es empleado en varios trabajos previos de determinación de cafeína en tabletas, bebidas energéticas, hojas de té y café (Acheampong et al., 2016; Gliszczynska-Świgło & Rybicka, 2015; Nishitani & Sagesaka, 2004; Pokhrel et al., 2016). La normativa peruana indica como método de ensayo la ISO 4052 (ISO, 1983) y la ISO 20481 (ISO, 2008), para la cuantificación de cafeína en diversas muestras, es decir, la cromatografía líquida HPLC. A su vez, existen diferentes métodos de extracción, debido a la presencia de componentes en el café capaces de generar interferencia al momento del análisis. Por ejemplo, existen métodos como la extracción líquido-líquido con diclorometano (Belay et al., 2008), extracción empleando fluidos supercríticos (Sugiyama et al., 1985), también mediante floculación con hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado y cloruro de zinc (Pizzariello et al., 1999), extracción usando soluciones acuosas de líquidos iónicos a base de colinio (Ferreira et al., 2021). La extracción con óxido de magnesio ofrece resultados similares a los anteriormente mencionados, pero empleando un menor tiempo (Khajeh et al., 2017).

Por lo mencionado anteriormente, el presente trabajo busca determinar la concentración de cafeína en diversas muestras de café de la región amazónica mediante el uso de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) utilizando la extracción con óxido de magnesio con asistencia de un digestor de microondas, y desarrollar un método para el análisis de rutina del contenido de cafeína en diversas muestras en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Alto Amazonas, utilizando el equipo implementado en el laboratorio (Cromatografía líquida UHPLC/DAD). Permite inferir y discutir sobre los resultados y sugerir medidas de prevención en el consumo de las muestras de café de interés.

## 2. MATERIALES Y METODOLOGÍA ANALÍTICA

### Preparación de reactivos y soluciones

Todos los reactivos usados en este trabajo de investigación son de grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura (18 M $\Omega$  a 25 °C). Cafeína anhidra (Sigma Aldrich, Reagent Plus), metanol (Merck, grado HPLC), óxido de magnesio (Sigma Aldrich, P.A.).

**Preparación de fase móvil y estándares:** La fase móvil se preparó mezclando Metanol grado HPLC y agua ultrapura en una proporción de 25:75 (v/v). Se homogeneizó la mezcla, se filtró (filtro de 0,45  $\mu$ m), requerido para HPLC, y se sonicó por 10 min.

Se preparó una solución estándar stock de cafeína a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , la cual se usó para obtener una curva de calibración cuyo rango lineal fue de  $10 - 50 \text{ mg L}^{-1}$  cuyo medio fue agua ultrapura y fase móvil (1:1, v/v).

**Muestras de café seleccionadas:** Se escogieron ocho muestras de café, la mayoría procedentes de diferentes localidades de la Amazonía peruana (Lamas, Tingo María, Chachapoyas y Oxapampa), además de Colombia y Ecuador.

### Equipo

El análisis cromatográfico se realizó usando el equipo HPLC Vanquish ThermoScientific (Alemania), compuesto por una bomba cuaternaria modelo VF-P20, un automuestreador VF-A10, un horno de columna VH-C10 y un detector de arreglo de diodos (DAD) VF-D11-A. Todos los módulos se controlaron con el software Xcalibur versión 4.2.47. Todas las separaciones fueron realizadas en una columna RP C18 (100 mm x 2,1 mm ID, 3  $\mu\text{m}$  partícula). Tanto la parte experimental como el análisis instrumental de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma del Alto Amazonas, 2022.

### Parámetros analíticos evaluados

**Linealidad:** La linealidad del método se evaluó mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cual fue calculado analizando la relación entre la concentración de cafeína y el área del pico correspondiente (Flores Ramos & Ruiz Soto, 2017).

**Exactitud:** La exactitud del método se reportó en forma de porcentaje de recuperación. Este permite medir la concordancia entre los valores obtenidos con los valores reales calculados de una muestra. Para ello, se realizó una fortificación de las muestras con una cantidad conocida de estándar de cafeína (Rada Mendoza & Salazar, 2011).

