



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDO CAFÉICO A
PARTIR DE ÁCIDO CLOROGÉNICO
RECUPERADO DE CAFÉ VERDE.

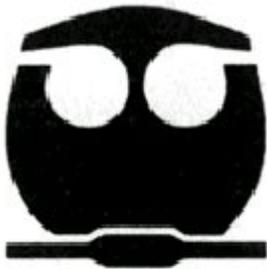
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JOSÉ MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ



MÉXICO, D. F., AGOSTO 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

Quiero agradecer al laboratorio 321 del departamento de Alimentos y Biotecnología, de la Facultad de Química por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones y en especial al Dr. Arturo Navarro Ocaña por ser mi asesor y amigo durante la elaboración de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial para Apoyo Complementario A.PROY.INV52558 CONACYT y el Instituto de Química. Gracias por su apoyo.

Gracias al Jurado por sus importantes aportaciones para este trabajo y por su apoyo para mi evaluación.

Agradecimientos Generales

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, quien me da la alegría para vivir y me da un regalo mas al poder concluir este ciclo de mi vida. Se que siempre has estado conmigo y que siempre lo estarás, se que de tu mano seguiré logrando cada una de las metas que me proponga. Gracias Señor.

Le agradezco profundamente a mi familia, a papá Sr. Miguel Angel Castillo Iñiguez, a mamá Sra. Gloria Minjarez Vázquez y a mis hermanas Maria Gloria y Guadalupe Delfina. Les agradezco todo su esfuerzo y su apoyo por hacer de mi lo que ahora soy, gracias por ser mi soporte y mi motor para culminar este ciclo. Este logro, es suyo también y lo comparto con ustedes en la dicha y el amor que siempre nos ha unido. Gracias Nadia Amores por darme tu amor y tu apoyo. Gracias a Arge por estar en mi corazón y a Jorge González por su amistad. Gracias a Leticia Palacios por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas has estado ahí, gracias por ser mi mejor amiga. Gracias a Sandra Bolaños por darme su cariño, su apoyo y asesoria.

Gracias a cada una de esas personitas especiales que me dieron su compañía, comprensión, apoyo y amistad durante el tiempo en el que juntos luchamos por nuestras carreras, gracias por esas carcajadas, juegos y reuniones. Gracias por permitirme aprender de cada uno de ustedes, siempre los llevaré en mi corazón. Verónica, Valeria, Erica, Vanesa, Lizbeth, Aide, Viridiana, Luxandra, Wendy, Fani, Leticia, Raquel, Mariana, Janeth, Sandra, Alejandro, Pedro, Carlos, Juan, Francisco, Eric, Neri, Miguel, Emilio, Mario, Enrique, Jacobo, Vicente, Mauricio, José Luís, Omar, Jerson, Rogelio, Alberto, Antonio, Edwin e Hiram. Gracias al laboratorio 321 y las amistades que hice ahí Sergio, Leo, Carlos, Francisco, Teresa, Julieta y Ángela.

Finalmente gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la preparatoria 9 y a la Facultad de Química por formarme como estudiante y como profesionista, gracias por permitirme ser parte de la mejor casa de estudios.

INDICE

CAPITULO1.	INTRODUCCION	1
CAPITULO2.	ANTECEDENTES	3
2.1	El café	3
2.1.1	Generalidades	3
2.1.2	Especies y variedades	4
2.2	Café crudo	5
2.2.1	Café verde	5
2.2.2	Recolección y tratamiento	5
2.2.3	Clases de café crudo	6
2.2.4	Programa de mejora de la calidad del café.	6
	Normas mínimas para el café de calidad exportable. Resolución 407 de la OIC	
2.3	El café en México	7
2.3.1	México y el café	7
2.3.2	Productores de café en México	8
2.3.3	Zonas de producción de café en México	9
2.3.4	Sistemas de producción	10
2.4	Composición química del café	11
2.5	Los ácidos Clorogénicos	12
2.5.1	Generalidades	12
2.5.2	Propiedades fisicoquímicas	13
2.5.3	Fuentes de ACGs	13
2.5.4	ACGs del Café	15
2.5.5	Métodos de obtención de ACGs	18
2.5.6	Métodos de análisis de ACGs	19
2.5.7	Propiedades y usos de los ACGs	20
2.6	Acido caféico	21
2.6.1	Generalidades	21
2.6.2	Propiedades fisicoquímicas	22
2.6.3	Fuentes de AC	22
2.6.4	Métodos de obtención de AC	28
2.6.5	Métodos de análisis de AC	29
2.6.6	Propiedades y aplicaciones del AC	30
2.6.7	Derivados de AC	32
2.7	Acido Quínico	36
2.7.1	Generalidades	36
2.7.2	Aplicaciones del AQ	36
2.8	Enzimas en la industria de alimentos	37
2.8.1	Generalidades	37
2.8.2	Hidrolasas	38

CAPITULO3.	HIPOTESIS	41
CAPITULO4.	OBJETIVOS	42
CAPITULO5.	METODOLOGIA	43
5.1	Diagrama general de la investigación	43
5.2	Obtención de materia prima	44
5.3	Materiales y métodos	44
5.3.1	Reactivos y equipos	44
5.3.2	Primea etapa	45
5.3.2.1	Preparación de las muestras	46
5.3.2.2	Procedimiento de extracción	46
5.3.3	Segunda etapa	47
5.3.3.1	Análisis por CCF	47
5.3.4	Tercera etapa	47
5.3.4.1	Hidrólisis enzimática de ACG y cuantificación de AC	50
CAPITULO6.	RESULTADOS Y DISCUSION	52
6.1	Obtención de materia prima	53
6.2	Primera etapa	53
6.2.1	Preparación de las muestras	53
6.2.2	Extracción de ACG	53
6.3	Segunda etapa	55
6.3.1	Identificación y cuantificación de ACG	55
6.3.2	Concentraciones de ACG obtenidas en cada muestra	58
6.4	Tercera etapa	61
6.4.1	Identificación cualitativa de AC	62
6.4.2	Cuantificación de AC	64
CAPITULO7.	CONCLUSIONES	68
CAPITULO8.	ANEXOS	70
Anexo I		70
Anexo II		71
Anexo III		76
CAPITULO9.	BIBLIOGRAFIA	80

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos clorogénicos (ACGs) son ésteres formados entre ciertos ácidos hidroxicinámicos y ácido quínico (AQ). Con la hidrólisis de algunos de ellos se producen ácido caféico (AC) y ácido quínico (AQ), que son compuestos que tienen amplias aplicaciones en la industria de alimentos, farmacia y medicina, razón por la cual tienen un alto valor agregado. Los ACGs forman parte de la química del café verde, lo que hace posible que con su hidrólisis se puedan obtener AC y AQ como subproductos, implicando un beneficio en contra de la fuerte crisis que el café ha atravesado en los últimos años. El AC comúnmente se obtiene a partir de ácido clorogénico (ACG), los métodos que generalmente se han empleado son químicos. Estas técnicas son poco eficientes, pues se tienen rendimientos muy bajos del producto final; por esta situación se han buscado otras alternativas como el uso de métodos enzimáticos, ya que con el empleo de enzimas los procesos son más eficientes y baratos, pues se obtienen mejores rendimientos del producto final.

Los precios del café en los mercados mundiales, que alcanzaban un promedio de 120 centavos de dólar por libra en la década de los 80s, en los años 2001 y 2002 se situaron alrededor de 50 centavos, que es el precio más bajo en términos reales, en los últimos 100 años. La caída de los precios fue consecuencia del desequilibrio entre la oferta y la demanda. La producción de café estaba creciendo a razón de un 3.6 %, pero la demanda aumentaba a razón del 1.5 % solamente (www.ico.org/ed/crisisc.pdf, **2002**). Para resolver esta crisis, en febrero de 2002 la Organización Internacional del Café (OIC), formuló el “Programa de mejora de la calidad del café”, que dio comienzo el 1° de octubre de 2002. Este programa pretende beneficiar a los consumidores, al tener mejores niveles de calidad de las mezclas de cafés en general; y a los productores, al reducir el exceso de producción, ya que se elimina del mercado el café de baja calidad implicando una mejora en los precios del producto. En el 2003 el precio del café se elevó hasta aproximadamente 70 centavos de dólar por libra y se espera que en los años próximos siga creciendo (www.ico.org/ed/crisisc.pdf, **2002**).

El café verde que se desecha por no cumplir con la calidad requerida puede convertirse en una materia prima importante, ya que contiene ACGs que podrían

recuperarse para obtener AC y AQ.

El objetivo de este trabajo fue obtener AC del café verde nacional, aplicando un nuevo método enzimático para la hidrólisis de los ACGs del café verde que pudiera aplicarse a escala industrial. Por lo que, en una primera etapa se implementó una técnica de extracción para la recuperación de ACGs de las diferentes fuentes de café verde utilizadas; en una segunda etapa, se identificó cuál de las fuentes tuvo mayor contenido de ACG, cuantificando la cantidad obtenida en la primera etapa. Finalmente, en una tercera etapa se realizó la hidrólisis enzimática del ACG recuperado para obtener el AC. Se trabajó con verde obtenido de los estados con mayor producción, como son: Chiapas, Veracruz, Oaxaca e Hidalgo.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES



2.1 EL CAFÉ.

2.1.1 Generalidades.

El nombre café se deriva de la pronunciación turca, kahveh, de la palabra árabe *gahweh* (Kirk-Othmer y cols., **1983**; Francis, **1997**). Café es el nombre con el que se designan las semillas de las plantas del género *Coffea* (Fig. 2.1) desprovistas por completo de sus vainas y en lo posible de sus tegumentos (envoltura plateada), en estado crudo, tostado, enteras o molidas; y a la bebida preparada con ellas (Belitz, **1997**).

El café nace en África (Etiopía, Abisinia), se difundió por Arabia y Constantinopla hasta Venecia, extendiéndose por Europa desde mediados del siglo XVII. Arabia y las zonas cercanas permanecieron como las únicas fuentes de abastecimiento para el café hasta 1658, cuando los holandeses introdujeron la *Coffea arabica* a Ceilán y a Java en 1699. Unos veinte años después de establecerse en Java, los embarques de *C. arabica*, vía París, a la Martinica y otros países, proporcionaron el núcleo para que el café arábigo se propagara en casi todas las plantaciones actuales del Nuevo Mundo (Belitz, **1997**; www.infoagro.com, **2002**).

La superficie del fruto al principio es verde, posteriormente se colorea de rojo o violeta al madurar y contiene en su pulpa (mesocarpio) dos semillas que contactan por su cara lisa. Exhiben un surco, están envueltas por una membrana llamada tegumento y luego recubiertas por el endocarpio. Para un buen desarrollo del árbol de café están

indicados los territorios tropicales de mediana altitud con temperaturas de 15 y 25 °C, a 600-1200 m sobre el nivel del mar (Belitz, **1997**).

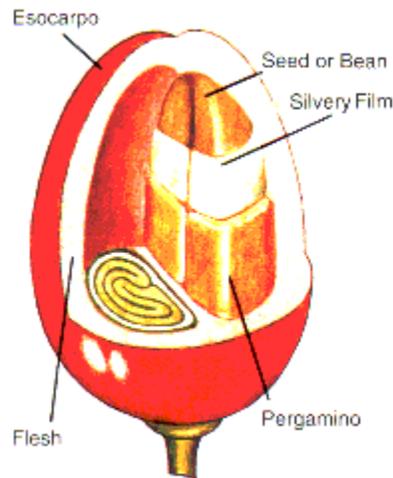


Fig. 2.1 Disección de un grano de café.

2.1.2 *Especies y variedades.*

Hay cuatro especies o grupos principales, que se cultivan ampliamente y constituyen los cafés del comercio: café arábigo (*Coffea arabica*), café robusta (*Coffea canephora*), café liberiano (*Coffea liberica*), y café excelso (*Coffea excelsa*); además, existe una gran cantidad de otras especies llamadas económicas, que se plantan en escala local y normalmente no entran a los canales comerciales (Belitz, **1997**; Rogers y cols., **1999**; Guerrero y cols., **2001**; Ky y cols., **2001**; www.infoagro.com, **2002**).

2.2 CAFÉ CRUDO.

2.2.1 *Café verde.*

El café crudo o también llamado café verde, son las semillas de las plantas del café desprovistas por completo de sus vainas y cáscara. Los cafés de zonas altas en general son más apreciados que los de tierras bajas pues presentan mejores características de calidad (Belitz, **1997**).

