

8
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Química

**Extracción y evaluación del ácido
clorogénico del café como un
antioxidante natural.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

Alejandra Cervantes Sánchez Bilbao



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

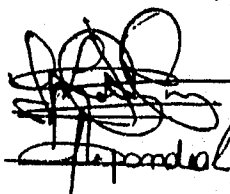
JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

Presidente Profesora Francisca Aida Iturbe Chiñas
Vocal Profesor Hugo Ruben Carreño Ortiz
Secretario Profesor Felipe Rodriguez Palacios
1er Suplente Profesor Miguel Angel Hidalgo Torres
2do Suplente Profesora Sandra Pérez Munguía

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio de Química en Alimentos 4A
Facultad de Química
UNAM

Asesor: QFB Felipe Rodriguez Palacios
Sustentante Alejandra Cervantes Sánchez Bilbao



AGRADECIMIENTOS.

**A mi Padre, por enseñarme lo que es vida,
superación y lucha.**

**A mi Madre, que por su fortaleza y amor
he logrado salir adelante.**

**A mis Hermanos, por ser mis mejores amigos
y compañeros.**

**A Jorge, por caminar a mi lado en todo momento
de mi vida.**

**A mis Amigos y Amigas, Yohani, Myriam, Ana, Karin, Mer, Mari, Caro,
Cynthia, Wüicha y a toda la Generación 92-96, por aquel granito de arena
que han puesto en mi vida.**

A Miss Alpha, por darme la oportunidad de tener los mejores años de mi vida.

A cada uno de mis profesores, por poner algo de su vida para que hoy sea lo que soy.

A la familia Zarur, por quererme y apoyarme en todos estos años.

A Felipe, quien hizo posible la realización de esta investigación.

INDICE

1. Resumen
2. Objetivos
3. Introducción
4. Antecedentes:
 - 4.1 Definición y Clasificación de Lípidos
 - 4.2 Química de grasas y aceites
 - 4.3 Deterioro de lípidos
 - 4.3.1 *Rancidez hidrolítica o lipólisis*
 - 4.3.2 *Rancidez oxidativa o autooxidación*
 - 4.4 Determinación de la intensidad de oxidación
 - 4.4.1 *Evaluación sensorial*
 - 4.4.2 *Métodos Químicos*
 - 4.4.2.1 *Índice de peróxidos*
 - 4.4.2.2 *Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)*
 - 4.4.3 *Métodos Físicos*
 - 4.4.3.1 *Espectroscopia infrarroja*
 - 4.4.3.2 *Polarografía*
 - 4.4.3.3 *Cromatografía de gases*
 - 4.5 Antioxidantes
 - 4.5.1 *Antioxidantes artificiales*
 - 4.5.1.1 *Butilhidroxianisol (BHA)*
 - 4.5.1.2 *Butilhidroxitolueno (BHT)*
 - 4.5.1.3 *2,5-Diterbutilhidroquinona (TBHQ)*
 - 4.5.2 *Antioxidantes naturales*
 - 4.5.2.1 *Aminoácidos y proteínas*

- 4.5.2.2 *Tocoferoles*
- 4.5.2.3 *Ácido ascórbico*
- 4.5.2.4 *Compuestos Fenólicos*
- 4.5.3 *Mecanismo de acción de los antioxidantes*
- 4.6 *Legislación gubernamental para el uso de antioxidantes en alimentos*
- 4.7 *Ácido Clorogénico*
 - 4.7.1 *Propiedades físico-químicas*
 - 4.7.2 *toxicidad*
- 4.8 *El café*
 - 4.8.1 *Generalidades*
 - 4.8.2 *Composición del grano de café*
 - 4.8.3 *Características del café*
 - 4.8.4 *Obtención del grano*
- 5 *Desarrollo experimental***
 - 5.1 *Extracciones*
 - 5.1.1 *Extracción de los compuestos solubles del café*
 - 5.1.2 *Extracción del ácido clorogénico*
 - 5.2 *Evaluación experimental de la capacidad antioxidante del ácido clorogénico.*
- 6. *Resultados y Discusión***
 - 6.1 *Extracción del Ácido clorogénico del café*
 - 6.1.1 *Comparación del ácido clorogénico extraído vs un estándar de ácido clorogénico*
 - 6.1.2 *Rendimiento*
 - 6.1.2.1 *Rendimiento de la molienda*
 - 6.1.2.2 *Rendimiento de la extracción*

6.1.2.3 Rendimiento experimental de la extracción del
ácido clorogénico

6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante del ácido
clorogénico

6.2.1 Índice de peróxidos vs Tiempo

6.2.2 Substancias reactantes con TBA vs Tiempo

7. Conclusiones y Recomendaciones

8. Bibliografía

1. Resumen.

El ácido clorogénico es uno de los componentes del café cuya concentración es mayor en el grano sin tostar. En su estructura química se encuentra un grupo fenólico, dichos grupos poseen poder antioxidante con lo que se disminuye la probabilidad de rancidez, y así aumentar la vida de anaquel de los alimentos con alto contenido en grasa. El interés en éste trabajo es el de obtener el ácido clorogénico a partir del grano verde de café, y comprobar dicha actividad sobre aceites. La extracción se probó con agua caliente, purificando con cloroformo y acetato de etilo. En cada paso se realizó cromatografía en capa fina y espectrofotometría ultravioleta para verificar la presencia del compuesto en estudio. La actividad del ácido clorogénico extraído se comparó con antioxidantes como el BHT, BHA y ácido clorogénico comercial. Obteniendo como resultado un extracto con alto contenido de ácido clorogénico y demostrando su efecto antioxidante sobre aceite esencial de naranja.

2. Objetivos.

El presente trabajo tiene como finalidad desarrollar un método de extracción y purificación del ácido clorogénico, presente en el grano verde de café, así como evaluar su posible actividad como antioxidante.

3. Introducción.

La conservación de los productos alimenticios es una preocupación del hombre desde tiempos muy remotos, los alimentos con alto contenido en grasas, están sujetos a diferentes tipos de oxidaciones que ocurren en forma simultánea. La cual inicia desde el momento que el lípido es extraído de la célula animal o vegetal de la que proviene, y la velocidad de rancidez depende de las condiciones bajo las cuales se encuentra el alimento como son: temperatura, oxígeno, luz, humedad, presencia de catalizadores y estructuras químicas de los lípidos constituyentes.

El problema de la oxidación de los lípidos es un aspecto importante en la conservación de alimentos, especialmente cuando los productos oxidados traen consigo un olor o sabor desagradable.

El sabor inherente a productos de oxidación puede estar por debajo de una ppm, y las pérdidas económicas pueden ser considerables debido a la acumulación de estas sustancias no deseadas. Por lo que se utilizan diferentes tipos de antioxidante con el propósito de retardar ó prevenir este proceso.

Los antioxidantes usados comúnmente son sintéticos, y la posibilidad de sus efectos toxicológicos ha sido tema de estudio en los últimos años, despertando así el interés de preparar antioxidantes naturales mediante una extracción, purificación y fraccionación. Ciertamente, no hay una confianza absoluta de que una fracción o un compuesto aislado de un alimento natural sea seguro; sin embargo, sí se tienen seguridad de que un antioxidante obtenido de esta manera es un compuesto natural de un alimento que ha sido consumido por miles de años y no un compuesto sintético.(1)

La importancia de esta investigación reside en dos puntos principalmente:

El primero de ellos, es que se ha demostrado que el ácido caféico, presente en varias semillas oleaginosas tienen un poder antioxidante; este ácido se encuentra también en el grano tostado de café, el cual, en este caso es producto de la hidrólisis ácida que sufre el ácido clorogénico durante el proceso de tostado; por lo que suponemos, que este último puede presentar un mayor poder antioxidante, ya que cuenta con una estructura fenólica más. El segundo punto es el de darle otro enfoque tecnológico y económico al café con el fin de utilizar los excedentes que existen de éste.

4. Antecedentes

4.1 Definición y clasificación de Lípidos.

La palabra lípido proviene del griego *lipos*. Es un grupo de compuestos generalmente constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque en ocasiones también contienen fósforo y nitrógeno, existen varias definiciones sobre la naturaleza de los lípidos, pero la más antigua es la que se da por su solubilidad; definiéndolos como "Sustancias insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos".

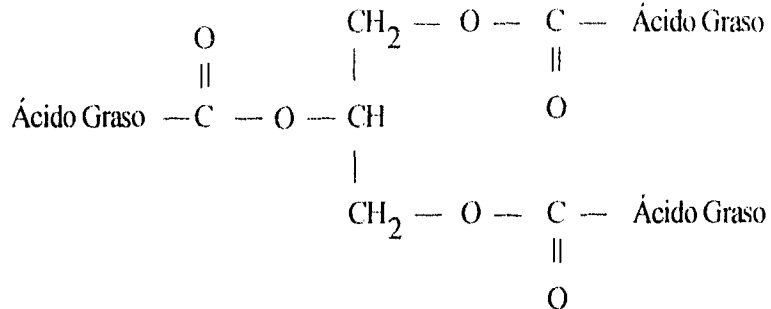
Los lípidos desempeñan importantes y diferentes actividades biológicas; tales como partes estructurales de membranas celulares y de los sistemas de transporte de diversos nutrimentos, otros son vitaminas, pigmentos y hormonas, también actúan como aislantes naturales en el hombre y en animales, además de ser una importante fuente de energía ya que son capaces de proporcionar el doble de las calorías que se obtienen a partir de los carbohidratos o las proteínas.

Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos, contribuyendo a la textura y en general a las propiedades sensoriales del producto. La principal diferencia genérica que existe entre los aceites y las grasas, es que las primeras son líquidas a temperatura ambiente, mientras que las grasas son sólidas en las mismas condiciones. Esta distinción es muy relativa, ya que la temperatura ambiente dependerá de la zona en que se encuentren. Generalmente, los aceites son de origen vegetal, mientras que las grasas son de origen animal. (2,3)

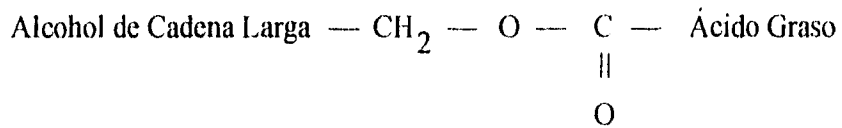
En forma general los lípidos se clasifican en: (4)

1. *Lípidos simples*: ésteres de ácidos grasos y alcoholes

- Grasas y aceites: ésteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos.

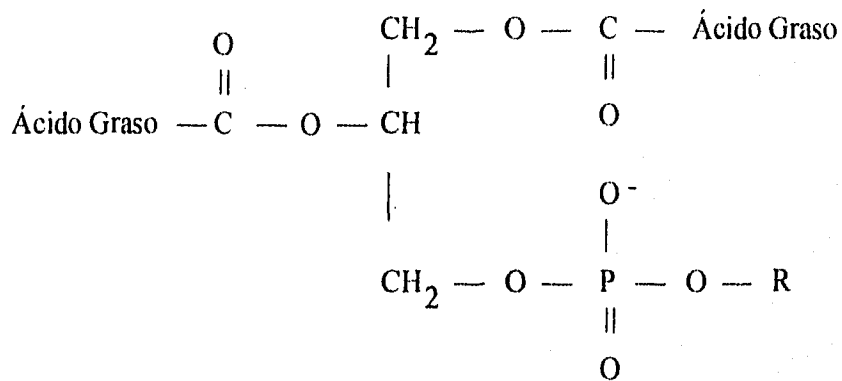


- Ceras: ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.