**Extracción de cafeína:** Se pesó 0,50 g de muestra de café con 5,0 g de óxido de magnesio. La cafeína fue extraída con 40 mL de agua ultrapura a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  dos veces (ISO 20481, 2008), luego fue sonicada durante 5 min y filtrada. El extracto se llevó a un volumen de 100 mL con agua ultrapura. Se diluyó 1:1 con fase móvil, se filtró con filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  y se colocaron en viales. Las muestras se trataron por triplicado.

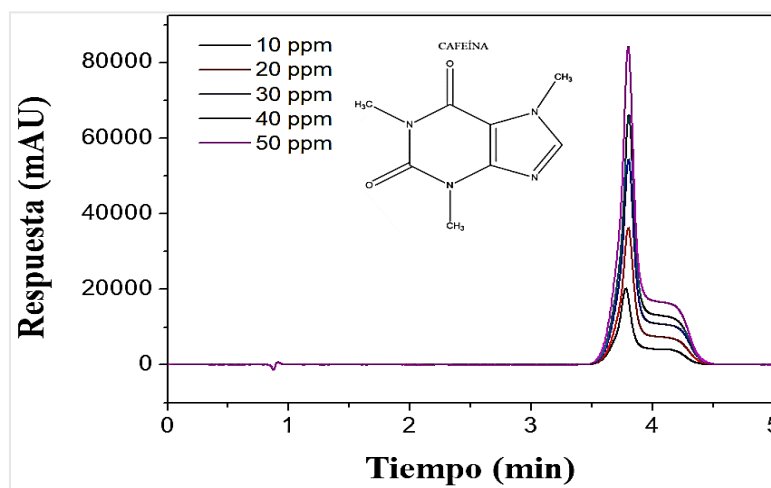
**Condiciones cromatográficas:** Las soluciones estándar y las muestras se inyectaron en el sistema UHPLC bajo las mismas condiciones. La fase móvil empleada fue metanol: agua ultrapura (25:75, v/v). Una temperatura de columna de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Un volumen de inyección de 2.5  $\mu\text{L}$ . Un flujo 0,3 de  $\text{mL min}^{-1}$ . La detección se dio a 274 nm (mayor absorbancia de la cafeína) y el tiempo de análisis fue de 5 min. Cada punto de la curva se inyectó por duplicado al sistema. Cada repetición de las muestras se inyectó por duplicado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

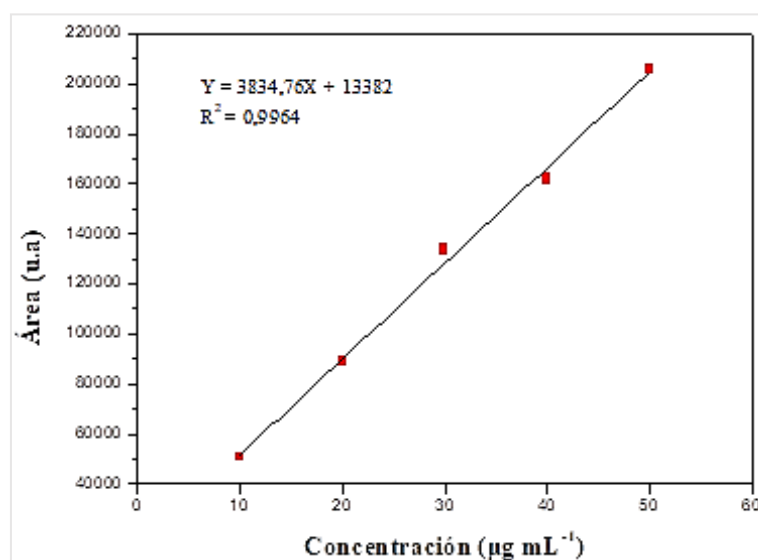
#### Evaluación de parámetros analíticos de validación

Los resultados obtenidos fueron evaluados en base a diversos parámetros estadísticos como el coeficiente de regresión y la desviación estándar.

**Linealidad:** Los estándares de cafeína presentaron un tiempo de retención de 3,7 min., como se ilustra en la Figura 1, donde se observan los cromatogramas de los estándares preparados de concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , los cuales a mayor concentración presentan una mayor área de pico. Así, se presentó una correlación lineal entre la concentración (10 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y el área de pico obteniendo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 0,9964, lo que se observa en la Figura 2. Otros parámetros medidos también se muestran en la Tabla 1.