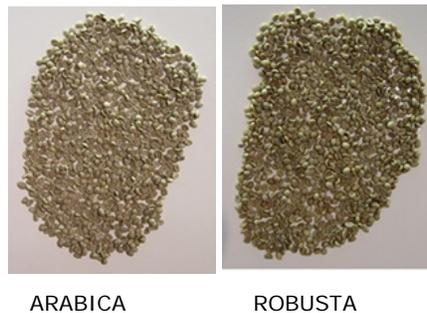


Fig. 2.2 Semillas de café verde.

2.2.2 *Recolección y tratamiento.*

En el hemisferio boreal, la recolección se efectúa entre los meses de diciembre y febrero, mientras que al sur del ecuador es en los meses de mayo a agosto. Los frutos son recolectados, luego se les elimina la pulpa para obtener el grano comercial, lo que se realiza por dos procedimientos: Preparación seca y preparación húmeda. La preparación seca es practicada casi exclusivamente en Brasil. Los frutos recolectados se secan al sol hasta que las semillas se desprenden de la cáscara. Con máquinas descascarilladoras de tornillos sin fin cónicos, se retiran la pulpa, endocarpio y tegumento. El café descascarillado obtenido, se clasifica y se envasa. La preparación húmeda es más cara, moderna y habitual en los cafés *arabica* de América Central, Colombia y África. En este método se llevan los frutos al despulpador, que mediante un sistema de discos y rodillos graduables de superficie áspera, eliminan la pulpa por compresión sin dañar las semillas; éstas se pasan por tamices y posteriormente se secan al sol, se descascarillan y se envasan (Sivetz, **1963**; Kirk-Othmer, **1983**; Cervantes, **1996**; Belitz, **1997**).

2.2.3 Clases de café crudo.

La especie *Coffea arabica* es el 80-90 % de la producción mundial, *Coffea canephora* corresponde al 20 % aproximadamente y *Coffea liberica* es alrededor del 1 %. El café de mayor calidad lo proporciona *C. arabica*, seguido por *C. canephora* y por último *C. liberica* (Belitz, **1997**; Ky y cols., **2001**; www.infoagro.com, **2002**).

La categorización del café crudo se realiza atendiendo al tamaño, color, forma, consistencia y corte de los granos. El café debe cumplir con el Programa de mejora de la calidad del café descrito en la resolución 407 de la OIC. Los granos deficientes como semillas inmaduras, congeladas y verdes, granos dañados por la lluvia e insectos, y granos deficientemente desecados deben ser retirados (Sivetz, **1963**; Belitz, **1997**; www.ico.com, **2002**; Franca y cols., **2005**).

2.2.4 Programa de mejora de la calidad del café. Normas mínimas para el café de calidad exportable. Resolución 407 de la OIC.

En febrero de 2002, la OIC (Organización Internacional del Café) formuló el “Programa de mejora de la calidad del café”, que dio comienzo el 1º de octubre de 2002. En él se determinan grados de calidad mínima y de humedad máxima para el café destinado a la exportación. Este programa pretende beneficiar a los consumidores, al tener mejores niveles de calidad de las mezclas de cafés en general; y a los productores, al reducir el exceso de producción. A continuación se mencionan algunos de los puntos contenidos en la resolución 407 (www.ico.com, **2002**).

1. Los miembros exportadores no deberán exportar café que:

a) Si es arábico, tenga más de 86 defectos por muestra de 300 g (método Brasil de clasificación de café verde, o equivalente); y si es robusta, tenga más de 150 defectos por 300 g (Vietnam, Indonesia, o equivalente).

b) Tanto si es Arábica como Robusta, tenga un contenido de humedad de menos del 8% o de más del 12.5%.

2. Cuando ya se consigan en la actualidad porcentajes por debajo del 12.5, los miembros deberán hacer todo lo posible para que esos niveles se mantengan o disminuyan.

3. Los miembros exportadores emitirán certificados de origen de la OIC, únicamente a partidas de café que cumplan las normas del nivel mínimo de defectos y de humedad.

2.3 EL CAFÉ EN MÉXICO.

2.3.1 *México y el café.*

El café fue introducido a nuestro país desde 1795. Es un cultivo de una enorme trascendencia económica, social, cultural y ecológica. Al ser el producto agrícola principal de exportación durante los últimos años, su cultivo ha colocado a México en importantes posiciones internacionales, pues comparte hoy en día con India, el cuarto lugar por su producción, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam (Moguel y cols., 1996).

Participación en el mercado internacional de los principales productores de café

Países principales	% de participación
Brasil	30.4
Colombia/ Indonesia	11.2
Vietnam	10.2
México/India	4.4
Guatemala	3.6

Tabla 2.1 Participación en el mercado internacional de los principales productores de café. FUENTE: ASERCA CON DATOS DE USDA TROPICAL PRODUCTS: "WORLD MARKETS AND TRADE DICIEMBRE 2003". (www.ico.com).

2.3.2 Productores de café en México.

De acuerdo con el Censo del Inmecafé, hacia 1989 la producción del aromático se concentraba en alrededor de 4300 localidades, distribuidas en 411 municipios y en doce estados de la República. La superficie cultivable se estima entre 700 000 y 800 000 hectáreas (Censo Agropecuario 1991), una superficie que puede variar año con año de acuerdo con las expectativas económicas que presenté su cultivo. A diferencia de lo que ocurre en Brasil y Colombia, en nuestro país el café lo producen principalmente las familias campesinas e indígenas y a pequeña escala. El 92% de la superficie cultivada corresponde a propietarios con predios de menos de 5 hectáreas o a 70% con no más de dos hectáreas. Éstos representan 65% de la superficie cafetalera del país y casi la mitad del total de producción, pues un tercio lo generan los propietarios con más de 10 hectáreas y el 20% restante los de entre 5 y 10 hectáreas; 60% de los productores pertenecen a ejidos y comunidades indígenas, y 38% son propietarios privados (Moguel y cols., 1996).

Municipios, localidades, superficie y productores de café en México

<i>Estado</i>	<i>Número de municipios cafetaleros</i>	<i>Número de localidades cafetaleras</i>	<i>Superficie cultivada de café (en ha)</i>	<i>Número de productores</i>	<i>Producción en quintales</i>
Colima	5	28	2 170	795	8 935
Chiapas	69	1 418	211 950	28 620	2 318 014
Guerrero	10	73	40 620	8 389	254 336
Hidalgo	18	473	43 100	23 746	451 372
Jalisco	1	10	2 080	308	6 398
Nayarit	7	49	19 000	3 288	157 825
Oaxaca	117	771	176 980	57 052	1 097 296
Puebla	47	442	67 700	14 136	1 184 286
Querétaro	1	3	614	313	4 592
San Luis	8	247	31 150	16 100	203 970
Potosí	2	29	1 690	950	5 600
Tabasco	72	783	134 430	44 908	1 703 180
Veracruz				198 605	
Total	357	4 326	731 484	198 605	7 395 804

Tabla 2.2 Producción de café en México. FUENTE: CENSO INMECAFE, 1989, (Moguel y cols., 1996).

2.3.3 Zonas de producción de café en México.

La distribución que presenta este cultivo en México es muy amplia, con altitudes que van desde 300 hasta casi 2000 metros sobre el nivel del mar, con una gran diversidad de climas, suelos y vegetación. Pero se desarrolla mejor entre 600 y 1200 metros sobre el nivel del mar encontrándose fundamentalmente en zonas cerriles y montañosas de las dos vertientes: la del Golfo de México y la del Pacífico. Por lo tanto, los principales estados productores por orden de importancia son: Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Hidalgo y Guerrero (Moguel y cols., 1996; Cervantes, 1996).

Desde el punto de vista biológico, las áreas cafetaleras coinciden con regiones muy ricas en flora y fauna, por lo que Oaxaca, Veracruz y Chiapas son sitios con un enorme valor para la conservación de la biodiversidad (Moguel y cols., 1996).



Fig. 2.3 Estados productores de café en la República Mexicana.

2.3.4 Sistemas de producción.

En México se pueden diferenciar dos modalidades de producción, café bajo sombra y sin sombra, dentro de las que es posible distinguir cinco sistemas productivos: rusticano, policultivo tradicional, policultivo comercial, monocultivo de sombra y monocultivo de sol. A continuación se describe cada sistema (Moguel y cols., 1996).

Sistema rusticano o de montaña

Es la simple sustitución de las plantas del piso de las selvas o bosques por matas de café. Este sistema afecta en forma mínima el ecosistema forestal, pues se mantiene la cubierta original de árboles. Es realizado básicamente por grupos indígenas, sin uso de agroquímicos y con un rendimiento bajo.

Policultivo tradicional o “jardines de café”

Se trata del estado más avanzado de manipulación del ecosistema forestal nativo. En este sistema se introduce el café debajo de los bosques o selvas originales, pero a diferencia del sistema anterior, el café es acompañado de numerosas especies de plantas útiles (cacao, naranja, plátano, mamey, chicozapote, aguacate, achiote, zapote negro, bambú y guayaba). El resultado es un exuberante “jardín de café”, con gran variedad de especies arbóreas, arbustivas y herbáceas tanto de la vegetación natural como de las cultivadas, nativas e introducidas. Bajo este sistema, existe un empleo eventual de agroquímicos y los rendimientos obtenidos resultan en muchos casos comparables a los de sistemas modernos.

Policultivo comercial

Consiste en la total remoción de los bosques y selvas originales y la introducción de un conjunto de árboles de sombra apropiados para el cultivo del café. Son plantaciones homogéneas donde sólo se utiliza una variedad de café. La diversidad biológica y productiva es considerablemente menor que en el caso anterior.

Monocultivo bajo sombra

Es un sistema moderno, introducido al país por Inmecafé en la década de los setenta. Se utiliza en forma casi única y natural los árboles de una leguminosa (del género *Inga*). De ésta forma se crea una plantación monoespecífica bajo un sistema igualmente

especializado. En éste sistema el uso de agroquímicos se torna una técnica obligada y la producción está directamente dirigida al mercado.

Monocultivo de sol

En este sistema no hay ninguna cobertura de árboles y hay una exposición directa al sol. Es una plantación especializada, que requiere de grandes insumos de agroquímicos, maquinaria y mano de obra. En este sistema se alcanzan los más altos rendimientos de café por unidad de superficie.

2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CAFÉ CRUDO.

La composición química del café verde puede afectar la calidad del sabor en el café tostado. La química puede variar de acuerdo a la especie, variedad, altitud, origen, medio de cultivo, manipulación poscosecha (proceso de preparación seco y húmedo), tiempo de almacenamiento, temperatura y humedad (Kirk-Othmer, **1983**; Belitz, **1997**; Francis, **1997**; www.incae.com, **1998**; Franca y cols., **2005**).

En la tabla 2.3 se muestra la composición química del café verde de las especies *robusta* y *arabica*. La especie *robusta* generalmente tiene un bajo contenido de lípidos, trigonelina y sacarosa; y un alto nivel de cafeína y ACGs al compararse con la especie *arabica*. Ambas especies tienen un contenido de proteína muy similar. Las semillas preparadas con el proceso húmedo, tienen un contenido muy bajo de minerales comparándolas con las semillas preparadas en seco (Kirk-Othmer, **1983**; Francis, **1997**; Ky y cols., **2001**).

La pulpa y cáscara del café son de interés actual, por su potencial biotecnológico en la producción de enzimas, ácidos orgánicos y compuestos de sabor y aroma. La cafeína está presente en la pulpa y cáscara en un 3 % de base seca. El contenido de taninos, que representan un factor antinutricional, difiere dependiendo del tipo de cultivo (Pandey y cols., **2000**; Ulloa y cols., **2002**).

Composición del café verde (cifras en % de base seca. Valor típico e intervalo)

Componente	Especies	
	<i>Robusta</i>	<i>Arabica</i>
Humedad	11(10-13)	12.5(10-13)
Lípidos	10(7-11)	15(14-17)
Cenizas	4.2(3.9-4.5)	4.0(3.5-4.5)
Cafeína	2.0(1.5-2.6)	1.3(1.1-1.4)
Ácidos clorogénicos	9(7-10)	7(5-8)
Ácidos carboxílicos	2(1-3)	2.5(1.5-3.5)
Trigonelina	0.7(0.3-0.9)	1.1(0.9-1.2)
Proteína	11(9-13)	11(9-13)
Aminoácidos libres	0.8	0.5
Sacarosa	4(3-6)	8(5-9)
Azúcares reductores	0.5(0.4-0.6)	0.1(0.1-0.2)

Tabla 2.3 Comparación de la composición química del café *robusta* y *arabica*. Datos obtenidos de Ky y cols., 2001 y Kirk-Othmer, 1983.