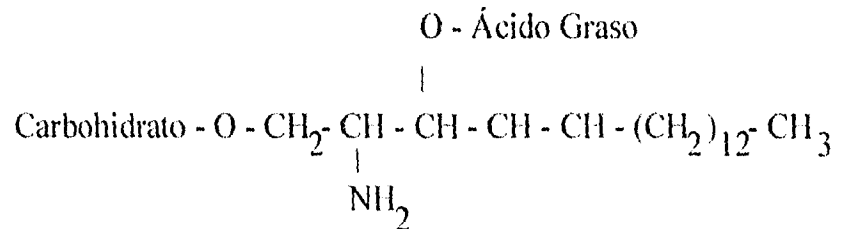
2. *Lípidos compuestos*: lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas

- Fosfolípidos: ésteres que contienen ácido fosfórico en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno.

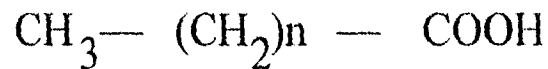


R = colina, lecitina, serina, inositol

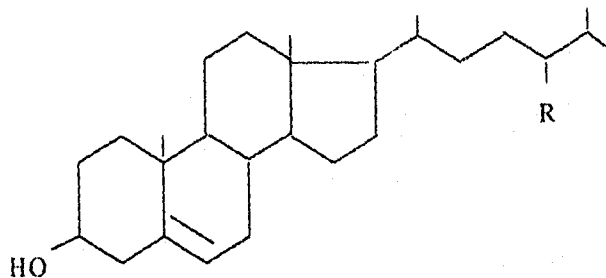
- Glicolípidos: compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosina pero no contienen ácido fosfórico, también llamados cerebrosidos.



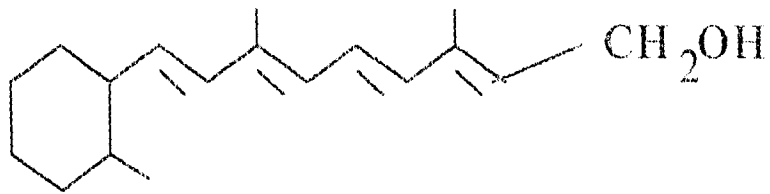
- Lipoproteína: compuestos de lípidos y proteínas.
- 3. *Lípidos derivados*: Substancias derivadas de los lípidos simples o de compuestos pero con propiedades generalmente de lípidos.
- Ácidos grasos.



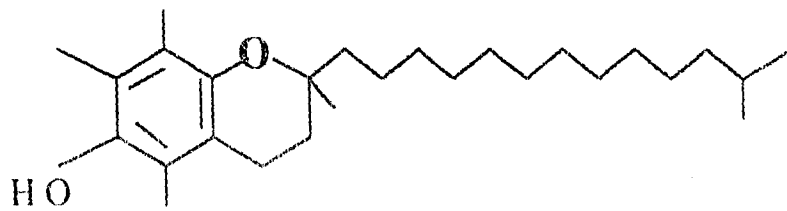
- Esteroles.



- Vitaminas liposolubles.

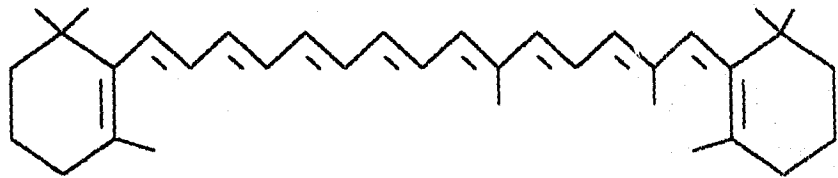


Vitamina A



Vitamina E

- Pigmentos: los carotenoides son los típicos representantes de los pigmentos liposolubles.



4.2 Química de grasas y aceites.

Como se indicó, las grasas y los aceites constituyen los lípidos más abundantes e importantes en el estudio de los alimentos; ambos grupos están constituidos por prácticamente un 100% de Triglicéridos, los que a su vez son ésteres de ácidos grasos con glicerol. La concentración, la longitud de la cadena de las moléculas, del grado de insaturación, del isomerismo geométrico en los ácidos grasos insaturados y de la posición de la doble ligadura respecto al grupo carboxilo, dan lugar a las diferentes características físicas y químicas de las grasas y de los aceites.

Tradicionalmente, los ácidos grasos se definieron como ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con número par de átomos de carbono, (de 4 a 24) que podían ser saturados o insaturados, sin embargo se han identificado ácidos ramificados, cíclicos, hidroxilados con número non de átomos de carbono, etc., de tal manera que en la actualidad se conocen más de 400 localizados en los tejidos animales y vegetales, así como en ciertos microorganismos, pero por la baja concentración de algunos de ellos no toman importancia en las características de los productos que los contienen, por lo que su número se reduce considerablemente, resaltando por su importancia 14 que se dividen en ácidos grasos saturados e insaturados; los cuales generalmente se encuentran esterificados integrando los triacilglicéridos y cuando se llegan a encontrar en estado libre es por una posible hidrólisis del enlace éster, los que se muestran en la Tabla 1.

4.3 Deterioro de Lípidos.

El término rancidez se utiliza para describir los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos, las grasas y los aceites, produciendo compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables, además de una reducción en el valor nutritivo del alimento,

esto se debe, a que el enlace éster de los acilgliceridos es susceptible a la hidrólisis química o enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación. Este deterioro se ha dividido en tres grupos de reacciones.

4.3.1 Rancidez hidrolítica o Lipólisis.

La degradación lipídica se debe a la acción de enzimas lipolíticas, lipasas y a la presencia de altas temperaturas y de catalizadores, así como al tipo de ácidos grasos, distribución y geometría de las dobles ligaduras y de la concentración de agua; sobre los enlaces ésteres de los triacilgliceridos de las grasas, liberando así, ácidos grasos y glicerol que se caracterizan por producir un sabor "jabonoso". Es muy notable en alimentos que contienen altas concentraciones de ácidos volátiles de cadena corta (C4 - C12) como los productos lácteos. Sin embargo, en alimentos con ácidos grasos con cadena larga, (que son la mayoría de las grasas y aceites de la industria alimentaria), no se percibe la rancidez hidrolítica aún cuando exista actividad de las enzimas.

A diferencia de otras reacciones enzimáticas, la lipólisis se puede efectuar en condiciones de actividad acuosa muy baja, como la que prevalece en la harina de trigo; esto se debe a que, si los triacilglicéridos están en estado líquido, tienen una gran movilidad y se puede así favorecer el contacto con la lipasa y provocar la reacción. (2,5)

Ácidos grasos saturados (1)

<i>Nombre trivial</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Formula</i>
Butírico	Butanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
Caproico	Hexanoico	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
Caprílico	Octanoico	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH
Láurico	Dodecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
Mirístico	Tetradecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
Palmítico	Hexadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
Estéarico	Octadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
Araquídico	Eicosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH

Ácidos grasos insaturados (1)

<i>Nombre trivial</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Formula</i>
Palmitoleico	Hexadeca-9-enoico	C ₁₅ H ₂₉ COOH
Oleico	Octadeca-9-enoico	C ₁₇ H ₃₃ COOH
Linoleico	Octadeca-9:12-dienoico	C ₁₇ H ₃₁ COOH
Linolénico	Octadeca-9:12:15-trienoico	C ₁₇ H ₂₉ COOH
Araquidónico	Eicosa-5:8:11:14-tetraenoico	C ₁₉ H ₃₁ COOH
Vaccenoico	Octadeca-11-enoico	C ₁₇ H ₃₂ COOH

Tabla 1. Principales Ácidos Grasos.

4.3.2 Rancidez oxidativa o Autooxidación.

Las reacciones de oxidación de los lípidos se dividen en dos grupos principales (2):

- Acción directa del oxígeno sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados (autooxidación).
- Acción enzimática de las lipoxigenasa y del alcohol deshidrogenasa (2).

Autooxidación.

A su vez las reacciones de autooxidación se han dividido en dos (3).

- La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que dan productos polimerizados; y
- La oxidación de los ácidos grasos moderadamente insaturados que producen compuestos volátiles impartiendo olores y sabores desagradables.

La Autooxidación es una de las transformaciones más comunes de los alimentos que contienen grasas y otras sustancias insaturadas, recibe este nombre ya que es un mecanismo que genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran la reacción. En la autooxidación, los primeros productos son inodoros e insípidos; a temperaturas más elevadas y/o a niveles más altos de oxidación, se puede presentar diversos compuestos que imparten sabores y olores desagradables. (3, 5).

Los compuestos que se producen, la intensidad, así como la forma de oxidación, dependen en gran parte, de las condiciones de oxidación tales como temperatura, presencia de catalizadores como son el hierro y el cobre, estado de dispersión de la grasa, tipo de ácidos grasos presentes, distribución de dobles ligaduras, concentraciones de oxígeno disponible, presencia de peróxidos provenientes de grasas oxidadas, oxidación de sulfitos, al igual que el agua disponible de cada el alimento (2, 3, 5).

Se puede observar que son varios los factores que ayudan a que se lleve a cabo esta reacción autocatalítica, y que en combinación tienen un efecto intenso. Se conoce que su mecanismo es de forma de cadena, es decir la degradación de los lípidos no se puede detener una vez iniciada, que funciona a través de la reducción de radicales libres y que tiene un gran número de derroteros; sin embargo para efectos didácticos se considera que se lleva a cabo esencialmente en tres etapas: iniciación, propagación y terminación, de acuerdo con el cuadro 1 (2, 3).

Iniciación	RH	⇌	R· + H·	RADICAL LIBRE
Propagación	R· + O ₂	⇌	ROO·	RADICAL HIDROPEROXIDO
Terminación	ROO· + RH	⇌	R· + ROOH	HIDROPEROXIDO
	R· + R·	⇌	RR	COMPUESTO ESTABLE
	R· + ROO·	⇌	ROOR	
	ROO· + ROOR·	⇌	ROOR + O ₂	
	2RO· + 2ROO·	⇌	2ROOR + O ₂	

Cuadro 1. Mecanismo de oxidación de Lípidos.

Iniciación: Durante esta etapa, se sustrae uno de los átomos de hidrógeno adyacente a la doble ligadura (fig. 1), formándose un radical libre al cual el oxígeno se puede unir fácilmente.

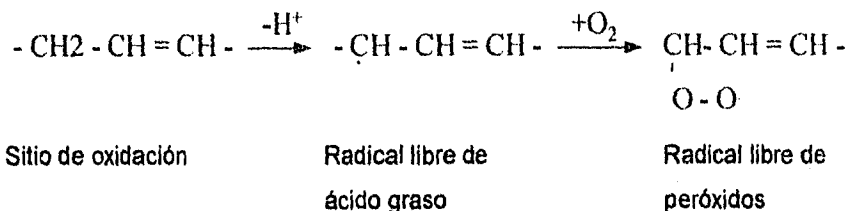


Fig. 1. Reacción de iniciación.