**Figura 1.** Cromatogramas de los estándares de cafeína de concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El eje horizontal muestra el tiempo de retención en minutos, y el eje vertical muestra la respuesta en mili unidades de absorbancia



**Figura 2.** Curva de calibración de cafeína. El eje horizontal muestra la concentración de cafeína de la inyección ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), y el eje vertical muestra el área pico de los cromatogramas ( $n=10$ )

En la tabla 1 se muestran los parámetros de calidad evaluados a partir de la curva de calibración. En este sentido se ha demostrado una sensibilidad de 3834,76. El rango lineal de 10 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y una buena linealidad que corresponde a un  $R^2$  de 0,9964. Lo cual manifiesta una evaluación certera de cafeína en diferentes muestras en ese rango.

**Tabla 1.**

*Parámetros de ajuste lineal de curva de calibración*

Parámetros	Valor
Pendiente	3834,76 $\pm$ 81,67
Intercepto	13382 $\pm$ 2705,83
Rango lineal ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	10 - 50
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0,9964

**Límites de detección y cuantificación:** Los parámetros de LOD y LOQ fueron 0,68  $\pm$  0,19 y 2,07  $\pm$  0,57  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Exactitud:** Los ensayos de recuperación se llevaron a cabo agregando tres concentraciones (50, 100 y 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de estándares de cafeína a la muestra de café proveniente de Lamas (M1), los resultados se resumen en la Tabla 2.

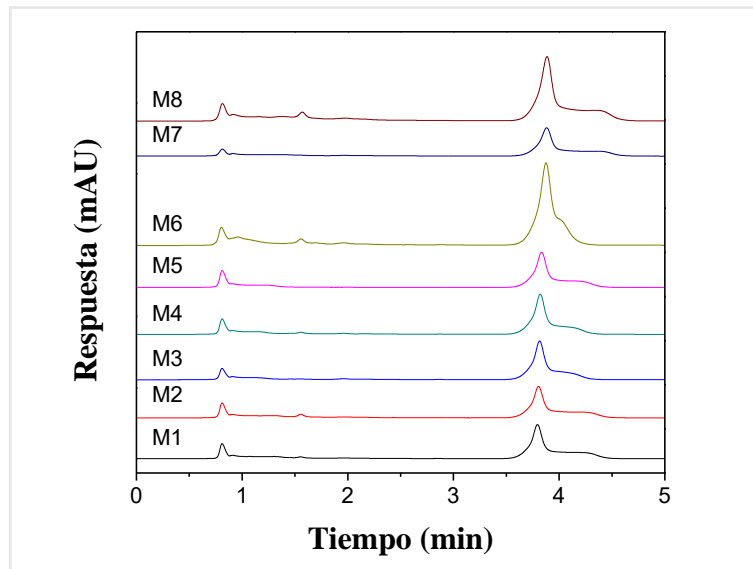
**Tabla 2.**

*Eficiencia de recuperación de cafeína en muestra de café proveniente de Lamas (M1)*

Medio	Concentración de cafeína fortificada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recuperación
M1	50	68,34 $\pm$ 2,60
	100	93,98 $\pm$ 8,19
	150	78,90 $\pm$ 0,11

De todas las muestras de café estudiadas, las de presentación tostadas molidas, cáscara de café M5 (Oxapampa) y M7 (Colombia) necesitarían un promedio mayor a 4 tazas para exceder el límite de cafeína establecido por la EFSA en una persona adulta (400 mg) y de 2 tazas para el caso de mujeres gestantes (200 mg); mientras que las muestras M6 y M8 excederían estos límites con 2 y 1 tazas para el caso de adultos y mujeres gestantes, respectivamente. Estos resultados son considerando un contenido en una taza de café de 9 g por 35 mL de agua en su preparación, cantidades que fueron establecidas por la Asociación de Cafés Especiales (SCA) (Fasman, 2018).

**Cuantificación de las muestras:** La cuantificación se basó en el método de estándar externo utilizando curvas de calibración ajustadas por análisis de regresión lineal. El análisis se realizó con 3 repeticiones e inyección por triplicado. Como se observa en la Figura 3, el tiempo de retención de la cafeína en las muestras de café fue de 3,61 min.