2.5 LOS ÁCIDOS CLOROGÉNICOS (ACGs).

2.5.1 Generalidades.

Los ACGs son una familia de ésteres formados entre ciertos ácidos *trans*-cinámicos y ácido quínico (fig. 2.26, pág. 36). Se pueden nombrar tres grandes grupos de ácidos clorogénicos, los cuales son ácidos cafeoilquínicos (ACQs), ácidos feruloilquínicos (AFQs) y ácidos dicafeoilquínicos (AdiCQs). Estos grupos contienen tres isómeros que se mostrarán más adelante. El más común y más disponible comercialmente es el ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-ACQ), también conocido como ácido 3-cafeoilquínico (3-ACQ) y comúnmente llamado ácido clorogénico (ACG). Al ácido 3-*O*-cafeoilquínico (3-ACQ) se le conoce como ácido neoclorogénico; el ácido 4-*O*-cafeoilquínico (4-ACQ) es nombrado como ácido criptoclorogénico y a la mezcla de varios AdiCQs se les llama ácidos isoclorogénicos (Clifford, 2000; Rice y cols., 2001).

En este trabajo se referirá al ácido 5-cafeoilquínico o 5-*O*-cafeoilquínico, como el ácido clorogénico abreviado como ACG; cuando se presenten las siglas ACGs, se estará refiriendo al total de ácidos clorogénicos. La estructura del ACG se muestra en la figura 2.4.

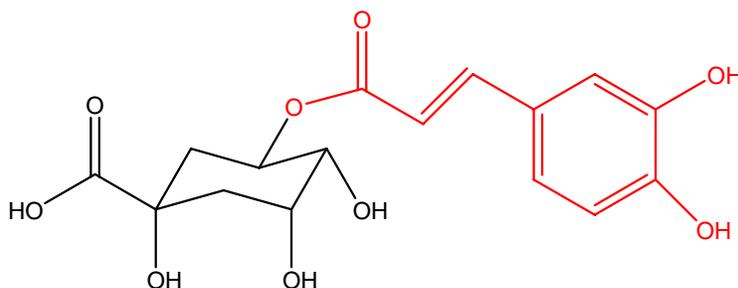


Fig. 2.4 Estructura del ACG.

2.5.2 *Propiedades fisicoquímicas.*

El ACG o ácido 3-(3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil)-1,4,5-trihidroxiciclohexancarboxílico, $C_{16}H_{18}O_9$, presenta las siguientes características: PM 354 g/mol, p.f. 203-205°C, UV: 243, 300, 330 nm. Físicamente son cristales de color crema, solubles en agua, acetona y alcoholes (Cervantes, **1996**; The Merck Index, **2001**).

2.5.3 *Fuentes de ACGs.*

Los ACGs están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Iwahashi y cols., **1984**; Friedman, **1997**; Chen y cols., **1997**; Chuda y cols., **1998**; Kweon y cols., **2001**; Pontes y cols., **2002**), se encuentran en numerosas frutas y verduras. En las tablas 2.5 y 2.6, se muestra el contenido de ACGs en las frutas y verduras en las que se encuentran más abundantemente, y en la tabla 2.4 se muestran las fuentes más importantes de ACGs por el alto contenido que presentan de estos compuestos.

Fuentes más importantes de ACGs

FUENTE	%
Alcachofa	10-15
Café verde	5-8
Té de mate	3.7
Ciruela pasa	0.73
Papa	0.14
Semilla de girasol	0.1

Tabla 2.4 Contenido de ACGs en porcentaje en base seca, en diferentes vegetales. Datos obtenidos de Kirk-Othmer, 1983; Kopsch y cols., 1989; Clifford, 2000; Nakatani y cols., 2000; Pedrosa y cols., 2000; Llorach, 2002.

Contenido de ACGs en frutas

ACGs	Manzana	Pera	Cereza	Ciruela	Durazno	Albaricoque	Mora	Black currant	Mora azul	Níspero
5-ACQ	26-510	10-516	11-140	15-142	30-282	37-123	t-3	1-2	1851-2075	329-907
4-ACQ	t-12	-	1-21	6-100	-	T	1	3-5	2-5	5-43
3-ACQ	-	-	73-620	88-771	29-142	26-132	41-52	38-48	5-7	95-207
AFQ	2-4	-	t-13	1-34	2-9	5-22	2-4	1-3	8	28-145

Tabla 2.5 Contenido de ácidos cafeoilquínicos (ACQ) y feruloilquínico (AFQ) en miligramos por kilogramo de masa fresca, base húmeda; t = trazas; y (-) = no detectable (Rice y cols., 2001).

Contenido de ACGs en verduras

ACGs	Tomate	Col	Brócoli	Rábano	Lechuga	Endibia	Alcachofa	Papa	Zanahoria
5-ACQ	12-71	t-10	t	2	5-39	36-124	433	22-71 ^b	5-541
4-ACQ	5-11	2-19	3	-	-	-	11	4-20	T
3-ACQ	11.2	6-120	58	t	-	-	12	3-9	t-9
Adi-CQ	-	-	-	-	-	-	160-260 ^a	3	1-58
AFQ	2	2-17	-	-	-	-	-	-	t-83
Adi-FQ	-	-	-	-	-	-	-	-	t-17

Tabla 2.6 Contenido de ácidos cafeoilquínicos (ACQ) y feruloilquínico (AFQ) en miligramos por kilogramo de masa fresca, base húmeda; t = trazas; (-) = no detectable; (^a) = Estimado de cinarina (1,3 AdiCQ); (^b) = Alrededor de 229.1 en cáscara de papa (Rice y cols., 2001).

2.5.4 ACGs del café.

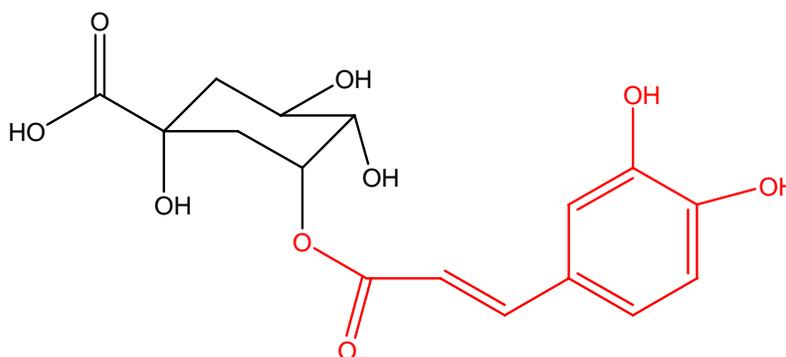
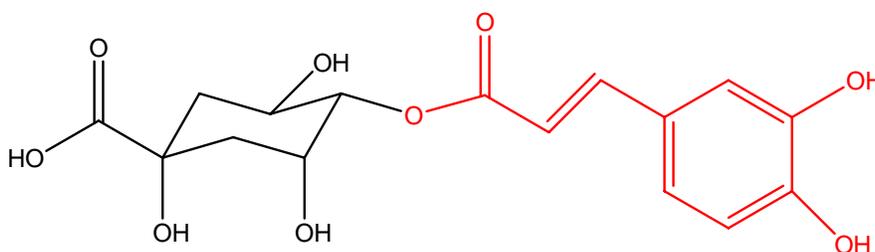
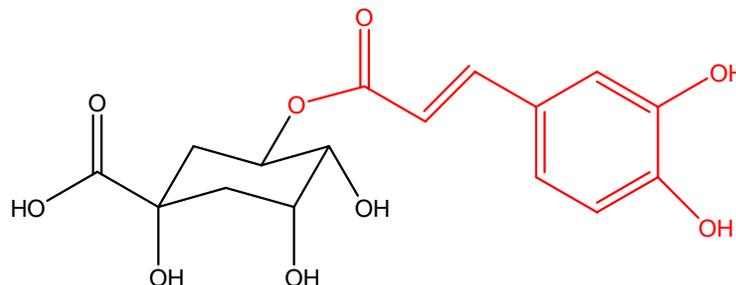
El contenido de ACGs en café varía en función a la especie, a la etapa de desarrollo y a las condiciones de cultivo en las plantas. La concentración de los tres grupos que constituyen los ACGs (ACQ, AdicQ y AFQ) presentes en café verde, varía en función a la especie de forma tan importante que incluso hay grandes variaciones entre genotipos de la misma especie (Guerrero y cols., **2001**).

Por lo general, se reporta un contenido promedio de 7-8 % de ACGs en café verde de la especie *C. arabica* y el contenido de 5-ACQ promedio reportado (peso en base seca) es de 3-5 % (Franca y cols., **2005**); sin embargo, se han encontrado contenidos (peso en base seca) de 1.2 a 3.8 % solamente (Pchelkin, **2003**). Se sabe que el contenido de ACGs varía si el grano está dañado, pues el 5-ACQ se ha encontrado en un 1.8 % (peso base seca) en granos negros (Franca y cols., **2005**).

A continuación se muestra el contenido de cada grupo de ACGs y de sus isómeros en las especies *C. arabica* y *C. robusta o canephora* (Datos obtenidos de Ky y cols., **2001**).

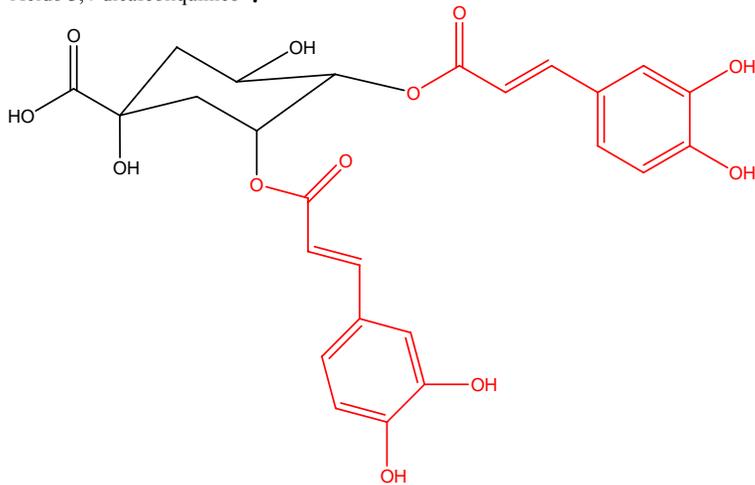
Ácidos Cafeoilquínicos.

Estos son los compuestos mayoritarios del contenido total de ACGs del café verde, están en un 3.26 % (peso en base seca) en el café arábica, en donde el 5-ACQ y 4-ACQ aportan el 3.06 % (el 5-ACQ es mayoritario en un 75.3 %) y el 3-ACQ aporta el 0.2 % restante. En el café robusta están presentes en un 7.66% (peso en base seca), el 5-ACQ y 4-ACQ aportan el 6.86 % y el 3-ACQ aporta el 0.81 %.

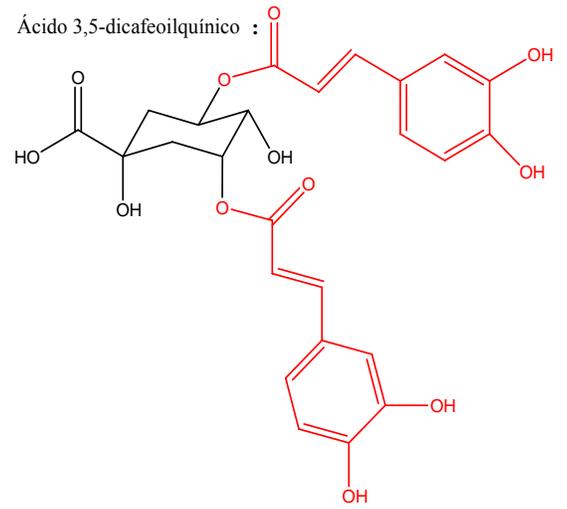
Ácido 3-*O*-cafeoilquínico (Ácido neoclorogénico) :Ácido 4-*O*-cafeoilquínico (Ácido criptoclorogénico) :Ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Ácido clorogénico) :**Fig. 2.5** Ácidos cafeoilquínicos del café verde.*Ácidos dicafeoilquínicos.*

En lo que corresponde a este grupo, están presentes en un 0.6 % (peso en base seca) en el café arábica, en donde el 3,4-AdiCQ aporta el 0.12 %, el 3,5-AdiCQ aporta el 0.23 % y el 4,5-AdiCQ el 0.25 %. En el café robusta están en un 2.31 % (peso en base seca), en donde el 3,4-AdiCQ, el 3,5-AdiCQ y el 4,5-AdiCQ aportan el 0.77, 0.71 y 0.83 % respectivamente.