La reacción de iniciación es catalizada principalmente por la presencia de metales, oxígeno, luz, y temperatura, aunque cuando el oxígeno tiene una configuración electrónica de singulete, puede unirse directamente al ácido insaturado sin la previa formación de radicales libres; produciéndose así los correspondientes hidroperóxidos.

Propagación: El radical hidroperóxido reacciona con nuevos ácidos grasos, formando más radicales libres con lo cual se propaga la reacción (fig. 2).

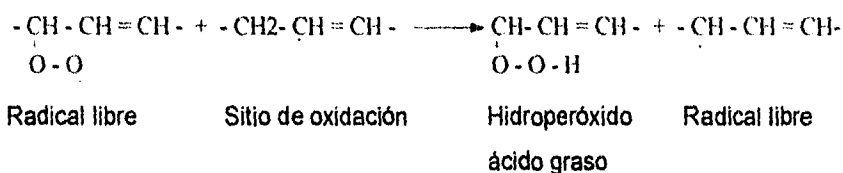


Fig. 2. Reacción de propagación.

Terminación: Se da a través de reacciones de condensación de los radicales libres dando lugar a compuestos muy estables.

Las reacciones de descomposición de los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación producen diferentes compuestos como peróxidos, aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, polímeros y cetoglicéridos; algunos de los cuales, son los responsables de las propiedades sensoriales de las grasas oxidadas. Fig. 3, (1, 2). Además de su descomposición los peróxidos tienen la capacidad de interaccionar con otros constituyentes de los alimentos como proteínas y pigmentos reduciendo así su valor nutricional (2).

HIDROPERÓXIDOS

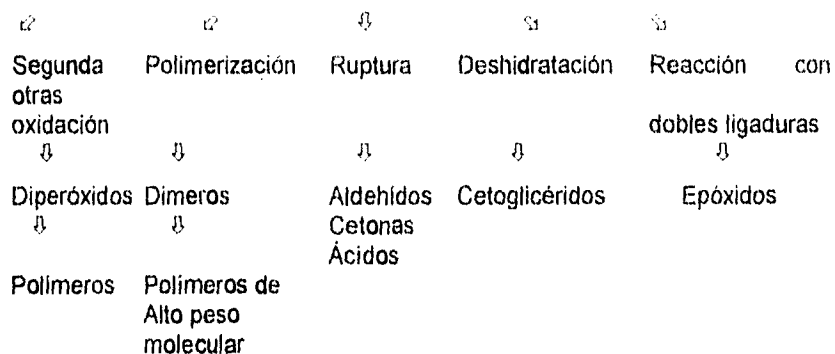


Fig. 3. *Substancias producidas a partir de hidroperóxidos.*

Debido a que varían el número y la concentración de los ácidos grasos que pueden contener las grasas, resulta muy difícil estudiar su oxidación en conjunto, por lo cual se emplean sistemas modelo de un solo ácido graso. Por ejemplo en la fig. 4 se muestra el mecanismo de oxidación del ácido linoléico. Siendo el metileno del grupo 1-4 pentadieno (del carbón 11) el que presenta sus dos hidrógenos altamente activados por la influencia de los dos dobles enlaces adyacentes; esto hace que la energía de un fotón sea suficiente para producir un radical (R·) al actuar sobre uno de los hidrógenos. Debido a su distribución electrónica inestable (I), se transforma rápidamente en dos híbridos de resonancia conjugados más estables (II) y (III) en equilibrio que, en presencia de oxígeno, genera los correspondientes radicales hidroperóxidos (ROO· ; IV y V); finalmente, estos últimos pueden interactuar con un ácido graso insaturado (RH) y producir dos hidroperóxidos (ROOH; IV y VII), y además regenerar el radical (R·).

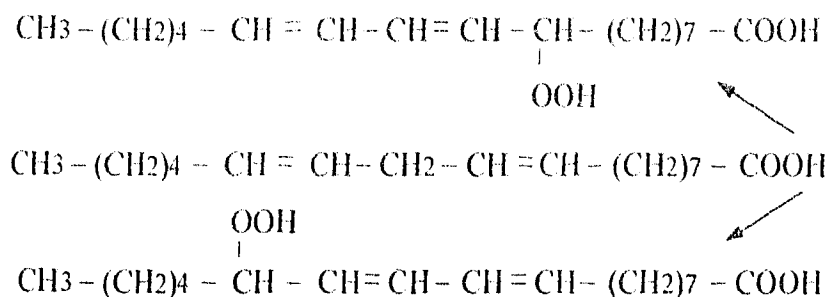


Figura 5. Acción de las enzimas Lipoxigenasas.

4.4 Determinación de la intensidad de oxidación.

Es imprescindible llevar a cabo una adecuada determinación de la oxidación de los lípidos en la industria, ya que, de esto dependerá, la calidad sensorial, química y física del producto terminado. Debido a lo anterior se requieren métodos sistemáticos para la determinación de la descomposición de grasas y aceites. Por desgracia no existe ningún método físico o químico que se pueda correlacionar perfectamente con la evaluación sensorial.

A continuación se describen brevemente algunos de los métodos más comunes:

4.4.1 Evaluación sensorial.

La acumulación de sustancias de bajo peso molecular provenientes de la descomposición de las reacciones de oxidación, producen olores y sabores característicos de la rancidez que suelen ser desagradables. En la industria o laboratorios se requiere de un panel de jueces entrenados para evaluar estos olores y sabores característicos de las muestras en estudio o proporcionadas, los resultados obtenidos se analizan utilizando modelos estadísticos específicos con el fin de concluir si existe el atributo sensorial conocido como rancidez.

Una de las limitaciones de este procedimiento es que durante las primeras etapas de la rancidez no se perciben olfativamente sus efectos, ya que se forman peróxidos, los cuales no proporcionan olor u olores; cuando se identifica el olor a rancio, la reacción generalmente se encuentra ya avanzada.

4.4.2 Métodos Químicos.

4.4.2.1 Índice de peróxidos.

El índice de peróxido está fundamentado en la capacidad de los peróxidos, productos de la oxidación de las grasas, de oxidar el ion yoduro del KI y producir yodo que se valora con una solución de tiosulfato; también se puede emplear óxido ferroso y cuantificar el ion férrico formado.

Este procedimiento, aunque es el método más común para determinar la oxidación de las grasas, tiene varias limitantes; la primera es que los hidroperóxidos generalmente reconocidos como peróxidos son los primeros productos que aparecen con la oxidación de los lípidos, los cuales, por su inestabilidad, están sujetos a reacciones secundarias de degradación, lo que limita a este método a realizarse sólo en las primeras etapas.

La segunda limitante es que este método no puede ser utilizado para la determinación de índices de peróxidos muy pequeños, por la dificultad de observar el punto final durante la evaluación; sin embargo, existe una variación sustituyéndola por una técnica electroquímica, en donde el yodo liberado se reduce en un electrodo de platino, logrando determinar índices en el rango de 0.06 a 20 meq sobre Kg.

Como tercer limitante tenemos que el yodo a titular puede ser liberado de dos maneras diferentes: La absorción del yodo desprendido por las insaturaciones del material lipídico, y la que es a partir de la solución de yoduro de potasio por la presencia de oxígeno.

Como última limitante están las variaciones en el peso de la muestra, tipo de solvente usado y condiciones de reacción tales como el tiempo y la temperatura. (2, 6, 7)

El método de la AOAC es el que más se emplea y el que generalmente se usa para efectos comparativos.

4.4.2.2 Método del ácido tiobarbitúrico.

Este método se fundamenta en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA con una de malonaldehído en la que se produce un compuesto cromógeno de color rojo cuya concentración se determina espectroscópicamente a 530nm fig. 6 (2).

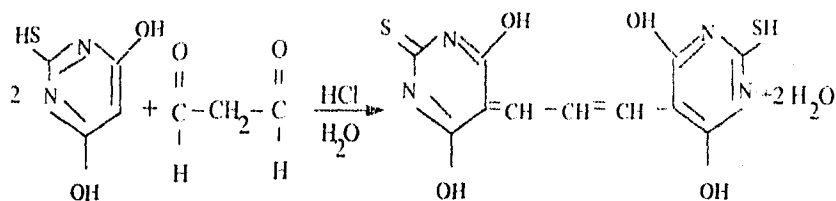


Figura 6. Reacción del TBA con malonaldehído.

El método de TBA se puede realizar de dos maneras diferentes:

- 1.- Aplicando a los alimentos en forma directa después de eliminar todos sus pigmentos.
- 2.- En la fracción del alimento que se obtiene por una destilación con vapor.

Se ha demostrado que la prueba del ácido tiobarbitúrico es la técnica más confiable en el análisis del desarrollo de la reacción de oxidación de las grasas (8).

El procedimiento adolece de algunas fallas. Primera: No siempre se forma el dialdehído malónico, ya que generalmente sólo provienen de los aceites que contienen los ácidos linolénico y araquidónico. En segundo lugar, el TBA en ausencia aldehído, también produce compuestos de color amarillo con otros derivados de la oxidación de las grasas. La tercer falla es que la presencia de sacarosa y de ácidos interfieren en la determinación. Por último, al existir proteínas reduce la concentración del compuesto cromógeno, ya que estas reaccionan con el malonaldehído (2).

4.4.3 Métodos Físicos.

4.4.3.1 Espectroscopía Infrarrojo.

La Espectroscopía infrarrojo es una evaluación útil para la identificación de grupos funcionales no usuales y para el estudio de ácidos grasos con dobles enlaces trans. Gracias a la transformación continua de los compuestos formados durante la oxidación, la Espectroscopía infrarrojo nos ayuda a seguir el curso del deterioro de las grasas y los aceites (7).

O'Connors menciona que la aparición de bandas a 2.93 μ indican la formación de hidropéroxidos, la de 5.72 μ la formación de aldehidos, cetonas o ácidos, la desaparición a 3.2 μ indican el reemplazo de un hidrogeno de un doble enlace por otro radical, probablemente señalando una polimerización. La formación de enlaces conjugados se presenta con cambios en las bandas de la región de 10 a 11 μ (7).

4.4.3.2 Polarografía

Los métodos polarográficos se han utilizado para la cuantificación de peróxidos en grasas; pues se ha encontrado una relación lineal entre la altura de la onda registrada y el índice de peróxidos, en las primeras etapas de la oxidación. Además de que con el polarógrafo se puede identificar perfectamente las estructuras -O-O- y -OOH dando buenos resultados (7).

4.4.3.3 Cromatografía de gases.

El uso de los cromatógrafos de gases es más común en muestras simples como los aceites vegetales, con este método físico lo que se obtiene es la separación y la identificación de cada uno de los productos de la oxidación de los lípidos con el fin de obtener un sistema modelo y así entender el mecanismo del proceso de deterioro.