**Figura 3.** Cromatogramas de los extractos de las muestras de café. El eje horizontal muestra el tiempo de retención en minutos, y el eje vertical muestra la respuesta en mili unidades de absorbancia

En la Tabla 3 se presentan los resultados del contenido de cafeína mediante cromatografía UHPLC de las 8 muestras de café en tres presentaciones: café tostado molido con una cantidad de cafeína entre 9,74 y 11,2 mg de cafeína por cada gramo de café, el cual considerando una humedad del 4% equivale a 1,014 a 1,167% m/m en base seca. La mayor cantidad de mg de cafeína, en este tipo de café, correspondió a la muestra M4 (Oxapampa-Perú) con 11,12 mg g<sup>-1</sup> lo que se significaría contar con 35,97 g de este café para obtener 400 mg de cafeína por día, puesto que esto representa el límite de consumo tolerable, siendo similar a lo obtenido en la M5 (Oxapampa-Perú), en la presentación de cáscara de café.

En las muestras solubles liofilizadas, el contenido de cafeína varía entre 9,17 y 26,59 mg de cafeína por gramo de café, es decir 0,955 a 2,770% m/m en base seca. La mayor cantidad de mg de cafeína se obtuvo en la muestra M6 (Ecuador) con 26,59 mg g<sup>-1</sup>, lo que representaría contar con 15,04 g de café para obtener el límite permisible de consumo por día; sin embargo, en el café liofilizado de procedencia peruana (M8), evidenció un alto contenido de cafeína con 23,40 mg g<sup>-1</sup>, para este caso se necesitaría contar con 17,09 g de café por día. El café soluble liofilizado procedente de Colombia es el único que no cumple con el contenido de cafeína según la NTP 209.028.2015 (INACAL, 2021).

De acuerdo a estos resultados, se concuerda con los estudios publicados previamente por EFSA NDA Panel (2015), que las cantidades promedio de consumo de las muestras de café analizadas deben ser menores de 400 mg por día para los adultos mayores y 200 mg por día para las mujeres gestantes, proporciones que se consideran los límites saludables.

**Tabla 3.***Presentación, origen de muestras de café analizadas y su contenido de cafeína (mg g<sup>-1</sup>)*

Muestra	Presentación	Origen	Cafeína (mg g <sup>-1</sup> )	RSD (%)
M1	Tostado molido	Lamas-Perú	10,81 ± 0,01	0,068
M2	Tostado molido	Tingo María-Perú	9,74 ± 0,16	1,600
M3	Tostado molido	Chachapoyas-Perú	10,79 ± 0,13	1,241
M4	Tostado molido	Oxapampa-Perú	11,12 ± 0,45	4,060
M5	Cáscara de café	Oxapampa-Perú	11,08 ± 0,23	2,113
M6	Soluble liofilizado	Ecuador	26,59 ± 3,06	11,521
M7	Soluble liofilizado	Colombia	9,17 ± 0,31	3,353
M8	Soluble liofilizado	Perú	23,40 ± 0,37	1,575

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, hemos visto cómo llevar a cabo la determinación analítica de cafeína en café empleando la técnica de HPLC en el rango lineal de 10 a 50 µg mL<sup>-1</sup> con buena linealidad (R<sup>2</sup> de 0,9964), LOD y LOQ fueron 0,68 ± 0,19 y 2,07 ± 0,57 µg mL<sup>-1</sup> y buena exactitud (80,4% recuperación promedio) lo cual nos permitirá usar este método para la caracterización de las muestras de café de la zona, evaluar la calidad referente a la cafeína y sugerir el consumo de café adecuado para ingerir la cantidad de cafeína óptima que no ponga en riesgo la salud en especial de las mujeres gestantes y adultos mayores.

Los resultados dan a conocer cuáles de las muestras de café analizadas, cumplen con la norma técnica peruana respecto a la cafeína (mínimo 1% m/m en base seca) y cuales no cumplen ni la norma peruana ni la colombiana (0,955% m/m en base seca).

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán a futuro poder hacer un control de calidad del café de la zona a través de un método validado, con figuras mérito adecuadas y de fácil y rápida aplicación. Por lo tanto, se sugiere implementar el método de extracción y la metodología de análisis al Laboratorio de Biotecnología, para análisis de rutina de cafeína en diversas muestras, utilizando el equipo implementado en el laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de Alto Amazonas (Cromatografía líquida UHPLC/DAD).