Ácido 3,4-dicafeoilquínico :



Ácido 3,5-dicafeoilquínico :



Ácido 4,5-dicafeoilquínico :

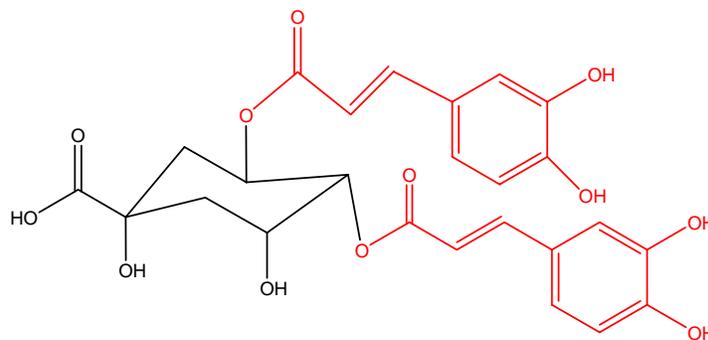
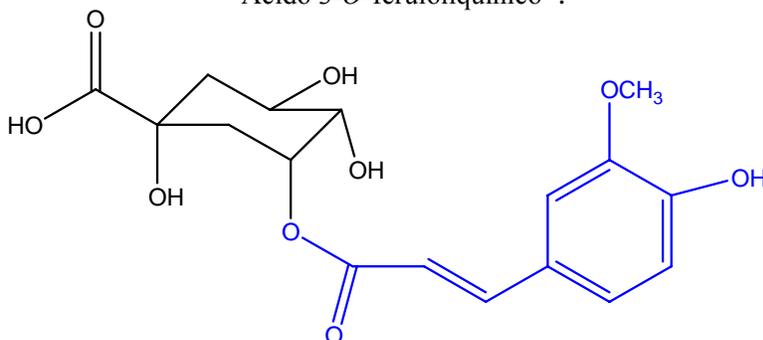
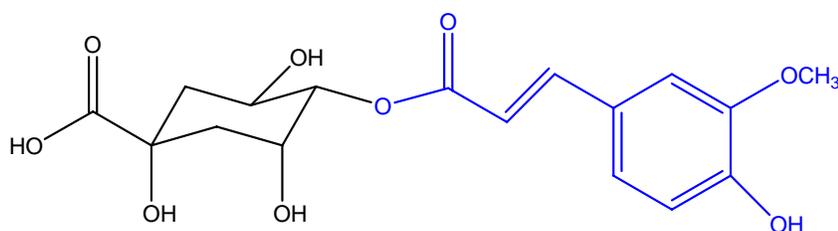
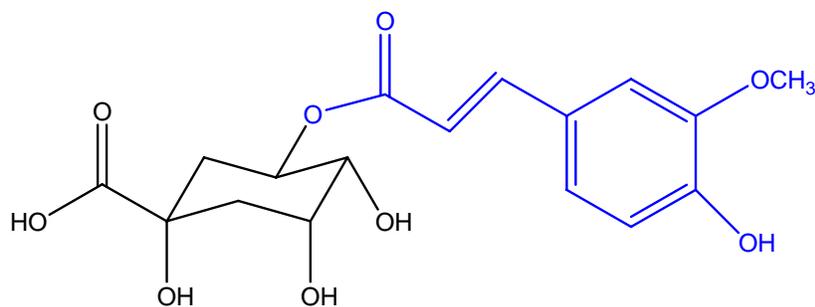


Fig. 2.6 Ácidos dicafeoilquínicos del café verde.

Ácidos feruloilquínicos.

Este último grupo se encuentra en café arábica en un 0.19 %, en donde el 0.15 % lo aporta el 5-AFQ y el 0.04 % restante los demás isómeros. En el café robusta están en un 1.43 %, de donde el 5-AFQ aporta el 1.17 % y los otros dos isómeros aportan el 0.26 %.

Ácido 3-*O*-feruloilquínico :Ácido 4-*O*-feruloilquínico :Ácido 5-*O*-feruloilquínico :**Fig. 2.7** Ácidos feruloilquínicos del café verde.

2.5.5 Métodos de obtención de ACGs.

El interés que surgió por los ACGs debido a sus propiedades, motivó la creación de métodos que permitieran su obtención de las diferentes fuentes en que se encuentran.

El primer paso para la obtención de ACGs es extraerlos de las diferentes fuentes que lo contengan, para hacer una separación y purificación posteriores. Para hacer la extracción se emplean generalmente metanol o etanol a una temperatura de 4°C, mezclas de estos disolventes con agua en diferentes proporciones, o también se pueden extraer con agua hirviendo (Rodríguez de Sotillo y cols., **1994a**; Ky y cols., **1997**; Guerrero y cols., **2001**; Llorach y cols., **2002**). Para hacer la separación, purificación y cuantificación se han desarrollado diferentes métodos de análisis que se mencionan a continuación.

2.5.6 Métodos de análisis de ACGs.

Purificación

Los métodos de purificación empleados generalmente eran muy laboriosos, tanto para los intereses en investigación de cuantificar el contenido de ACGs en las diferentes fuentes, como para su obtención en escala comercial. Por lo cual se desarrollaron alternativas de obtención y purificación. Los polisacáridos modificados y especialmente las dextranas, tienen una capacidad de retención selectiva en los ACGs; un material particularmente apropiado, para la separación son los geles conocidos con el nombre de SEPHADEX.RTM. En 1989 Kopsch y cols., patentaron un método simple que requiere de pocos pasos en el proceso, por lo que se aplica a escala comercial. Con este método, los ACGs contenidos en el material crudo, se pueden obtener y aislar casi por completo.

Cuantificación

Con el desarrollo que ha tenido la técnica de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se ha logrado un gran avance en el análisis de los ACGs. La técnica consiste comúnmente en el uso de columnas fase reversa, constituidas de sílica con partículas de 40 µm parcialmente modificadas con enlaces covalentes de octadecilsilano (ODS); se emplea una bomba de presión constante y un detector de absorción UV a una longitud de onda aproximada a 325 nm; longitud de onda en donde normalmente se detectan estos compuestos (Iwahashi y cols., **1984**; Rodríguez de Sotillo y cols., **1994a**; Ky

y cols., **1997**; Moon y cols., **1998**; Casal y cols., **1999**; Gillet y cols., **1999**; Nakatani y cols., **2000**; Pedrosa y cols., **2000**; Jham y cols., **2002**; Llorach y cols., **2002**; Nardini y cols., **2002**; Nuutila, **2002**; Pontes y cols., **2002**; Nishitani y cols., **2004**). El mayor avance que se tiene actualmente del HPLC con columna apolar, es su acoplamiento a espectrometría de masas (EM), pues además de una identificación exacta, este método ha servido para estudios relacionados con la distribución de los isómeros de ACGs en diferentes compartimentos biológicos como sangre, plasma y orina humanas (Tolonen y cols., **2002**; Bastos y cols., **2004**). La electroforesis capilar es una técnica que se ha aplicado recientemente para el análisis de ACGs en plantas, su acoplamiento con EM ha aumentado la sensibilidad del método y la eficiencia de la identificación de compuestos (Bastos y cols., **2004**).

2.5.7 Propiedades y usos de los ACGs.

Los ésteres de ácido caféico han atraído la atención de la biología y la medicina, pues estos compuestos muestran propiedad anticarcinogénica, antiviral, antibacterial, vasoactiva, antiproliferativa y antiinflamatoria. Estas actividades están particularmente relacionadas con su propiedad antioxidante (Pauli y cols., **1998**; Filip y cols., **2000**; Rajan y cols., **2001**; Sefkow, **2001**), por su alta actividad antioxidante pueden prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que juegan un papel clave en la arterogénesis. En especial, el ácido clorogénico, 5-CQA, ha sido ampliamente reconocido por ser un antioxidante de las LDL humanas (Nakatani y cols., **2000**; Cartron y cols., **2001**). Diversos estudios epidemiológicos han reportado que el café puede disminuir los riesgos de cánceres humanos, especialmente el cáncer colorectal, pues se ha descubierto que los ácidos clorogénicos contenidos en el café, han inhibido la carcinogénesis en ratas y hámsteres (Clifford, **2000**; Mori y cols., **2000**). El 5-ACQ es un buen hepatoprotector (Gillet y cols., **1999**). Recientes descubrimientos revelan que el consumo de café, disminuye el riesgo de diabetes y se cree que el responsable es el ACG (Khramov, **2000**; McCarty, **2005**). Debido a las amplias propiedades que presenta el ACG, un extracto de semillas de café verde enriquecido con ACGs (55 %), esta disponible comercialmente (McCarty, **2005**). El ACG es empleado como fuente de AC y AQ, ya que con su hidrólisis

se obtienen ambos compuestos (Cheetham y cols., 2000; The Merck Index, 2001).

2.6 ÁCIDO CAFÉICO.

2.6.1 Generalidades.

El AC forma parte de los ácidos hidroxicinámicos (AHC) los cuales son ácidos fenólicos que pertenecen a la serie de ácidos *trans*-3-fenilpropenóicos conocidos como *ácidos cinámicos*, pues derivan de la molécula de ácido cinámico formando cuatro estructuras básicas: ácidos caféico, ferúlico, cumárico y sinápico. Estos compuestos están clasificados dentro de los Fenilpropanoides, que es el nombre con el que se le conoce a los compuestos responsables de la actividad biológica que presentan las plantas medicinales (Clifford, 2000; Khramov y cols., 2000; Rice y cols., 2001; Kurkin, 2003).

Los AHC y sus derivados están ampliamente distribuidos en las plantas, dicha distribución varía en función a la especie, edad y modo de cultivo de la planta. Estos compuestos forman parte de la estructura de la pared celular y juegan un papel importante en el mecanismo de defensa de su sistema biológico contra microorganismos patógenos; así como en sus cualidades organolépticas y nutritivas en el caso de frutas, vegetales y productos derivados, como jugos, vinos y sidras. Además, sus propiedades antioxidantes son esenciales en la estabilidad de los productos alimenticios (Faulds y cols., 1993; Bartolomé y cols., 1997; Friedman, 1997; Clifford, 2000; Rice y cols., 2001; Kurkin, 2003; Asther y cols., 2005). La estructura del AC se presenta en la figura 2.8.

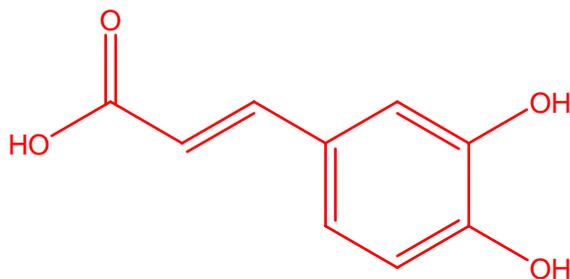


Fig. 2.8 Estructura del AC.

2.6.2 Propiedades fisicoquímicas.

El AC, ácido 3,4-dihydroxicinámico o ácido 3-(3,4-dihydroxifenil) propenóico, $C_9H_8O_4$, presenta las características siguientes: PM 180 g/mol, p.f. 218-222°C, UV. 247, 299, 327 nm. Físicamente son cristales de color amarillo, solubles en agua caliente y alcoholes (The Merck Index, **2001**).

2.6.3 Fuentes de AC.

Los AHC en sus formas libres se encuentran como trazas en frutas y vegetales, pero haciendo una comparación se ha encontrado que el AC es el más abundante de los ácidos hidroxicinámicos presentes.