4.5 Antioxidantes.

Existen numerosas clases de aditivos alimenticios usados para satisfacer diferentes objetivos, una de esas clases es la de los antioxidantes, que, posiblemente son los más importantes debido a que tienen un amplio uso en una alta proporción en los miles de productos alimenticios que existen en el mercado.

De acuerdo con una definición muy general los antioxidante son "Substancias capaces de retrasar, retardar, o prevenir el proceso de oxidación" Los antioxidantes alimenticios, básicamente los encontramos divididos en (4).

- Ácidos (y sus sales y ésteres), tales como el a Ascórbico y Cítrico, usados en la protección de la oxidación del color en carnes y frutas y otros alimentos susceptibles a este tipo de oxidación.
- Compuestos fenólicos (naturales y sintéticos), tales como butilhidroxianisol (BHA) y tocoferoles, los cuales inhiben la oxidación relacionada con las grasas y aceites de los alimentos (4).

Desde hace cincuenta años o más, cientos de sustancias derivadas en su mayoría de fuentes vegetales han sido probadas como antioxidantes para las grasas y aceites de los alimentos. Tales sustancias naturales exhiben efectos antioxidantes significativos y algunas veces son encontrados como más efectivos que la mayoría de los antioxidantes fenólicos sintéticos. Emanuel y Lyaskovskays (9) revisando antioxidantes y sinergistas para inhibir la

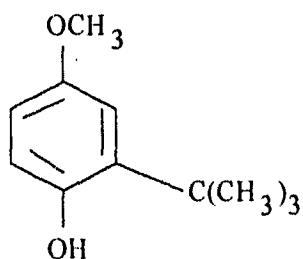
oxidación de grasas, incluyeron un número de sustancias naturales tales como goma de guayacol, taninos, especias y bilirrubina, mostrando su efectividad en la grasa de los alimentos como antioxidantes.

4.5.1 Antioxidantes artificiales.

La mayoría de los antioxidantes artificiales usados comúnmente en la industria alimentaria, están constituidos por un anillo aromático insaturado y un grupo hidroxilo que funciona como donadores de electrones o átomos de hidrógeno (2, 3). La potencia de cualquiera de estos aditivos se pueden alterar si se modifica su estructura química añadiendo cierto grupo activo dentro del núcleo aromático (3). Sin embargo, es muy importante tomar en cuenta la longitud y ramificación de la cadena de átomos de carbono usados como sustituyente del grupo aromático ya que si estos son demasiado grandes, provocarán impedimento estérico.

4.5.1.1 BHA

Uno de los más comunes por su uso es el Butilhidroxianisol 3-terbutil-4-hidroxianisol, comercialmente se conoce como BHA, que consiste en una mezcla de 2-terbutil-4-metoxifenol y 3-terbutil-4-hidroxianisol.

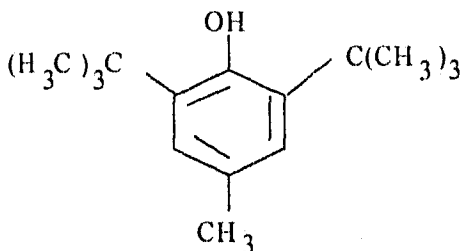


Peso molecular 180.25

Es de color blanco o ligeramente amarillento, sólido céreo, de olor débil característico, funde de 48 a 63°C. Es insoluble en agua es muy soluble en grasas, alcoholes y propilen glicol. Es efectivo en aceites vegetales, pero es mejor en manteca u otras grasas animales. La acción antioxidante del BHA crece con la concentración arriba de 0.02% y permanece aproximadamente igual en niveles altos. Este antioxidante es débil, pero muestra una acción sinérgica alta cuando se usa con galato de propilo o con el ácido nordihidroguayarático, este antioxidante no se destruye fácilmente en medios básicos y esto se debe de tomar en cuenta para alimentos horneados alcalinos. El BHA cuando se usa en bajas concentraciones no da olores indeseables o sabores desagradables a los alimentos; tiene un valor de DL50 (dosis letal media) oral para ratas de 2.2g/Kg, con la ventaja de que es eliminado rápidamente por el cuerpo humano, aproximadamente un 80% en 24 horas (10).

4.5.1.2 BHT

El hidroxitolueno butilado conocido como BHT, es el 2,6 diterbutil-4-metilfenol.



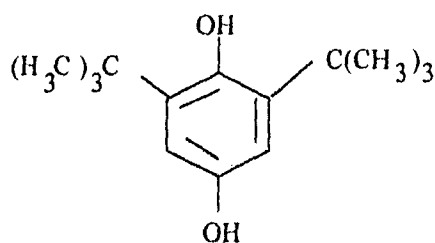
Peso molecular 220.30

Este es otro antioxidante sintético utilizado inicialmente en productos de petróleo y hoy en día se encuentra en productos alimenticios. El BHT es de color blanco cristalino, su punto de fusión es de 70°C, y su punto de ebullición

de 265°C. Es insoluble en agua, pero si en tolueno, metano, etano, etil, metil cetona, benceno y otros solventes más de hidrocarburos. No da ningún olor, sabor, color a los alimentos; tiene un DL50 oral para ratones de 1.04 g/Kg, pero en el organismo humano lo absorbe en pequeñas cantidades; en los últimos años se han publicado diversos trabajos que demuestran su efecto tóxico, por lo que algunos países están considerando si lo siguen empleando o no (10).

4.5.1.3 TBHQ

El antioxidante artificial TBHQ ó 2,5-Diterbutilhidroquinona, fue aprobado para aplicarlo en alimentos en el año 1972 en los Estados Unidos. Este aditivo ofrece una mayor protección que el BHA y el BHT en aceite poliinsaturados como en los de girasol y los de cártamo ya que es más soluble en agua y necesita sistemas con poca agua. No sufre decoloración en presencia de sales de hierro y su solubilidad en grasas es buena (2).



4.5.2 Antioxidantes naturales.

Los grupos de compuestos naturales que han sido estudiados por sus propiedades antioxidantes son:

- Aminoácidos y proteínas.
- Tocoferoles
- Ácido Ascórbico
- Compuestos Fenólicos

4.5.2.1 Aminoácidos y proteínas.

De los aminoácidos, aquellos con mayor actividad antioxidante son los que contienen grupos sulfhidrilo, pues generalmente los tioles, son reconocidos como agentes que bloquean la propagación de radicales libres; sin embargo, se ha demostrado que todos los aminoácidos poseen cierta actividad en algún sistema.

La cisteína a logrado inhibir la oxidación catalizada por hemoproteínas en aceites comestibles al reaccionar con hidroperóxidos del ácido linoléico. Desafortunadamente la principal desventaja de la cisteína es que su cadena - CH₂ - SH, al descomponer los hidroperóxidos, forman compuestos carbonílicos que pueden conducir a un oscurecimiento no enzimático del alimento.

En cuanto a la actividad antioxidante de proteínas se sabe que algunas de ellas e hidrolizados proteicos inhiben la autooxidación de la vitamina A (11).

4.5.2.2 Tocoferoles.

Los tocoferoles se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal, son conocidos como antioxidantes naturales; sin embargo, esta actividad no es la misma para sus diferentes isómeros ya que el gamma-tocoferol es más efectivo que el alfa-tocoferol, además, debido a su larga estructura molecular, que ocasiona un gran impedimento estérico, su actividad antioxidante es débil. Sin embargo se ha demostrado que la actividad de ellos dependen de la temperatura; así a temperaturas bajas (25-35°C) los tres compuestos muestran aproximadamente la misma actividad, pero a 95°C el gama tocoferol es más activo que el alfa tocoferol. La actividad de los tocoferoles no se destruye

completamente por cocimiento por lo que se usa para productos homeados (10,11).

El grupo de los tocoferoles y la lecitina, integran los antioxidantes naturales más importantes que se encuentran en los lípidos, pero que se pierden durante la refinación de los aceites comestibles (2).

4.5.2.3 Ácido Ascórbico

El ácido Ascórbico o el 2,3-dieno-1-gulo-furanolactona, componente cristalino que funde con descomposición cerca de los 160 °C, es insoluble en grasas, éter, cloroformo; soluble en agua, y ligeramente en alcoholes. Es muy estable al aire cuando esta seco, es un gran sinergista con los Tocoferoles y antioxidante sintéticos como el BHA y el BHT (10). Su actividad es muy variable, dado que en algunos sistemas actúa como prooxidante y en otros como antioxidante. En general, esta acción está determinada por el potencial de óxido-reducción del sistema (11).

4.5.2.4 Compuestos fenólicos.

Los antioxidantes Fenólicos, como las (isoflavonas, daidzeína, gliciteína, quercetina) al igual que los ácidos: caféico que proviene de la hidrólisis del ácido clorogénico, ferúlico y cumárico, se presentan en semillas oleaginosas como la soya, el cacahuate, el algodón, el cacao, el café, entre otras (2,9,11). La extracción de los compuestos fenólicos puede hacerse bien sea de sus harinas desgrasadas o de sus concentrados proteínicos, empleando agua caliente o disolventes orgánicos como el metanol, el éter etílico, el etanol etc. siendo éstos últimos los más efectivos (11).

Los compuestos mencionados generalmente se encuentran en concentraciones bajas y su efectividad como antioxidante en el propio alimento es muy pobre; por esta razón, en muchos casos es preciso recurrir a sustancias sintéticas más potentes (2).

4.5.3 Mecanismo de acción de los antioxidantes.

Desde que Bolland (9) mostró que la autooxidación de grasas y aceites progresa a lo largo de una reacción en cadena de radicales libres, muchos estudios sobre los mecanismos de la acción de los antioxidantes se han realizado. La química de la degradación de las moléculas antioxidantes durante el curso de la autooxidación de las grasas y aceites es importante para aclarar la acción de los antioxidantes y de los efectos sinérgicos de los compuestos que potencian su acción.

Existen dos categorías fundamentales de compuestos que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos: los donadores de protones y los secuestradores. Entre los primeros están el BHA, el BHT, TBHQ y el galato de propilo; éstos no detienen la formación de los radicales que se generan en la oxidación, sino que al reaccionar con ellos los estabiliza y se producen radicales del antioxidante que son menos activos debido a su resonancia y, por ende, no promueven la oxidación como lo hacen los radicales libres de los ácidos grasos. Estos compuestos contienen una o más funciones hidroxilo y actúan en los pasos de iniciación y propagación de la oxidación pues ceden un átomo de hidrógeno tanto a los radicales ácidos grasos (R[•]) como a los hidroperóxidos (ROO[•]).

Un ejemplo del mecanismo de acción de un antioxidante fenólico se muestra en la figura 7, en donde una vez que el antioxidante cede un protón se convierte en radical, el cual puede interactuar con otro igual para regenerar una molécula original de antioxidante y otra inactiva.