## FINANCIAMIENTO

Investigación financiada por la Universidad Nacional Autónoma de Alto Amazonas mediante Resolución de Comisión Organizadora N° 205-2022-UNAAA/CO.

## CONFLICTO DE INTERESES

No existe ningún tipo de conflicto de interés relacionado con la materia del trabajo.

## CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Conceptualización: Tuesta-Hidalgo, O. A.



Curación de datos: Fermin-Vega, B. J., Morante-Alanya, G. y Nureña-Hidalgo, M. A.

Análisis formal: Tuesta Hidalgo, O. A.

Investigación: Todos los autores.

Metodología: Rodríguez-Hamamura, N.

Supervisión: Tuesta-Hidalgo, J. C. y Barbachan-Ruales, E. A.

Redacción-borrador original: Tuesta-Hidalgo, O. A., Tuesta-Hidalgo, J. C. y Fermin-Vega, B. J.

Redacción-revisión y edición: Todos los autores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acheampong, A., Gyasi, W. O., Darko, G., Apau, J., & Addai-Arhin, S. (2016). Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate, paracetamol, and caffeine in tablet formulation. *SpringerPlus*, *5*(1), 625. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2241-2>
- Amare, M., & Admassie, S. (2012). Polymer-modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee. *Talanta*, *93*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.058>
- Andrade, S. A. L., Mazzafera, P., Schiavinato, M. A., & Silveira, A. P. D. (2009). Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *The Journal of Agricultural Science*, *147*(2), 105–115. <https://doi.org/10.1017/S0021859608008344>
- Belay, A., Ture, K., Redi, M., & Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, *108*(1), 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.024>
- Belguidoum, K., Amira-Guebailia, H., Boulmouk, Y., & Houache, O. (2014). HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *45*(4), 1314–1320. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.03.014>
- Castro, P., Contreras, Y., Laca, D., & Nakamatsu, K. (2004). Café de especialidad: alternativa para el sector cafetalero peruano. *Cuadernos de difusión*, *9*(17), 61–84. <https://doi.org/10.46631/jefas.2004.v9n17.05>
- Chan, E. S. L., Montesinos, M. C., Fernandez, P., Desai, A., Delano, D. L., Yee, H., Reiss, A. B., Pillinger, M. H., Chen, J., Schwarzschild, M. A., Friedman, S. L., & Cronstein, B. N. (2006). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *British Journal of Pharmacology*, *148*(8), 1144–1155. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706812>
- Del Aguila, K. M., Vallejos-Torres, G., Arévalo, L. A., & Becerra, A. G. (2018). Inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares en *Coffea arabica*, variedad Caturra en la Región San Martín. *Información tecnológica*, *29*(1), 137–146. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000100137>