Fuentes más importantes de AC

FUENTE	PRODUCTO
Frutas	manzana, uva, ciruela pasa, mora azul.
Verduras	papa, tomate, col roja, alcachofa
Semillas	café, girasol
Plantas	mate, olivo
Plantas medicinales	<i>Echinacea purpurea</i> , <i>Cerasus serrulata</i> , <i>Rhodiola rosea</i> , <i>Papulus balsamífera</i> , varias especies de Lamiacea como <i>Melissa officinalis</i>
Otros	café soluble, sidras, vino

Tabla 2.7 Diferentes fuentes de AC. Datos obtenidos de Onyeneho, **1993**; Rodríguez de Sotillo y cols., **1994b**; Chen y cols., **1997**; Janicsák y cols., **1999**; Clifford, **2000**; Nakatani y cols., **2000**; Pedrosa y cols., **2000**; Saija y cols., **2000**; Cotelle, **2001**; Rice, **2001**; Silva y cols., **2001**; Bergeron y cols., **2002**; Kurkin, **2003**.

Este compuesto se encuentra en la naturaleza en mayor concentración formando ésteres u otros derivados (Clifford, **2000**; Cotelle, **2001**). Los más importantes son los ésteres que forma con el AQ, como los ACGs (descritos en el capítulo anterior). Los ésteres de AC y AQ están presentes en manzana, aguacate, piña, cereza, durazno, berenjena, níspero, moras rojas, semillas y pulpa de café, té, mora azul, calabaza y han sido reportados

raramente en granos de cebada. Ésteres cafeoilquínicos han sido reportados en varias verduras como coles, alcachofas, zanahorias y endibias. La alcachofa se caracteriza por tener ACG y varios ésteres dicafeoilquínicos, especialmente el ácido 1,3-dicafeoilquínico (1,3-AdiCQ), conocido como cinarina (figura 2.9). El ácido 3,5-dicafeoil-4-succinilquínico (figura 2.10) está presente en guirnaldas (Chuda y cols., **1998**; Rice y cols., **2001**) y varios ácidos cafeoil-metilquínicos (figura 2.11) se encuentran en bambú (Kweon y cols., **2001**; Rice y cols., **2001**).

Ácido 1,3-dicafeoilquínico :

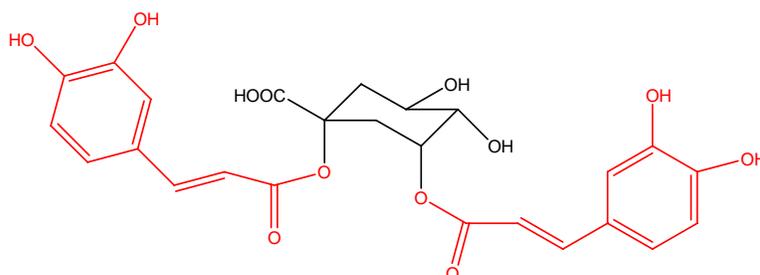


Fig. 2.9 Estructura de la cinarina.

Ácido 3,5-dicafeoil-4-succinilquínico :

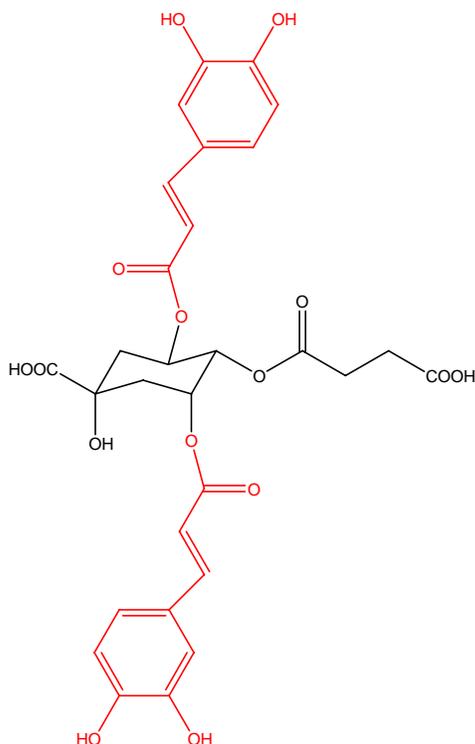


Fig. 2.10 Estructura del ácido 3,5-dicafeoil-4-succinilquínico.

Ácido 3-*O*-cafeoil-1-metilquínico :

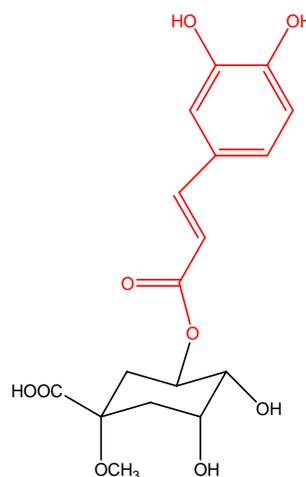


Fig. 2.11 Estructura del ácido 3-*O*-cafeoil-1-metilquínico.

Se ha encontrado ácido cafeoiltartárico o ácido caftárico (figura 2.12) en uva, ácidos cafeoil y dicafeoiltartáricos en lechuga, endivias y achicoria (Cartron y cols., **2001**; Rice y cols., **2001**). Ésteres cafeoilshikímicos (figura 2.13) son muy abundantes en dátiles, en donde participan en el pardeamiento enzimático. El ácido rosmarínico que es un éster caféico de ácido 3,4-dihidroxifeniláctico (figura 2.14) que se encuentra en extractos de varias hierbas culinarias y medicinales, como el tomillo (Rice y cols., **2001**).

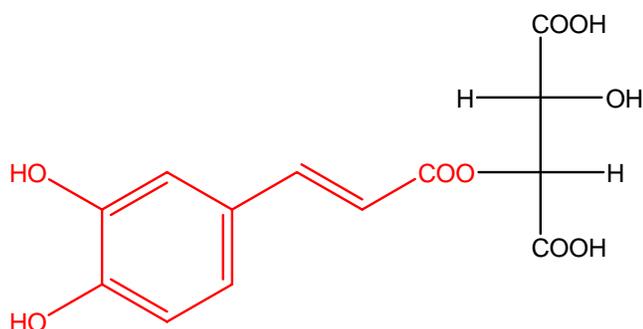


Fig. 2.12 Estructura del ácido caftárico.

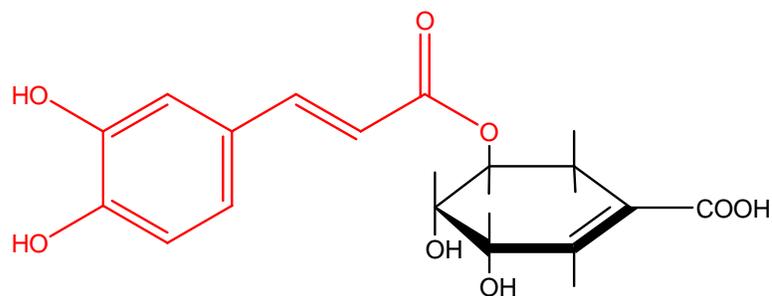


Fig. 2.13 Estructura del ácido cafeoilshikímico.

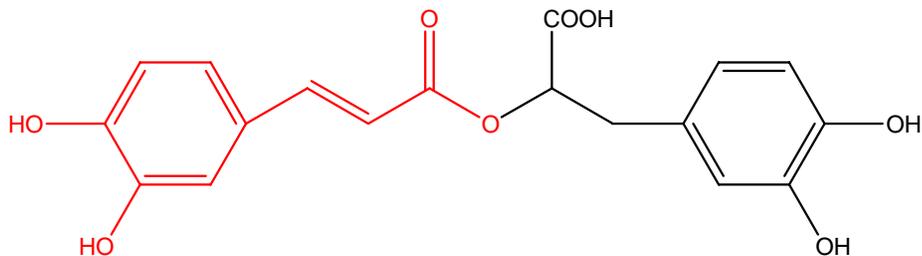


Fig. 2.14 Estructura del ácido rosmarínico.

Los ésteres con azúcares también están presentes en varios vegetales; por ejemplo, la cafeoilglucosa se encuentra en hojas de espinaca y tallos de ruibarbo (figura 2.15). El AC combinado con malvidin 3-glucósido, es una condición común en frutas y vegetales (figura 2.16). Se ha encontrado ácido caféico 3-*O*-glucósido en papa (2.17). Algunos cafeoilglucósidos como el verbascósido (figura 2.18), se han encontrado en diferentes miembros de la familia Oleaceae, por ejemplo en los olivos (Rice y cols., **2001**).

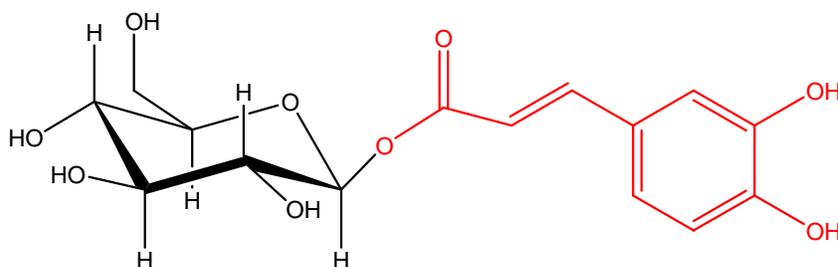


Fig. 2.15 Estructura de la cafeoilglucosa.

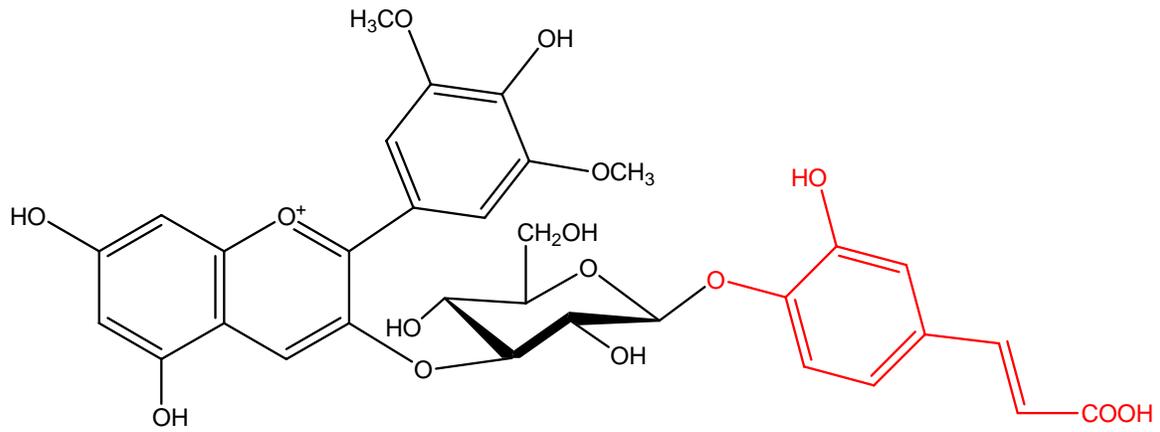


Fig. 2.16 Malvidin 3-(cafeoilglucósido).

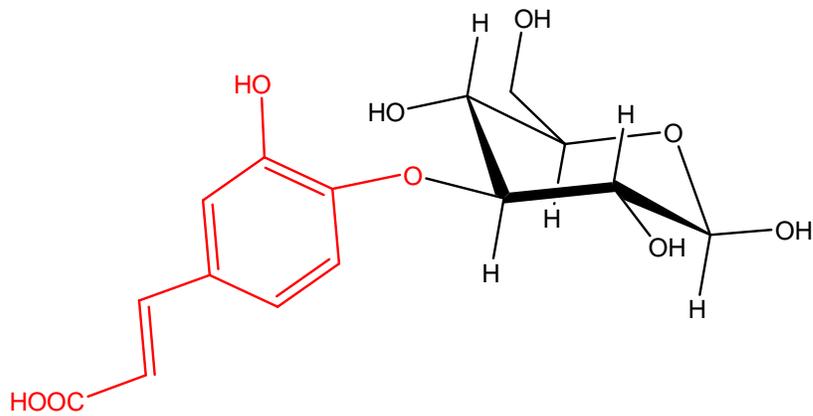


Fig. 2.17 Estructura del ácido caféico 3-O-glucósido.