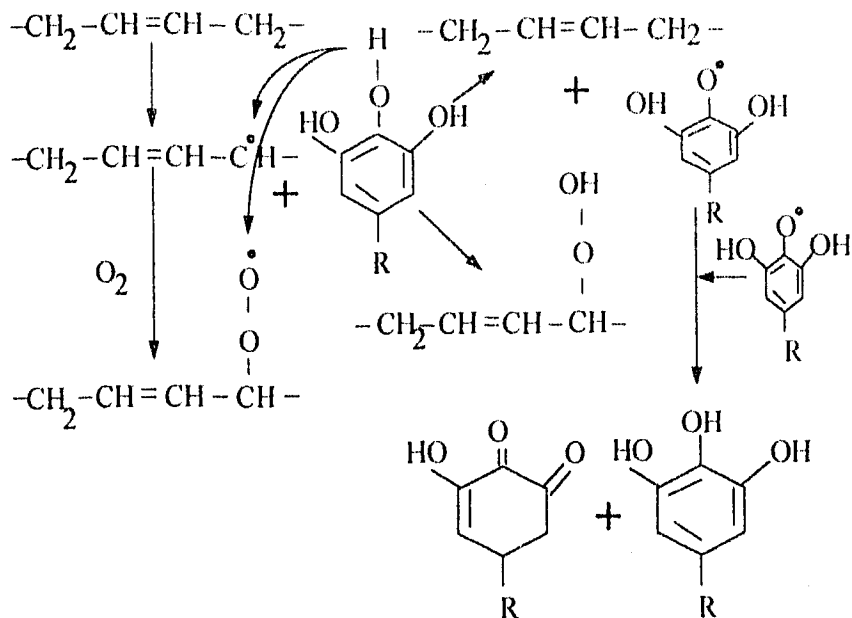


Fig. 7. Mecanismo de la acción de un antioxidante (galato) sobre los radicales del ácido oleico.

4.6 Legislaciones gubernamentales para el uso de antioxidantes en los alimentos.

En el título noveno, artículo 672 de la primera sección del Diario Oficial de la Federación publicado el lunes 18 de Enero de 1988, se define a un antioxidante como "la sustancia o mezcla de sustancia destinadas a retardar o impedir la oxidación y enranciamiento de los alimentos" y se indica que solo se permite el empleo de los siguientes antioxidantes en México:

1. Ácido ascórbico
2. Ácido eritórbico
3. Alfa tocoferol
4. Ascorbato de sodio; ascorbato de calcio
5. 4, hidroximetil - 1,2,6-diterbutil fenol
6. Butilhidroxianisol (BHA)
7. Butilhidroxitolueno (BHT)
8. 2,5.diterbutilhidroquinona (TBHQ)
9. Eritorbato de sodio
10. Galato de dodeciolo
11. Galato de propilo
12. Lecitina
13. Palmitato de ascorbilo
14. Resina de guayacol
15. Tiodipropionato de dilaurilo
16. Tocoferoles mixtos
17. Los de más que autorice la secretaria.

El Comité del Codex sobre Grasas y Aceites en su reunión (12ª) revisó y enmendó las dosis máximas de BHA, BHT, TBHQ y los galatos en la correspondiente Norma para grasas y aceites:

Dosis máxima en el producto final

	Disposición antigua	Disposición enmendada
Galato de propilo	100 mg/Kg	100 mg/Kg
BHT	200 mg/Kg	75 mg/Kg
BHA	solos o mezclados	175 mg/Kg
TBHQ	-	120 mg/Kg
BHA + BHT	100 mg/Kg	200 mg/Kg

En contradicción a las dosis propuestas por el Codex, la Legislación del "Acta de Alimentos, Drogas y Cosméticos" ("Food, Drug and Cosmetic Act" declara que los antioxidantes se deben adicionar en no más del 0.02% o bien 200 ppm basado en el contenido de grasas del alimento. (12)

Una de las pruebas más importantes que requieren la "Administración de Alimentos y Drogas" ("Food and Drug Administration") (FDA) para reconocer un aditivo como seguro, (12) es la llamada "Dosis Letal Media", que indica la dosis a la cual la mitad de los animales de experimentación mueren.

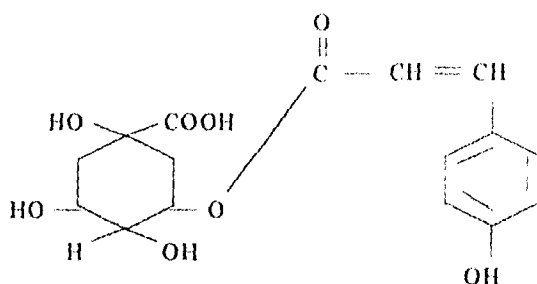
Para esto se suministra una dieta con el aditivo a animales de laboratorio, realizando periódicamente exámenes histopatológicos, estudios de la ruta metabólica del aditivo y los efectos bioquímicos de los metabolitos producidos. Para que sea considerado como seguro un aditivo debe tener una DLM de no más de 1 g/Kg basado en el cuerpo del animal, además, no debe de causar modificaciones en el crecimiento del animal cuando se suministre una dieta durante un periodo de dos años que contenga 100 veces mas la cantidad del aditivo propuesto para el humano. (12)

4.7 ÁCIDO CLOROGÉNICO.

Al hidrolizarse el ácido clorogénico se produce una molécula de ácido quínico y una de cafeico, esta ultima se ha comprobado que presenta carácter antioxidante debido a su estructura fenólica y a la presencia de un grupo hidroxilo (2), los que provocan resonancia electrónica en la molécula, sumado a esto el ácido quínico es un hexano con grupos hidroxilos. Por lo que la molécula de ácido clorogénico puede presentar un mayor poder antioxidante debido a las características propias de cada una de las moléculas que la componen.

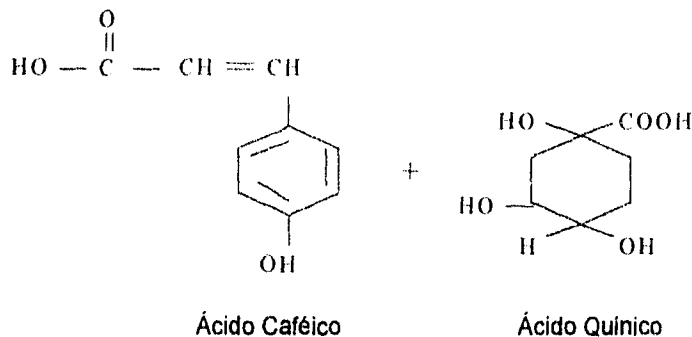
4.7.1 propiedades físico - químicas.

También conocido con el nombre de ácido 3(3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil) -1,3,5-trihidroxycarboxílico ó ácido 1,3,4,5 - tetrahidroxiciclohexancarboxílico.



Peso molecular 354.3

Es de color blanco amarillento, presenta alta solubilidad en agua caliente, acetona y etanol (100mg más 4.0 ml de etanol), su punto de fusión de 208 ° C y un Ka de 2.2×10^{-3} , es un compuesto estable a la luz y al calor moderado no mayor de 200 °C (12, 13, 14, 26). Suma más del cuatro por ciento del peso del grano de café, se encuentra en un ocho por ciento en el café verde y en un 4.5 por ciento en el tostado ya que durante este proceso se produce una hidrólisis disminuyendo su concentración dando así lugar al ácido caféico y ácido quínico (14, 18). La estructura de los productos de su hidrólisis se presentan a continuación.



El ácido clorogénico se ha identificado como el principal constituyente soluble del café (15,18), encontrándose aquí en mayor proporción que en otras plantas y frutas como son el durazno, manzanas, uvas, zanahorias, tabaco y semillas oleaginosas (16,17). Es una sustancia algo ácida y ligeramente amarga que contribuye al sabor de la bebida de café (18). Se han utilizado varios métodos de separación del ácido clorogénico, entre los más comunes se encuentran la cromatografía en gel, la técnica de HPLC, y la separación por valores de solubilidad, utilizando la espectrofotometría ultravioleta para comprobar la existencia de la lectura a 322 nm ya que esta es la absorbancia máxima de dicho compuesto (19). La principal finalidad de la separación y purificación del ácido clorogénico ha sido la cuantificación, ya que se ha visto que es uno de los compuestos de mayor concentración e influencia en el sabor del café; en otros estudios se han utilizado estos métodos para su eliminación, tal es el caso de la harina de semillas de girasol.(13)

4.7.2 Toxicidad.

El café es una bebida consumida por millones de personas en todo el mundo, lo que da lugar al estudio de la toxicidad de cada uno de sus

componentes, en este trabajo sólo nos enfocaremos a la toxicidad el ácido clorogénico ya que es el punto de interés. Se han realizado diversos estudios en Amsterdam, Alemania y Japón principalmente ya que se le presume una actividad mutagénica y cancerígena, dichos estudios se han efectuado tanto in vitro como in vivo en concentraciones que van desde 10 mg, 20 mg, hasta 100 mg, esta última dosis es equivalente a 15 mg/100 g de peso corporal para un hombre de 75 Kg. Se tiene como conclusión de todos los estudios realizados, que el ácido clorogénico no presenta ninguno de estos dos caracteres y se confirma que tiene un poder anticarcinogénico, es importante mencionar que aunque no solo en el café esta presente este ácido esta dosis de 15 mg/ 100 g es exagerada en comparación con su consumo diario (22 - 25).

4.8 CAFÉ

4.8.1. Generalidades.

No se sabe con precisión el lugar de origen del cafeto, la planta del café. Existe la teoría de que el café pudiera ser nativo de México, ya que existe una palabra Náhuatl para denominar a la planta: Acoxcapilli, donde A: sin y coxi: sueño, (7). Sin embargo, no hay datos que sustenten esta creencia.

La teoría más aceptada es que el café es originario de Abisinia, de donde pasó, en el siglo XIV, a Arabia y después a la India. A fines del siglo XVII, algunas plantas de café fueron cultivadas en el jardín botánico de París. En 1720 un oficial francés, Gabriel de Clieu, robó una planta y llevó a la Martinica, una de las Islas Antillanas. De aquí, la valiosa planta se difundió pronto en toda América Central y del sur, especialmente en Brasil, donde existen hoy la mayores plantaciones del mundo. En México, el café fue introducido a finales del siglo XVIII con una semilla procedente de la Habana, Cuba, y se podría asegurar que en el actual municipio de Córdoba, Veracruz, pues de acuerdo a datos publicados por Don Miguel Lerdo de Tejada relativos

al comercio interior y exterior de México, entre los productos exportados por el Puerto de Veracruz figura el café. La primera exportación fue de 272 quintales en 1802. (8) Desde 1882, México exporta café en forma ininterrumpida. La gran afluencia de europeos al estado de Chiapas hizo posible que, a fines del siglo XIX, se consolidara el cultivo y la expansión del café, de tal manera que en 1990 se registró una exportación 400,000 sacos de café. Actualmente la producción nacional de café se encuentra principalmente en los estados de Chiapas, Puebla, Oaxaca, Veracruz.

4.8.2 Composición del grano de café.

El grano de café tiene una composición química complicada, la cual varía según las condiciones climáticas del país de cosecha y de la especie del café. En la Tabla 2 se muestra un aproximado de la concentración de sus componentes en base seca, dividiéndolos en ocho grupos principales, en donde los carbohidratos se presentan en un 60%, conformados por azúcares reductores, sacarosa, pectinas, almidón, pentosas y celulosas variando entre ellos el grado de solubilidad en agua, en segundo lugar con una concentración del 13% se encuentran el aceite y las proteínas del café, la solubilidad en agua de estas últimas dependerá del grado de desnaturalización que a su vez tiene una relación estrecha con la finura de las partículas del grano durante la extracción.