- EFSA NDA Panel. (2015). Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal*, 13(5).  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4102>
- Fasman, D. (2018). *Defining the Ever-Changing Espresso - 25 Magazine: Issue 3. 3.*
- Félix Zamora, M. del R. (2012). *Determinación de ácidos clorogénico y cafeico, cafeína, polifenoles totales y actividad antioxidante de tres variedades de café (Coffea arabica L.)* [Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <https://hdl.handle.net/20.500.14292/282>
- Ferreira, A. M., Gomes, H. M. D., Coutinho, J. A. P., & Freire, M. G. (2021). Valorization of spent coffee by caffeine extraction using aqueous solutions of Cholinium-based ionic liquids. *Sustainability*, 13(13), 7509. <https://doi.org/10.3390/su13137509>
- Flores Ramos, L., & Ruiz Soto, A. (2017). Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 371–381.
- Gliszczyńska-Świgło, A., & Rybicka, I. (2015). Simultaneous determination of caffeine and water-soluble vitamins in energy drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods*, 8(1), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9880-0>
- Harpaz, E., Tamir, S., Weinstein, A., & Weinstein, Y. (2017). The effect of caffeine on energy balance. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0090>
- INACAL. (2021). *Guía de Implementación de la Norma Técnica Peruana NTP 209.028:2015 CAFÉ. Café tostado en grano o molido. Requisitos* (1a ed.).
- INEI. (2021). *Producción de café se incrementó 17,0% en julio de 2021*. Plataforma del Estado Peruano. <https://www.gob.pe/institucion/inei/noticias/534808-produccion-de-cafe-se-incremento-17-0-en-julio-de-2021>
- ISO. (1983). *ISO 4052: Coffee - Determination of caffeine content (Reference method)*.  
<https://www.iso.org/standard/9756.html>
- ISO. (2008). *ISO 20481: Coffee and coffee products - Determination of the caffeine content using high performance liquid chromatography (HPLC)*. <https://www.iso.org/standard/34185.html>
- Kang, D., Kim, Y., & Je, Y. (2018). Non-alcoholic beverage consumption and risk of depression: epidemiological evidence from observational studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(11), 1506–1516. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0121-2>
- Khajeh, M., Fard, S., Bohlooli, M., Ghaffari-Moghaddam, M., & Khatibi, A. (2017). Extraction of caffeine and gallic acid from coffee by electrokinetic methods coupled with a hollow-fiber membrane. *Journal of Food Process Engineering*, 40(6). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12565>
- MINAGRI. (2015). *Cafés especiales en el Perú*. Plataforma del Estado Peruano.  
<https://www.midagri.gob.pe/portal/24-sector-agrario/cafe/204-cafes-especiales-en-el-peru>
- MINAGRI. (2018). *Plan Nacional de Acción de Café Peruano 2018 – 2030 - Una Propuesta de Política para una Caficultura moderna, competitiva y sostenible*. Ministerio de Agricultura y

Riego. <http://repositorio.minagri.gob.pe:80/jspui/handle/MINAGRI/386>

- Mitchell, D. C., Knight, C. A., Hockenberry, J., Teplansky, R., & Hartman, T. J. (2014). Beverage caffeine intakes in the U.S. *Food and Chemical Toxicology*, *63*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.042>
- Müller, C. E., & Jacobson, K. A. (2011). Xanthines as Adenosine receptor antagonists. En *Methylxanthines* (pp. 151–199). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_6)
- Navarra, G., Moschetti, M., Guarrasi, V., Mangione, M. R., Militello, V., & Leone, M. (2017). Simultaneous determination of caffeine and chlorogenic acids in green coffee by UV/Vis Spectroscopy. *Journal of Chemistry*, *2017*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/6435086>
- Nishitani, E., & Sagesaka, Y. M. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine, and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, *17*(5), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.009>
- Ojeda, W., Borjas, R., Alvarado, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2019). Effects of foliar extracts of guaba (*Inga edulis*) and cadaghi (*Corymbia torrelliana*) on coffee (*Coffea arabica* 'Caturra Roja') under nursery conditions in Chanchamayo, Peru. *Peruvian Journal of Agronomy*, *3*(2), 68. <https://doi.org/10.21704/pja.v3i2.1316>
- Pardo Lozano, R., Alvarez García, Y., Barral Tafalla, D., & Farré Albaladejo, M. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, *19*(3), 225. <https://doi.org/10.20882/adicciones.303>
- Pizzariello, A., Vorc, J., Stredansky, M., & Miertu, S. (1999). A biosensing method for detection of caffeine in coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(8), 1136–1140. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1136::AID-JSFA337>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1136::AID-JSFA337>3.0.CO;2-4)
- Pokhrel, P., Shrestha, S., Rijal, S. K., & Rai, K. P. (2016). A simple HPLC method for the determination of caffeine content in tea and coffee. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, *9*, 74–78. <https://doi.org/10.3126/jfstn.v9i0.16200>
- Queirolo Bobadilla, C. (2011). *Promoción del consumo interno del café en el Perú: lineamientos de estrategia* [Pontificia Universidad Católica del Perú]. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/1038>
- Rada Mendoza, M., & Salazar, M. (2011). La luctuosa, indicador de tratamiento térmico en leches enriquecidas comerciales colombianas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *9*(2). <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/775>
- Sugiyama, K., Saito, M., Hondo, T., & Senda, M. (1985). New double-stage separation analysis method. *Journal of Chromatography A*, *332*, 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83289-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83289-1)
- Valdivia, M. (2021). *¿El café o los bosques?* El Peruano.