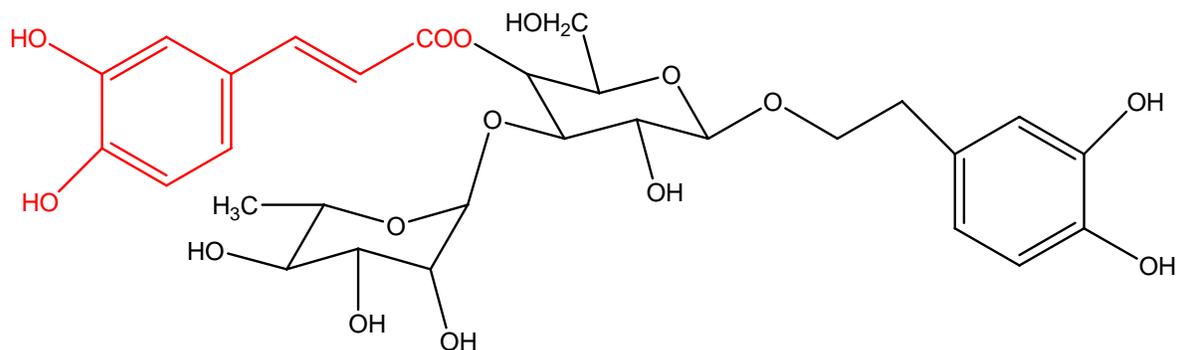


Fig. 2.18 Estructura del verbascósido.

Las cafeoilamidas de hidro o dihidroxifenilalanina se encuentran en el cacao (figura 2.19) (Sanbongi y cols., **1998**; Rice y cols., **2001**). El AC y compuestos derivados han sido encontrados en el propóleo (Chen y cols., **1997**; Rajan y cols., **2001**; Cos y cols., **2002**).

N-(3,4-dihidroxi-*trans*-cinamoil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina :

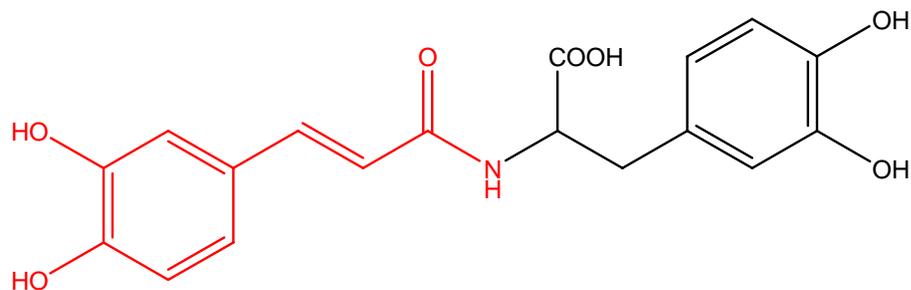


Fig. 2.19 Cafeoilamida de dihidroxifenilalanina.

2.6.4 Métodos de obtención de AC.

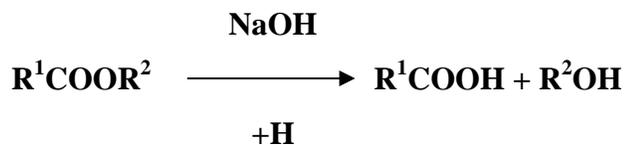
El AC se ha extraído frecuentemente de las frutas y vegetales empleando alcoholes y agua; por ejemplo, se ha usado etanol o soluciones de metanol/agua (80/20 v/v). La extracción se lleva a cabo a bajas temperaturas (4⁰C aproximadamente) y se adiciona algún antioxidante para prevenir la oxidación de AC durante el proceso, pero como ya se ha mencionado, la cantidad de AC en su forma libre es mínima en frutas y vegetales, por lo cual, con este método no se puede obtener AC a grandes escalas (Rice y cols., **2001**).

En algunas plantas, entre las que se encuentra el café, se han aplicado métodos de hidrólisis con el fin de cuantificar el total de compuestos fenólicos (Faulds y cols., **1993**; Bartolomé y cols., **1997**; Casal y cols., **1999**; Nardini y cols., **2002**).

El AC puede ser obtenido por la hidrólisis del ACG en agua, el cual además de producir AC, también produce AQ (Cervantes, **1996**; Cheetham y cols., **2000**; The Merck Index, **2001**).

Los métodos de hidrólisis que se han utilizado para obtener AC a partir de ACG han sido químicos y enzimáticos. La mayoría de los métodos químicos están basados en la hidrólisis alcalina con NaOH 2-4 N, usando tiempos de incubación que van de 4 a 6 horas y en algunos casos realizando la reacción en atmósfera de nitrógeno (Bartolomé y cols., **1997**; Casal y cols., **1999**; Nardini y cols., **2002**).

La reacción consiste en una sustitución nucleofílica, en donde el nucleófilo es el grupo hidroxilo de la base, la reacción se da de la siguiente forma:



Al realizar este método hay pérdidas importantes del contenido de ácidos fenólicos, en un ensayo realizado en café partiendo de ACG se obtuvo solamente un 22.9 % de AC (con hidrólisis ácida el rendimiento es aún menor), por esta razón se adicionaron EDTA y ácido ascórbico en la hidrólisis alcalina, con el fin de evitar la oxidación del ácido caféico, con esta nueva técnica se logró tener un rendimiento del 97 % (Nardini y cols., **2002**).

En lo concerniente a los métodos enzimáticos, se sabe que las hidrolasas pueden llevar a cabo la hidrólisis de ésteres; se han descubierto enzimas como la ácido clorogénico tetramérica esterasa, la cinamato dimérica esterasa (aisladas de *Aspergillus niger*) y la hidroxicinámico éster hidrolasa (purificada de *A. japonicus*), que tienen la capacidad de hidrolizar el ACG. Se ha demostrado que algunas bacterias colónicas humanas tienen la capacidad de producir esterasas con actividad en contra del ACG (Asther, **2005**). Cheetham y cols. (**2000**) patentaron la obtención a gran escala de AC a partir de ACG de café, mediante el empleo de la lipasa *Candida antarctica* obteniendo un rendimiento de reacción de casi un 100 %. Recientemente se ha reportado la purificación y caracterización de una ácido clorogénico hidrolasa aislada de *A. niger* que cataliza la hidrólisis de ACG y que ha permitido la obtención de AC partiendo de ACG de gabazo de manzana y pulpa de café con rendimientos de 86 y 100 % respectivamente (Asther y cols., **2005**).

2.6.5 Métodos de análisis de AC.

Se han diseñado varios métodos para determinar la presencia de AC en plantas; se ha empleado un método densitométrico para determinar el contenido de AC en varias especies de Lamiaceae (Janicsák y cols., **1999**). Los métodos cromatográficos se han usado ampliamente desde 1960 para separar ácidos fenólicos, se han conseguido grandes progresos con el desarrollo del HPLC y la electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) respectivamente. Estas tecnologías han permitido mejorar las determinaciones cuantitativas. En particular, el desarrollo de las columnas fase reversa ha aumentado en gran medida la eficiencia de los análisis. El HPLC acoplado a detectores UV ha permitido la identificación y cuantificación del AC y sus derivados (Rice y cols., **2001**).

Las técnicas de análisis de AC con HPLC consisten comúnmente en el uso de columnas fase reversa C₁₈. Se emplea una bomba de presión constante y un detector de absorción UV a una longitud de onda aproximada a 320 nm, longitud de onda en donde normalmente se detecta este compuesto. En el café, se determinó AC empleando una columna apolar, a una longitud de onda de 320 nm y usando una fase móvil compuesta de agua, ácido fórmico y metanol a un flujo de 0.9 ml/min (Casal y cols., **1999**). Se ha logrado la determinación simultánea de AC y ACG en cáscara de papa empleando una columna fase reversa C₁₈, la fase móvil compuesta de agua, metanol y ácido acético (64:35:1 v/v/v) con un flujo de 1 ml/min y un monitoreo a una longitud de onda de 313 nm (Rodríguez de Sotillo y cols., **1994**). El análisis de AC se ha beneficiado con el desarrollo de la espectroscopia de infra rojo (IR), la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM), que han permitido el conocimiento exacto de las estructuras de las moléculas fenólicas. Se determinaron AC y ACG en diferentes semillas de girasol empleando una columna apolar C₁₈. Se empleó un detector de arreglo de diodos (photodiode array detector) con el cual se hizo el monitoreo hasta 325 nm. La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo, metanol, agua y ácido fórmico (5:5:85:5) y un flujo de 0.4 ml/min, manteniendo la temperatura de la columna a 30°C. Se empleó un espectrómetro de masas que permitió la determinación de AC, ACG y de los tres isómeros de AdicQ (Pedrosa y cols., **2000**; Rice y cols., **2001**). El método de acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) ha permitido el mayor avance actual que es la determinación de AC en sangre (Rice y cols., **2001**). Si bien, la combinación de estas técnicas ha permitido obtener sistemas de análisis más eficientes, se han mejorado al añadir más elementos. Por ejemplo, se ha desarrollado HPLC-MS con una interfase de ionización química a presión atmosférica (IQPA) que ha permitido la identificación de AC en plantas y orina humana. Al emplear HPLC-SM con ionización por “electrospray” (HPLC-SM-IES), se ha logrado analizar AC en plasma y orina (Rice y cols., **2001**; Bastos y cols., **2004**).

2.6.6 *Propiedades y Aplicaciones del AC.*

Es bien sabido que los radicales de oxígeno están relacionados con varias patologías como el cáncer, los desordenes cardiovasculares, la artritis, la inflamación y

enfermedades del hígado. Los compuestos antioxidantes pueden proteger al cuerpo de los daños inducidos por los radicales de oxígeno. El AC es un compuesto que ha tenido gran importancia en sistemas químicos y biológicos debido a su potente actividad antioxidante (Rodríguez de Sotillo y cols., No. 5, **1994**; Filip y cols., **2000**; Saija y cols., **2000**; Cartron y cols., **2001**; Asther y cols., **2005**).

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos, depende del número de grupos hidroxilo y de la posición en la que se encuentren en la molécula. El AC presenta actividad antioxidante debido a su estructura fenólica, el grupo hidroxilo en posición *para* interviene en los pasos de la iniciación de la oxidación actuando como donador de hidrógeno, pues cede su átomo de hidrógeno a los radicales alcoxi (RO \cdot) o peroxi (ROO \cdot) logrando estabilizarlos e inhibir la oxidación. Los radicales del antioxidante que se producen, son menos reactivos debido a su resonancia (Cervantes, **1996**; Medrano, **2002**; Sosa, **2003**).

El AC y varios de sus derivados tienen importantes aplicaciones en medicina y en la industria de alimentos, por lo cual el AC se convierte en una materia prima de gran importancia desde su uso como antioxidante natural hasta su empleo en el desarrollo de nuevos antioxidantes (Rodríguez de Sotillo y cols., No. 5, **1994**; Moon y cols., **1998**; Silva y cols., **2001**).

Se sabe que la acilación de antocianinas con AC, la cual es común en frutas, es responsable de una mejor estabilidad del color en productos de frutas (Rice y cols., **2001**).

En gran medida, el AC es el responsable de las propiedades benéficas que presentan las plantas medicinales que lo contienen y que suelen utilizarse en infecciones ya que estimula el sistema inmunológico y tiene actividad antibacteriana (Cos y cols., **2002**; Kurkin, **2003**; Asther y cols., **2005**).

El AC brinda cierta protección en contra de genotoxinas responsables del desarrollo de varios tipos de cáncer. Se ha reportado que el AC es un potente protector de especies de nitrógeno altamente reactivas como los peroxinitritos o el radical dióxido de nitrógeno. Se

ha demostrado que el AC y compuestos relacionados son potentes inhibidores de la carcinogénesis humana, pues inhiben las reacciones de *N*-nitrosación. Esta reacción es potencialmente mutagénica y las *N*-nitrosaminas están implicadas en la carcinogénesis (Clifford, **2000**; Cotelle, **2001**; Asther y cols., **2005**). El AC también brinda protección en contra de cáncer en la piel, pues combinado con ácido ferúlico (AF) y disueltos en una solución saturada a pH de 7.2, protegen la piel contra la luz UV, por lo que se usan en los protectores solares (Cheetham y cols., **2000**; Saija y cols., **2000**).

Se ha encontrado que el AC y cafeoil derivados como el ácido dihidrocaféico y los ácidos cafeoilquínicos, cafeoiltartárico y rosmarínico, previenen enfermedades cardiovasculares, pues protegen a las lipoproteínas de baja densidad atacando al ión superóxido responsable de su oxidación impidiendo que se genere la arterogénesis (Moon y cols., **1998**; Cartron y cols., **2001**).