Los componentes no volátiles se presentan en menor proporción, pero son los responsables del olor y sabor de la bebida del café. La cafeína está en una concentración del 1% en el café robusta y del 2% en el arábica, al final del tostado se tiene una pérdida aproximada del 0.8%, imparte un sabor amargo y es el que le da a la bebida su efecto estimulante y de diurético. Otro constituyente, que forma aproximadamente el 1% del café ya sea verde o tostado es la trigonelina, es aproximadamente una cuarta parte tan amarga como la cafeína. Existen cinco ácidos en el café los que son fácilmente

extraídos por su alta solubilidad en agua caliente, lo que explica por qué el sabor del café débil es predominantemente ácido, entre ellos el más importante es el ácido clorogénico, por su alta proporción y su contribución al sabor de esta bebida.

<i>Compuesto</i>	<i>Solubilidad</i>	<i>composición individual g/ml</i>	<i>% Total</i>
Carbohidratos			60
Azucares reductores	Soluble	1.00	
Sacarosa	Soluble	7.00	
Pectinas	Soluble	2.00	
Almidón	parcialmente soluble	10.00	
Pentosas	parcialmente soluble	5.00	
Hemicelulosa		15.00	
Holo celulosa		18.00	
Polifenol: Lignina		2.00	
Aceltes	Insoluble		13
Proteínas	% desnaturalización *		13
Cenizas oxidadas	% de hidrólisis *		4
No volátiles			8
Ácido Clorogénico	Soluble	7.00	
Ácido Oxálico	Soluble	0.20	
Ácido Málico	Soluble	0.30	
Ácido Cítrico	Soluble	0.30	
Ácido Tartarico	Soluble	0.40	
Trigonelina	Soluble		1
Cafeína	Soluble		1
total			100

SILVETZ & DESROSIER, 1979.

Tabla 2. *Composición química del café verde en base seca.*

**la solubilidad depende de:*

4.8.3. Características del Café.

El género *Coffea*, de la familia de las rubiáceas, al que pertenece el Cafeto, comprende unas treinta especies, de las más importantes son: *C. arabica*, L., la más extendida, originaria de las montañas de Abisinia; la *C. liberica*, Hiern, de Liberia, y la *C. robusta* (*Canephora*), originaria de Malang.

La especie de *C. arábica* es un árbol de 7 a 8 y aun 12 metros de altura; de tallo robusto, recubierto por una corteza de color gris; ramos largos, abiertos, flexibles; hojas persistentes, opuestas, ovaladas, de color verde brillante y de unos 15 cm. de largo; flores blancas, pequeñas, olorosas, semejantes a la del jazmín, los frutos aparecen al tercer año y son drupas ovaladas rojizas dominadas cerezas.

La especie *C. liberica* alcanza dimensiones algo mayores que la anterior; tiene tallo derecho, corteza rojiza, hojas de unos 20 a 30 cm. de largo, coriáceas, con pecíolo corto. Las flores son también más grandes y los frutos gris rojizos. Comienza a dar flores a los dieciocho meses y frutos a los dos años. Alcanza mayor longevidad y es más productiva que el café Arabia.

La especie *C. robusta* es muy precoz, productiva, de semilla pequeña, resistente pero requiere suelos feraces y da un café de calidad inferior. (9)

La concentración de los compuestos del grano de café dependerá de la especie, al igual que las condiciones climáticas del país de cosecha. Pero en general el fruto está conformado de la siguiente manera.

Es una drupa de forma oval y color rojo azulado oscuro, por lo que se le ha llamado cereza de café.

Normalmente, la cereza contiene dos semillas envueltas por cuatro capas, que de afuera hacia dentro son:

1. Pericarpio:

Suele ser rojo cuando está maduro, verde, amarillo o rosado durante el proceso de maduración y castaño oscuro cuando se encuentra seco.

2. Mesocarpio o Pulpa.

Parte pegajosa y gelatinosa compuesta por sustancias pécticas y azúcares, que forman lo que comúnmente se conoce como mucílago o baba.

3. Endocarpio o Pergamino.

Capa tiesa protectora de la semilla que está constituida por material celulósico resistente al desgarramiento.

4. Perisperma o Película.

Tejido muy delgado que cubre directamente a la semilla, con color gris plateado, rojizo o negro.

5. Semilla o Endospermo.

Es el grano desprovisto de todas cubiertas, comúnmente llamado café verde.

6. Embrión o Germen.

Es la planta en estado latente, localizada en una de las extremidades del grano o semilla. En los frutos normalmente hay dos semillas en posición asimétrica o invertida.

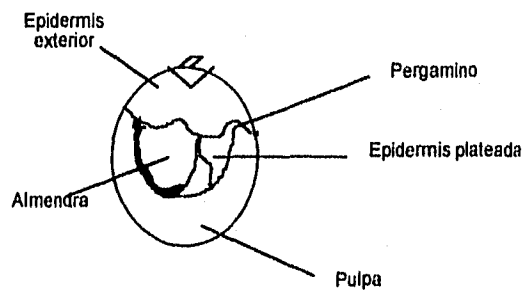


Fig. 8. Estructura de la cereza del café.

4.8.4 Obtención del grano.

La cereza es sometida a una serie de operaciones para liberar el grano de sus cuatro envolturas y mejorar su presentación. Para obtener el grano comercial, se recurre a una de las dos técnicas siguientes:

1. Vía húmeda; en la cual se siguen tres pasos:
 - Despulpado.
 - Fermentación y Lavado.
 - Secado y Pelado.
2. Vía seca; que se hace en dos tiempos:
 - Secado al sol.
 - Decorticación.

5.Desarrollo Experimental.

5.1 Extracciones.

5.1.1 Extracción de los compuestos solubles del café.

La extracción a partir de la especie *Coffea arábica* se hizo con el propósito de obtener el extracto con el antioxidante natural, teniendo siempre en la mira que el método habría de ser muy sencillo, basándonos en las propiedades de solubilidad de los compuestos.

Con el fin de que no se tuviera un apelmazamiento durante la molienda (malla 2 mm) se sometió la muestra a un secado a 60° C durante 48 Hrs. obteniendo una humedad de 6.11%. Posteriormente 35 gramos de harina de café se sometieron a una extracción por goteo con 45 ml de agua a 90° C. La mezcla se filtró, dando como resultado una solución de color café-verduzca. Es importante mantener la temperatura ya que es la adecuada para la extracción de los componentes no volátiles.

A continuación se presenta el diagrama de flujo empleado para la obtención del extracto con el antioxidante natural (Diagrama 1).

5.1.2 Extracción del Ácido Clorogénico.

El extracto de café se sometió a una triple extracción con cloroformo para separar la cafeína de los demás componentes quedando la fase clorofórmica y en la acuosa se presentan la trigonelina, la clorofila y el ácido clorogénico. Para poder separar la trigonelina de la solución, se realizó una modificación de pH con el fin de convertir el ácido clorogénico en su fenolato, aumentando así su solubilidad en el agua y con esto poder extraer la trigonelina con acetato de etilo.

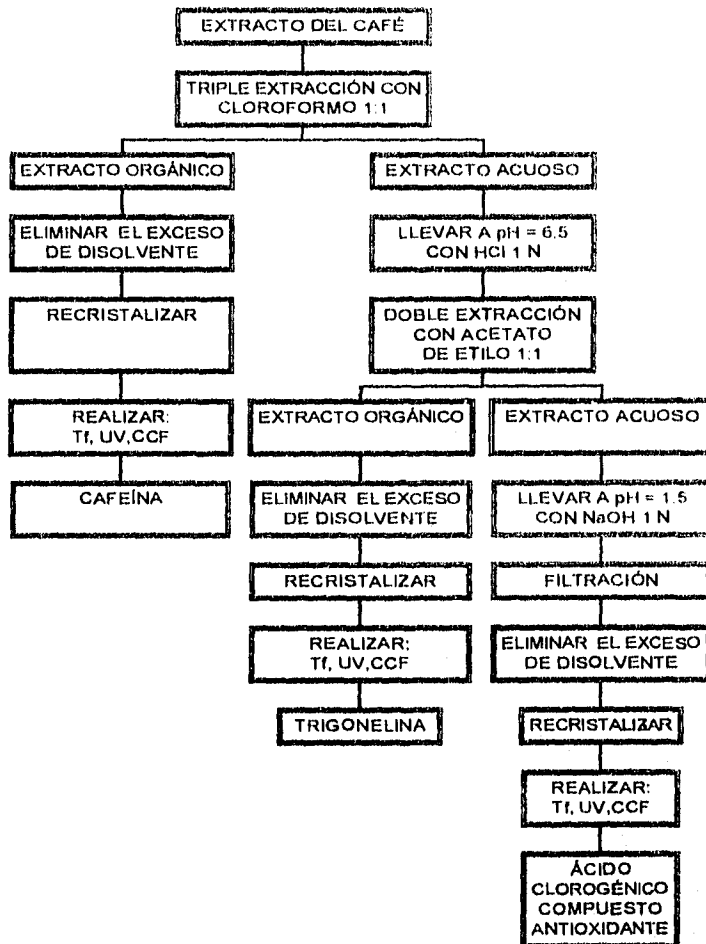
En la parte acuosa se presenta la sal del ácido clorogénico y la clorofila, la cual al regresar la solución al pH original se desnaturaliza y precipita.

La solución se somete a una filtración y una eliminación del exceso del disolvente para así concentrarse y poder recristalizar el ácido clorogénico y realizar pruebas de identificación como su temperatura de fusión, cromatografía en capa fina y ultravioleta (Diagrama 2).

OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS SOLUBLES DEL CAFÉ (Diagrama 1)



OBTENCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO DEL CAFÉ (Diagrama 2)



5.2 Evaluación experimental de la capacidad antioxidante del ácido clorogénico.

Para evaluar tanto la capacidad antioxidante del ácido clorogénico estándar (Sigma 100% pureza) como la del compuesto aislado del grano verde de café en el laboratorio, se realizó un monitoreo durante 23 días, de la formación de peróxidos y, consecuentemente de sustancias reactantes con el 2-Tiobarbiturico. La evaluación fue hecha en aceite esencial de naranja (Firmenich, 100 % pureza) aplicándolos en concentraciones del 0.02%. Se hizo una comparación del comportamiento de aceites con BHA, BHT (Rhone Poulenc México, 100% de pureza) en las mismas concentraciones y una muestra sin aditivo. Las muestras se almacenaron en obscuridad, tapadas a una temperatura de 35°C Tabla 3.

Tiempo	Control	Clorogénico estándar	Antioxidante extraído	BHA	BHT
1	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA
2	IP	IP	IP	IP	IP
4	IP	IP	IP	IP	IP
5	IP	IP	IP	IP	IP
8	IP	IP	IP	IP	IP
9	IP	IP	IP	IP	IP
10	IP	IP	IP	IP	IP
11	IP	IP	IP	IP	IP
15	IP	IP	IP	IP	IP
16	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA
18	IP	IP	IP	IP	IP
19	IP	IP	IP	IP	IP
22	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA	IP-TBA
23	IP	IP	IP	IP	IP

Tabla 3. Programa de evaluación de la capacidad antioxidante.