2.6.7 Derivados de AC

Existen compuestos derivados de AC que han tenido importantes aplicaciones, aditivos como el propil cafeato y propilhidrocafeato (figuras 2.20 y 2.21) son utilizados en el aceite de girasol para aumentar su estabilidad pues presentan mayor actividad antioxidante que el α -tocoferol (Silva y cols., **2001**).

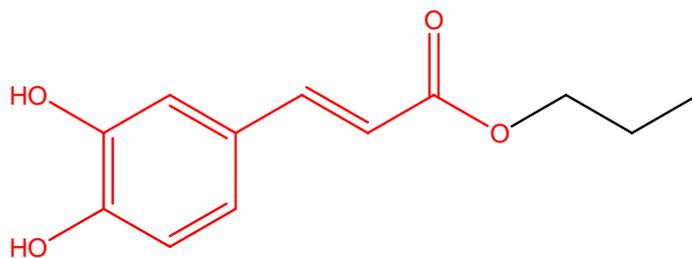


Fig. 2.20 Cafeato de propilo.

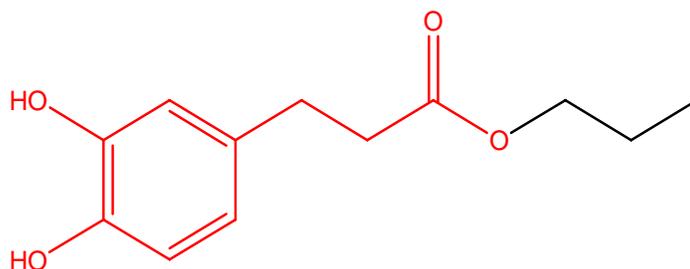


Fig. 2.21 Hidrocafeato de propilo.

También se ha empleado el cafeato de bornilo como conservador de la grasa de cacahuete (Sosa, **2003**).

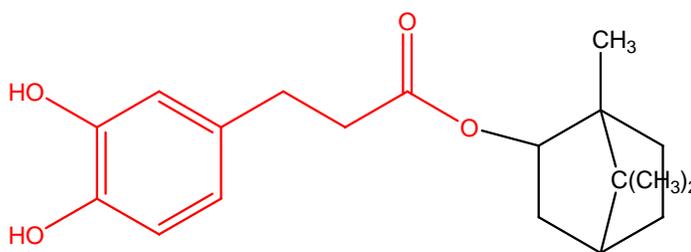


Fig. 2.22 Cafeato de bornilo, derivado de AC.

Además de los compuestos derivados de AC mencionados, se han sintetizado compuestos a partir del AC y que tienen importantes aplicaciones, a continuación se presentan su estructura, propiedad o aplicación.

Glucósidos

Se han sintetizado varios cafeoilglucósidos derivados de los ácidos dicafeoilquínicos obtenidos del AC (figura 2.23), que actúan en contra del VIH-IN, pues inhiben la replicación del VIH (Kim y cols., **2000**). Dependiendo de las condiciones de reacción se pueden obtener los siguientes cafeoilglucósidos.

Amidas

Se ha determinado que las amidas de AC presentan una actividad antioxidante fuerte en la oxidación de lípidos por lo que se han sintetizado amidas a partir del AC y una amina (Rajan y cols., 2001; Cos y cols., 2002).

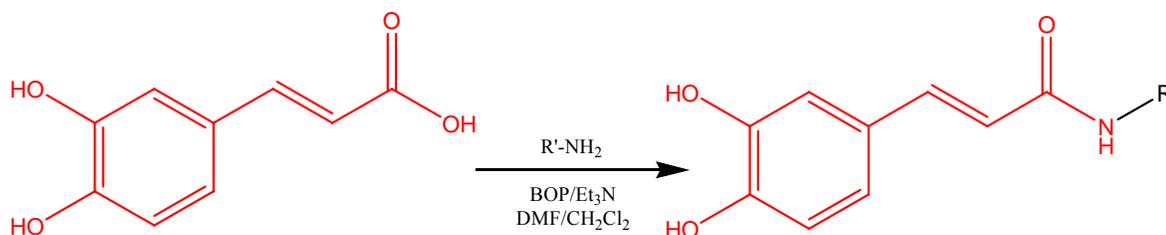


Fig. 2.24 Síntesis de amidas de AC

Cafeato de etilo

El cafeato de etilo es un compuesto que forma parte de la formulación de los protectores solares y se ha obtenido a partir del AC (figura 2.25) (Cheetham y cols., 2000).

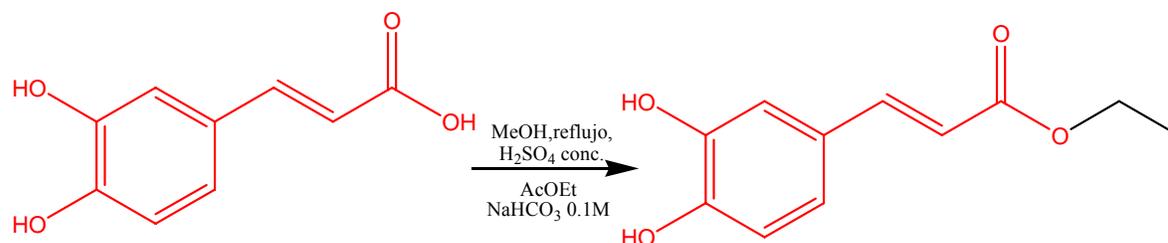


Fig. 2.25 Síntesis de cafeato de etilo.

2.7 ÁCIDO QUÍNICO

2.7.1 Generalidades.

El AQ, ácido 1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexancarboxílico o ácido hexahidro-1,3,4,5-tetrahidroxibenzóico. $C_7H_{12}O_6$; tiene las siguientes características: PM 192 g/mol. Físicamente son cristales blancos con un fuerte sabor ácido; p.f. 162-163°C; este compuesto es soluble en 2.5 partes de agua, en alcohol y ácido acético glacial. Se encuentra en la corteza de árboles, particularmente en cortezas de árboles de América del Sur, tales como árboles del tabaco, manzana, durazno, pera y ciruela (The Merck Index, **2001**). La estructura del compuesto se observa en la figura 2.6.

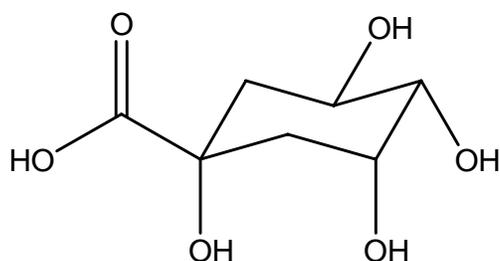


Fig. 2.26 Estructura del AQ.

2.7.2 Aplicaciones de AQ.

El AQ se emplea como precursor sintético óptimamente activo en muchos pasos de síntesis química, pero ha sido particularmente apreciado como bloque de construcción para la síntesis de compuestos naturales; puede ser usado para producir dimetiléster hidroquinona, que es utilizada para perfumar los jabones. El AQ puede ser convertido a benzoquinona, ambos compuestos son muy usados para la producción de intermediarios quirales, por ejemplo como precursores en la producción de nucleósido. La benzoquinona es un precursor de hidroquinona, la cual es ampliamente utilizada en las soluciones reveladoras fotográficas (Barco y cols., **1997**; Cheetham y cols., **2000**).

2.8 ENZIMAS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.

2.8.1 *Generalidades.*

Las enzimas son capaces de controlar específicamente a las macromoléculas biológicas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos; así como a las moléculas más pequeñas como aminoácidos, azúcares y vitaminas. Esta es la primera razón por la cual las enzimas son importantes para la industria de alimentos. Cuando las enzimas son consideradas para emplearlas en procesos alimentarios, es indispensable cuestionar si se tendrá algún beneficio comercial. Los beneficios que se pueden obtener aplicando enzimas en un proceso son el mejoramiento de la conversión, beneficio ambiental, ahorro económico y la posibilidad de estandarizar procesos. Por ejemplo, en la hidrólisis de almidón para producir glucosa, con la hidrólisis ácida se obtiene una conversión limitada, mientras que las enzimas pueden aumentar el rendimiento y la pureza del producto obtenido. Además, empleando enzimas se puede decir que la hidrólisis es menos tóxica y es más barata en términos de reducción de pérdidas (Tucker, **1991**).

Las enzimas han tenido un papel importante en la industria de alimentos tanto en los productos tradicionales como en los novedosos. Los antiguos procesos de elaboración de cerveza y fabricación de queso cuentan con actividad enzimática en sus etapas. El comienzo de la tecnología enzimática se remonta a Christian Hansen, quien en 1874 comercializó el cuajo y que fue la primera preparación enzimática normalizada para una aplicación tecnológica (fabricación del queso). Tradicionalmente el queso se fabrica empleando estómagos de animales lactantes para cuajar la leche. Pero Hansen extrajo el principio activo del cuajo, la proteasa renina o quimosina, obteniendo el primer preparado purificado de una enzima industrial. El cuajo, la malta y el koji son preparados crudos de enzimas que el hombre ha usado para procesar alimentos desde épocas muy antiguas. La malta son granos de cebada puestos a germinar e inactivados térmicamente apenas iniciado el proceso. Durante la germinación se produce α -amilasa que actúa sobre el almidón generando azúcares susceptibles de fermentación alcohólica por las levaduras. El koji es el equivalente en Japón a la malta de occidente, consiste en un cultivo en superficie del hongo

Aspergillus oryzae sobre trigo o arroz hervidos; el hongo secreta α -amilasa que es empleada en la fabricación del sake, que es el equivalente a la cerveza (Serrano, **1985**; Gacesa y cols., **1990**; Tucker, **1991**).

El uso de enzimas en diferentes procesos ha tenido gran importancia por los beneficios que se pueden obtener con sus aplicaciones. Actualmente se emplean enzimas para obtener o mejorar el producto final; por ejemplo, las pectinasas que se usan en la extracción de aceites esenciales de cítricos, ofrecen ventajas durante la elaboración de jugos de frutas observadas en la clarificación del producto final. La amiloglucosidasa es empleada para la producción de jarabe, etanol y cerveza. En la producción de aminoácidos se utiliza la enzima aminoacilasa. Las α -amilasas se emplean en la fabricación de jarabes y pan, la papaína se emplea para estabilizar la cerveza. Estos ejemplos, ilustran el desarrollo y la importancia que ha tomado la aplicación de enzimas en diferentes procesos. Actualmente, son constantes las investigaciones que se hacen para encontrar nuevas enzimas con aplicaciones industriales (Serrano, **1985**; Gacesa y cols., **1990**; Tucker, **1991**).

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria son hidrolasas y debido a que las enzimas aplicadas en este trabajo pertenecen a dicho grupo, se describen en el siguiente apartado.

2.8.2 *Hidrolasas.*

Las hidrolasas son un grupo de enzimas que pueden realizar la hidrólisis y la formación de ésteres, además de amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, anhídridos y glicósidos. Las proteasas, lipasas y estererasas pertenecen a este grupo (Fober, **2000**).

Las estererasas preferentemente, rompen enlaces éster de cadena corta de los ácidos grasos, a diferencia de las lipasas que tienen preferencia por ácidos de cadena larga. Se ha encontrado que las estererasas presentan mayor actividad en sustratos solubles en agua (Fober, **2000**; Fojan y cols., **2000**). Las estererasas han sido obtenidas de una gran variedad de fuentes, pero más ampliamente de tejidos animales ya que tienen numerosas

aplicaciones en síntesis orgánica. Con el empleo de esterasas se tiene el beneficio de que la hidrólisis o síntesis de ésteres se puede obtener con menor cantidad de agua o se puede reemplazar el agua con alcoholes como medio de reacción (Staubmann, **1999**). Las esterasas de bacterias ácido lácticas, levaduras y pseudomonas están involucradas en el desarrollo de sabores frutales en alimentos. Por su parte, las lipasas tienen aplicación industrial en síntesis de ingredientes de alimentos, fármacos, agroquímicos, fragancias y sabores, textiles, además se usan como aditivos en detergentes. Ambas enzimas son esenciales para el desarrollo del sabor típico de los quesos italianos (Foher, **2000**; Mohamed y cols., **2000**).