IP: Índice de Peróxido.

TBA: Número de Tiobarbitúrico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Extracción y purificación del ácido clorogénico del café.

Para obtener el extracto con el antioxidante natural, es necesario realizar una extracción con agua a 90°C siendo importante mantener esta temperatura con el fin de asegurar que el mayor porcentaje de ácido clorogénico sea obtenido de la harina de café. Para su purificación el extracto se sometió a una triple extracción con cloroformo para separar la cafeína, quedando en la fase acuosa la trigonelina, la clorofila, y el ácido clorogénico. Para poder separar la trigonelina con acetato de etilo fue necesario llevar el pH de la solución de 4.3 a 6.5 con el fin de aumentar la solubilidad en agua del ácido clorogénico (ya que a este valor de pH se encuentra como fenolato). Al regresar la solución a un pH de 1.3 la clorofila se precipita.

6.1.1 Comparación de los compuestos extraídos vs. estándares respectivos.

En la tabla 4 se muestran los valores de los compuestos extraídos en el laboratorio y de sus respectivos estándares (SIGMA, 100% pureza). Obtenidos por espectrofotometría ultravioleta (Gráficas I,II), cromatografía en capa fina y temperatura de fusión.

Pruebas Realizadas	Ácido Clorogénico Estándar	Ácido Clorogénico Extraído	Cafeína Estándar	Cafeína Extraído	Trigonelina Estándar	Trigonelina Extraído
Valores Rf	0.52	0.52	0.60	0.60	0.69	0.68
λ Máx. nm	322	322	275	275	292	290
T.f °C	208	208.8	238	238.5	169	167

Tabla 4. Valores del ácido clorogénico estándar y extraído.

Como se puede observar los valores de los extractos y de los estándares son iguales a excepción del punto de fusión, los que varían en el rango decimal, pudiéndose deber a la presencia de alguna impureza o a error visual en el momento de la medición. Los valores de la Trigonelina son los que presentaron mayor variación.

6.1.2 Rendimiento.

6.1.2.1 Rendimiento de la molienda. A partir de $X = 74.4057$ gr. de grano de café verde, se obtuvo $X = 73.7642$ gr. de harina de café ($N = 7$), de tal manera que:

$$\frac{73.7642 \text{ gr. de harina}}{74.4057 \text{ gr. de grano}} \times 100 = 99.1378$$

74.4057 gr. de grano

Rendimiento de la molienda = 99.1378 %

6.1.2.2 Rendimiento de la extracción.

A partir de 34.9540 gr. de harina se recuperaron en $X = 1.6207$ gr. de ácido clorogénico

($\sigma = 0.0008$, $N = 7$), de tal manera que:

$$\frac{1.6207 \text{ gr. de ácido clorogénico}}{34.9540 \text{ gr. de harina}} \times 100 = 4.6366$$

34.9540 gr. de harina

Rendimiento = 4.6366 %

Se debe de tomar en cuenta que teóricamente el café contiene 7 % de ácido clorogénico, de tal manera que:

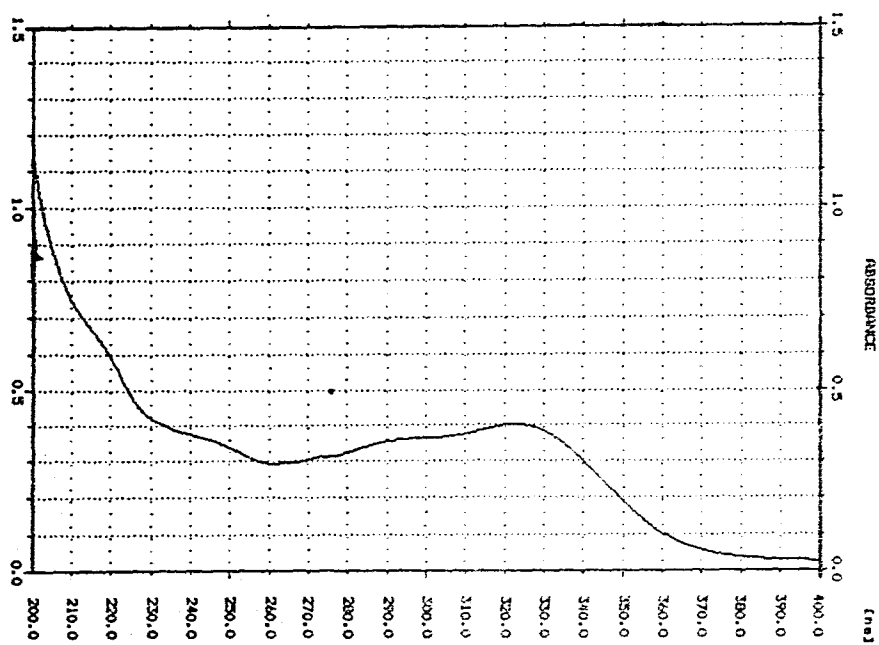
6.1.2.3 Rendimiento experimental de la extracción de Ácido Clorogénico.

$$\frac{4.6366 \text{ gr. de ácido clorogénico}}{7 \text{ gr. de ácido clorogénico}} \times 100 = 66.2402$$

7 gr. de ácido clorogénico

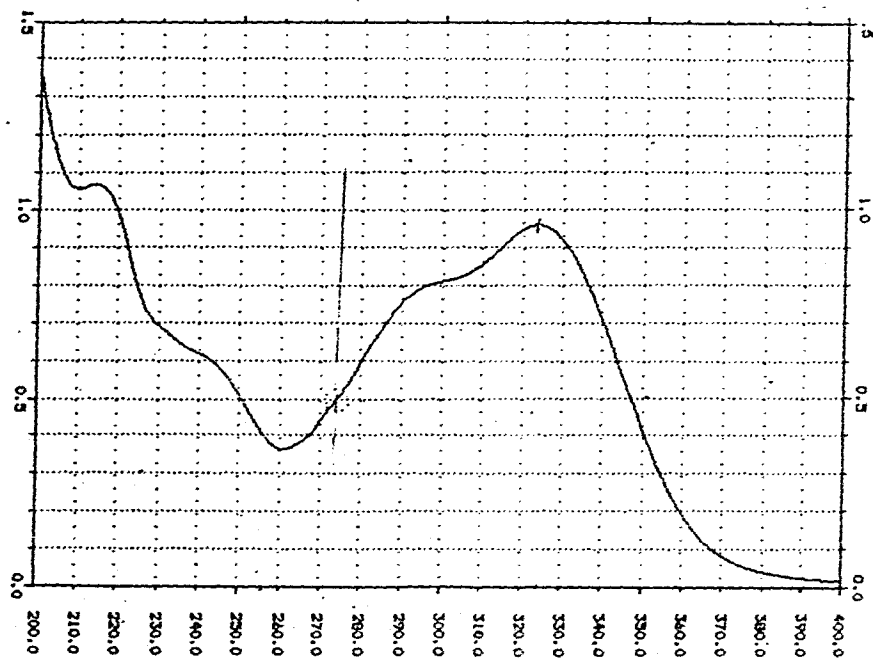
Rendimiento experimental = 66.2402 %

GRAFICA I
Espectro ultravioleta del ácido clorogénico estandar
BECKMAN DU-65 SPECTROPHOTOMETER.



GRAFICA II

***Espectro ultravioleta del ácido clorogénico extraído en el laboratorio
BECKMAN DU-65 SPECTROPHOTOMETER.***



6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante del ácido clorogénico.

6.2.1 Índice de peróxidos vs tiempo.

En la tabla 5 se muestran los valores de índice de peróxidos, (meq/kg.) en aceite esencial de naranja, almacenados a temperatura de 35° C en obscuridad, por un periodo de 23 días (Gráfica III).

tiempo (días)	control	clorogénico estándar	antioxidante extraído	BHT	BHA
0	34.88	34.88	34.88	34.88	34.88
2	58.50	35.83	42.68	49.27	42.82
4	64.12	24.41	30.20	63.85	51.70
5	46.18	18.24	41.09	23.42	26.19
8	84.47	32.26	42.67	24.18	21.95
9	87.54	21.33	24.69	30.21	19.68
10	106.07	35.59	42.77	32.69	60.06
11	168.70	51.13	51.63	27.47	54.69
15	333.30	52.37	70.05	27.56	54.76
16	347.24	69.49	86.57	28.98	64.67
18	429.37	131.76	151.24	30.33	68.32
19	551.38	155.04	153.47	74.16	84.59
22	600.31	675.32	303.55	154.47	88.77
23	1895.80	680.92	706.58	473.75	526.15

Tabla 5. Índice de peróxidos (meq/Kg.) vs Tiempo.

Control: aceite esencial de naranja sin antioxidante.

Clorogénico estándar: con 0.02% de ácido clorogénico estándar.

Clorogénico extraído: con 0.02% de ácido clorogénico obtenido experimentalmente.

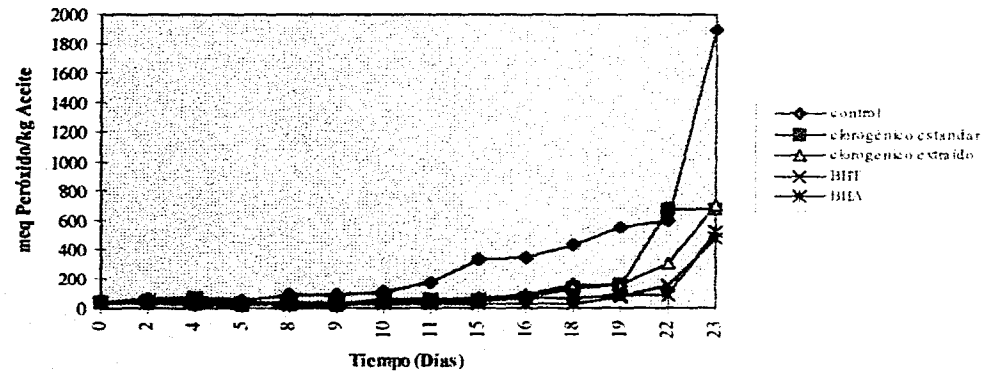
BHT: con 0.02% de BHT

BHA: con 0.02% de BHA

Los valores de índice de peróxidos de los aceites con los diferentes antioxidantes no siempre resultaron en un incremento, lo que se puede deber a una mala homogeneización.

GRÁFICA III

Índice de Peróxido vs. Tiempo (35°C)



A pesar de lo anterior si se puede observar una tendencia al aumento del índice de peróxidos conforme transcurre el tiempo en los aceites esenciales de naranja almacenados a 35°C, en el decimosexto día se observa una aceleración mayor en el deterioro, siendo el aceite control el más afectado con 1895 meq/Kg. Los aceites con el ácido clorogénico estándar y extraído en el laboratorio presentaron un comportamiento similar entre ellos, finalizando con valores de 680 y 706 meq/kg. respectivamente (Gráficas V,VI), siendo mayor que los valores obtenidos por la oxidación del BHA y BHT (526 y 473 meq/Kg.). Cabe mencionar que en aceites esenciales índices de peróxidos mayores a 1000 meq/Kg. no son una extrañeza.

Debido a la dispersión de datos que existe en el aceite control de la gráfica III se elimino el limite superior, para poder observar mejor el comportamiento de los demás aceites (Gráfica IV).

6.2.2 *Substancias Reactantes Con TBA vs Tiempo.*

En la tabla 6 se muestran los valores de las sustancias que reaccionaron con el ácido 2-tiobarbiturico produciendo un compuesto colorido cuya lectura es a 532 nm, evaluado en aceite esencial de naranja a las mismas condiciones de almacenamiento.

Tiempo (días)	Control	Clorogénico estándar	Clorogénico extraído	BHT	BHA
2	0.2928	0.2928	0.2928	0.2928	0.2928
16	1.0981	0.3687	0.4624	0.3529	0.3683
22	2.4816	1.024	0.9517	0.6588	0.8785

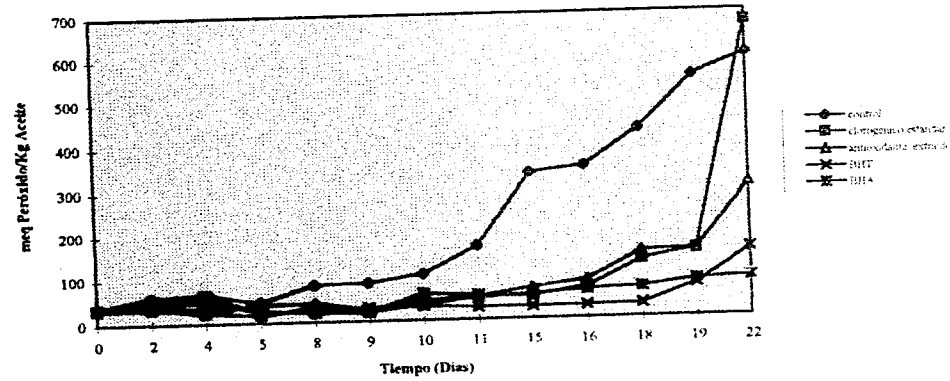
Tabla 6. Substancias reactantes TBA vs Tiempo.

Control: aceite esencial de naranja sin antioxidante.

Clorogénico estándar: con 0.02% de ácido clorogénico estándar

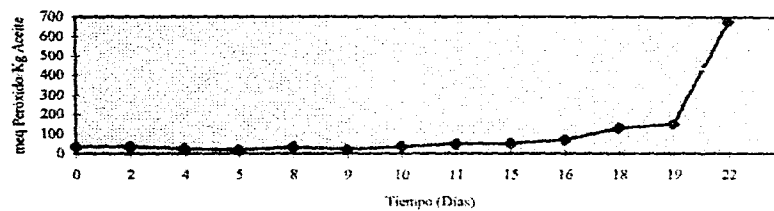
GRÁFICA IV

Índice de Peróxido vs. tiempo (35° C)



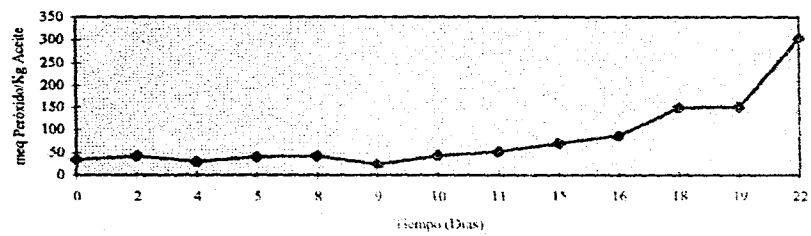
GRÁFICA V

Clorogénico Estándar



GRÁFICA VI

Clorogénico obtenido por extracción



Clorogénico extraído: con 0.02% de ácido clorogénico extraído en el laboratorio

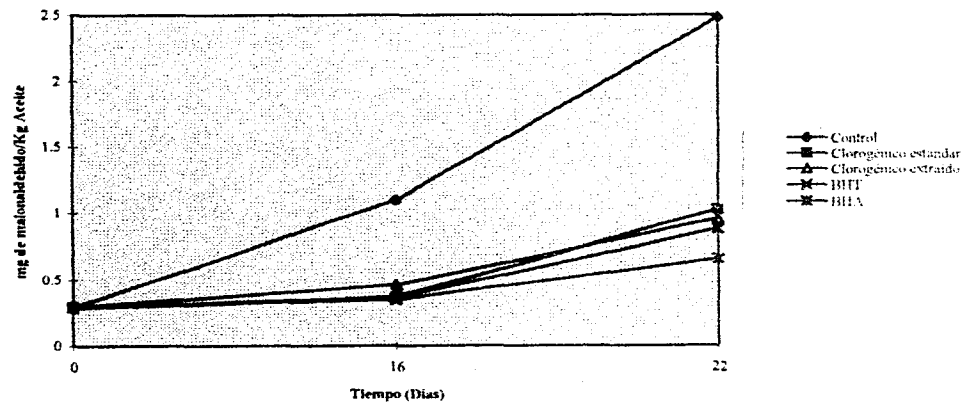
BHT: con 0.02% de BHT

BHA: con 0.02% de BHA

El monitoreo de las sustancias reactantes con el TBA se realizó en tres tiempos, siendo el decimosexto día el valor intermedio debido a la aceleración de la oxidación que se presentó en este momento como ya se explicó anteriormente. Se obtuvieron mayores valores en el aceite control lo que indica una acelerada oxidación desarrollando compuestos reactantes con el TBA. El ácido clorogénico disminuyó la formación de malonaldehidos, lo que indica que existe una protección del aceite contra la oxidación en presencia de este compuesto (gráfica VII).

GRÁFICA VII

Substancias reactantes con TBA vs. Tiempo (35° C)



7. CONCLUSIONES.

- La metodología empleada constituye una buena alternativa para la extracción y purificación de un antioxidante natural a partir del grano verde de café, pues es a base de agua.
- Se logró extraer ácido clorogénico con una eficiencia en la recuperación del 66.2402% a partir del café verde así como su identificación positiva en los extractos obtenidos.
- Se logró demostrar que el ácido clorogénico extraído de café verde, presentó actividad antioxidante equivalente a diversos antioxidantes sintéticos como el BHA y el BHT
- Con lo anterior podemos concluir que: *El ácido clorogénico es un antioxidante natural cuya aplicación puede extenderse a muchos otros alimentos.*

7.1 Recomendaciones.

- Es necesario efectuar estudios más profundos para evaluar su actividad antioxidante en sistemas alimenticios complejos y en grasas animales, además de variar las condiciones de pH, temperatura y acidez del alimento y del proceso.
- Hacer un mayor estudio en la utilización de diferentes emulsificantes para aumentar la estabilidad de la emulsión del ácido clorogénico en la fase oleosa.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Chang S.S; B. Ostric - Matijasevic; O.A.L Hsieh and C.L. Huang " Natural antioxidants from Rosemary and sage". 1977
J. of food Science. 42:1102
2. Badui dergal Salvador "Química de los Alimentos" 1984
Ed. Alhambra Mexicana S.A de C.V. segunda reimpresión
México, D.F. p.p 161 a 202
3. Furia Thomas E. " Handbook of Food Additives " 1972
Vol 1. CRC Press; Cleveland U.S.A. p.p 185 - 223
4. Fennema O.R; M. Karel; D.B. Lund "Principles of Food Science " 1976
Part II. Marcel Dekker Inc.
New York, N.Y. p.p 139 - 203
5. Efrén P. Judith G, "Oxidación y Antioxidantes". Tecnología de Alimentos.
10:260-270,1975.
6. Gray JI. "Measurment of Lipid Oxidation: a review" J.A.O.C.S. 55:339,1978.
7. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists
(A.O.A.C.) 1984.
8. Eskin N. Frenkel C, " A simple and rapid method for assesing rancidity of oisl
based on de formation of Hidroperoxides" J.A.O.C.S. 53:746,1976

9. Hudson B.J.F "Food Antioxidants "1990.
Elsevier science publishers LTD. New York, N.Y
p.p 99 - 193.
10. R. Inatani, H. Nakatani, "Structure of a New Antioxidative Phenolic" Agric.
Biol. Chem 46:1661,1982
Cepeda. A , Alimentaria., 23: 1990
11. Rodriguez - Palacios Felipe.J. "Antioxidantes Naturales " 1984.
Tecnol. Aliment 19:26
12. Furia T. "Handbook of food Aditives" CRC Press Cleveland USA Vol.1,
185-223, 1972.
13. R.F., Smith y D.I., Analyst., 88,310. 1963
14. Olivos R. Rascon R. "Extracción del ácido clorogénico de harina de girasol
con mezcla azeotropica de disolventes organicos " Tecnol. Aliment. 19.1.21
15. Sivetz. " Coffe processing technology" The Avi Publishing company, inc.
Westport, Connecticut., Volumen dos, 1963.
16. Sigma Chemical Co.april 1996.
17. Lockart,EE "Chemistry of Coffe", No 25, The coffe Brewing Center New
York, 1969.
18. Assosiation Scientifique Internationale du Café, "Collection of colloquia",
Proceding 1st to 14th colloquia, Paris, 1963-1991.

19. Politis J "Sur la distribution d'acid chlorogenique dans la famille de composeés et dans les organes de ces plantes", CR Acd Sci 228, 265-266.1949.
20. Clifford and Wilson "Coffe-Botany Biochemistry and production of beans and beverage" London: Crom Helm.
21. C. Maria, L. Trugo, RFA Moreira, "Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffe, sample by high performace gel filtrationcromatography", Food-chemistry; 52 (4) 447-449,1995.
22. Stadler RH; Turesky RJ; Mueller O, "The inhibitory effects of coffe on radical mediated oxidation and mutagenicity" Mutation research, 308 (2) Julio 1994.
23. Stensvold T; Jacobsen BK; "Coffe and Cancer: Aprospective study of 43,000 Norwegian men and women" Cances causes control 5 (5) Sept. 1994.
24. Hasegawa R; Ogiso T; Imaida K; Shiral T; "Analisis of the potential carcinogenicity of coffe and it's related compounds in a medium-term liver bioassay of rats" Food chemistry toxicol, 33 (1), Jan 1995.
25. A Victor; P Thomas; J. Thomas; C. Virginia; "Mutagenic activity of some coffe flavour ingredients" Mutation research, 204,219-228, 1988.
26. " Tecnología cafetera mexicana" Instituto Mexicano del Café 1974, México.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

27. Villaseñor A. "Coficultura Moderna en México " 1987
Agrocomunicación. Saenz Colín y Asociados
México.
28. Matons Augusto "Diccionario de Agricultura "1942
Vol I. Publicaciones Herreria, S.A.
México, D.F. p.p 456 - 459
29. D.I., Kuznetsov y L.T., Semenova., Anal. Chem., 52.12. 1990