Existe un tipo de esterasas llamadas Esterasas ácido fenólicas que fueron detectadas por primera vez por Deobald y Crawford en 1987 y que son una clase específica de éster carboxílico hidrolasas que tienen la capacidad de esterificar e hidrolizar ácidos fenólicos como el ácido ferúlico, por lo que son conocidas como ácido ferúlico esterasas (AFE). Las AFE de *Streptomyces olivochromogenes* fueron las primeras esterasas ácido fenólicas que se obtuvieron de una fuente bacteriana. Las AFE han sido detectadas en varios microorganismos, ya que estas enzimas extracelulares juegan un papel importante en la degradación de los compuestos fenólicos de las plantas para obtener sustratos de crecimiento. Actualmente se obtienen abundantemente de *Aspergillus niger* (Faulds, **1993**; Kroon y cols., **1997**).

En los distintos trabajos en los que se busca sintetizar derivados del ácido ferúlico así como su hidrólisis, ha sido necesario conocer las mejores condiciones en las que actúan estas enzimas, se sabe que la mayor actividad de las AFE la presentan a un pH de 6 que es su óptimo, y a una temperatura de 37°C, por lo que generalmente se emplean estas condiciones. Por lo general, se incuban la enzima y el sustrato en buffer MOPS 0.1 M a las condiciones de temperatura y pH mencionadas, con agitación constante y dependiendo del tiempo de incubación y sustrato, se obtendrá la esterificación o hidrólisis (Faulds, **1993**; Ralet y cols., **1994**; Bartolomé y cols., **1997**).

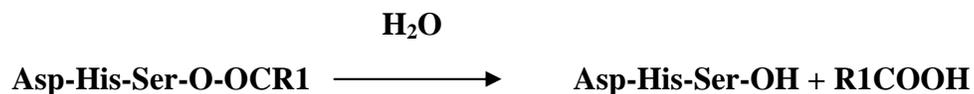
El mecanismo de acción de la enzima es similar a la hidrólisis alcalina. Un grupo

nucleofílico, en este caso del sitio activo de la enzima (grupo hidroxilo de la Ser) ataca el grupo carbonil del éster. La triada catalítica de la enzima está formada por: Asp-His-Ser. La reacción se da en dos etapas (Fober, 2000).

I. Ataque nucleofílico, formación de un intermediario acil-enzima y liberación del alcohol.



II. Ataque de nucleófilo (usualmente agua), regeneración de la enzima y producción del Ác. Carboxílico.



CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener AC a partir de ACG recuperado de café verde, aplicando un nuevo método enzimático con posible aplicación industrial.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

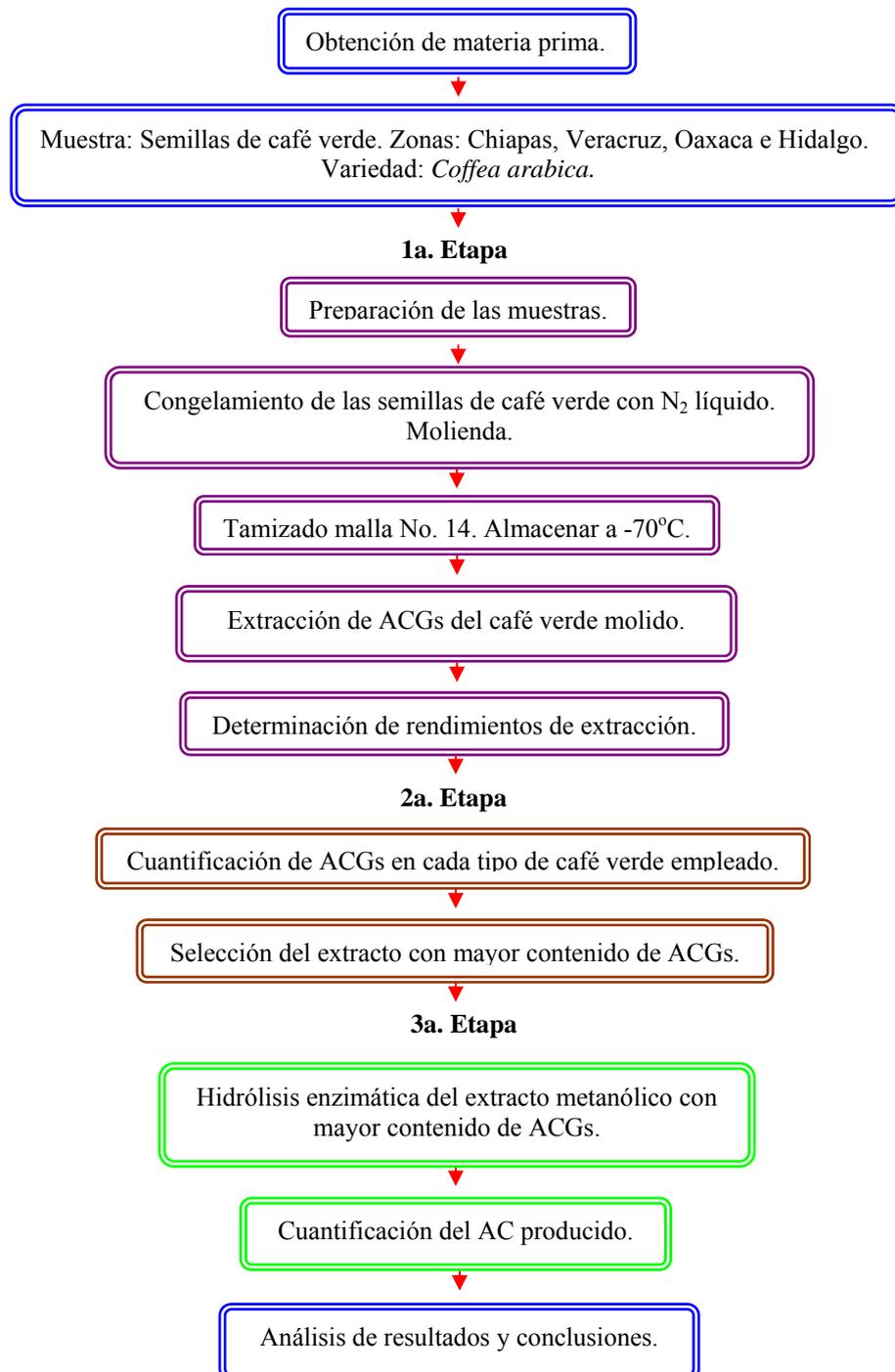
- Diseñar una metodología para extraer ACG de café verde.
- Extraer el ACG presente en el café verde generado por las principales zonas productoras del país: Chiapas, Veracruz, Oaxaca e Hidalgo.
- Identificar cual de los diferentes tipos de café estudiados tiene mayor contenido de ACG.
- Diseñar un método para hidrolizar el ACG recuperado del café verde nacional, empleando las enzimas X1 y X2.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

Con el método enzimático de hidrólisis diseñado en este trabajo, se puede obtener AC a partir de los ACGs presentes en el café verde nacional, logrando mejores rendimientos que los generados por los métodos que comúnmente se aplican para su obtención.

CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama general de la investigación.



5.2 Obtención de materia prima.

Se estudiaron cuatro tipos diferentes de café verde de la especie *Coffea arabica*; las semillas fueron obtenidas de los estados de mayor producción: Chiapas, Veracruz, Oaxaca e Hidalgo.

5.3 Materiales y métodos.

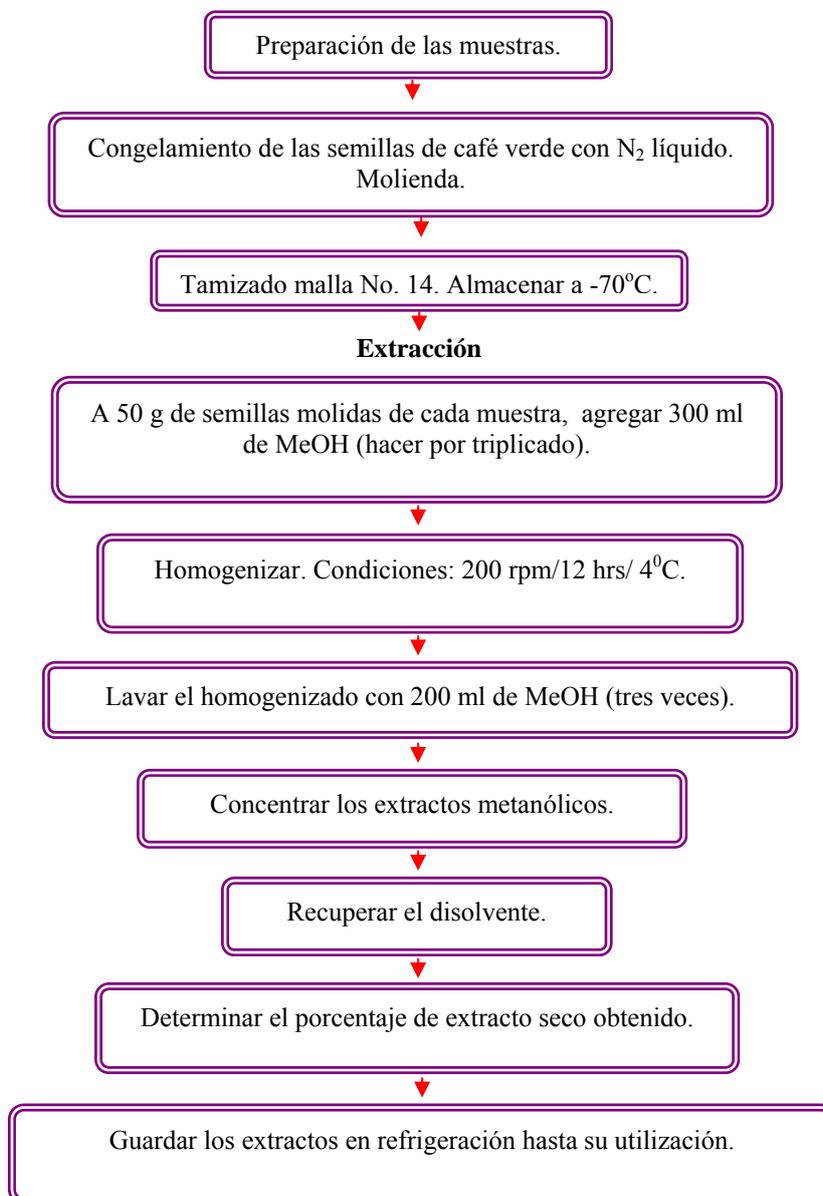
5.3.1 Reactivos y equipos.

El estándar de AC y el buffer MOPS empleados son de la marca Aldrich Chem Co. El DPPH y el estándar de ACG son de la marca Merck. Todos los reactivos empleados eran grado R.A.; se utilizaron metanol, ácido acético y acetato de etilo marca Reasol. Para el análisis en HPLC se empleó MeOH grado HPLC. Para las pruebas enzimáticas preliminares se emplearon Chirazime (Boehringer-Monnheim), Lipasa (Sigma Chemical Co.), Lipozima RMIM (Nonozimes) y Lipasa de *Candida antarctica*, Fracción-B (Proporcionada por el Instituto de Química).

Para las destilaciones se empleó un rotavapor Buchi R-205 conectado a una bomba Edwards de alto vacío. El equipo de HPLC que se utilizó es un sistema Waters con bomba de HPLC binaria Waters 1525 acoplado a un detector UV dual Waters 2487. Se empleó un horno Perkin Elmer LC Oven 101. Se utilizó una columna para sistema Waters W32311F 027 Nova-Pack C₁₈ de 3.9 x 300 mm. Part No. WAT011695 Waters, hecha en Irlanda. Las membranas de filtración fueron Durapore, 0.45 µm HV y papel filtro Whatman No. 4.

El desarrollo del trabajo se desarrolló en tres etapas generales, a continuación se presenta el esquema experimental y se explican las operaciones de cada una de las etapas.

5.3.2 Primera etapa.



5.3.2.1 *Preparación de las muestras.*

Las semillas de café verde de los diferentes estados, se congelaron con nitrógeno líquido e inmediatamente se molieron en un molino para cereales. La molienda se tamizó en malla No. 14, obteniendo partículas menores a 1.44 mm. El material obtenido del tamizado fue utilizado como muestra para la extracción de ACG. Las diferentes muestras se almacenaron a -70°C hasta el momento de su empleo. Esta metodología se realizó teniendo como referencia los trabajos de Ky, y cols., **1997**; Casal, y cols., **1999** y Guerrero, y cols., **2001**).

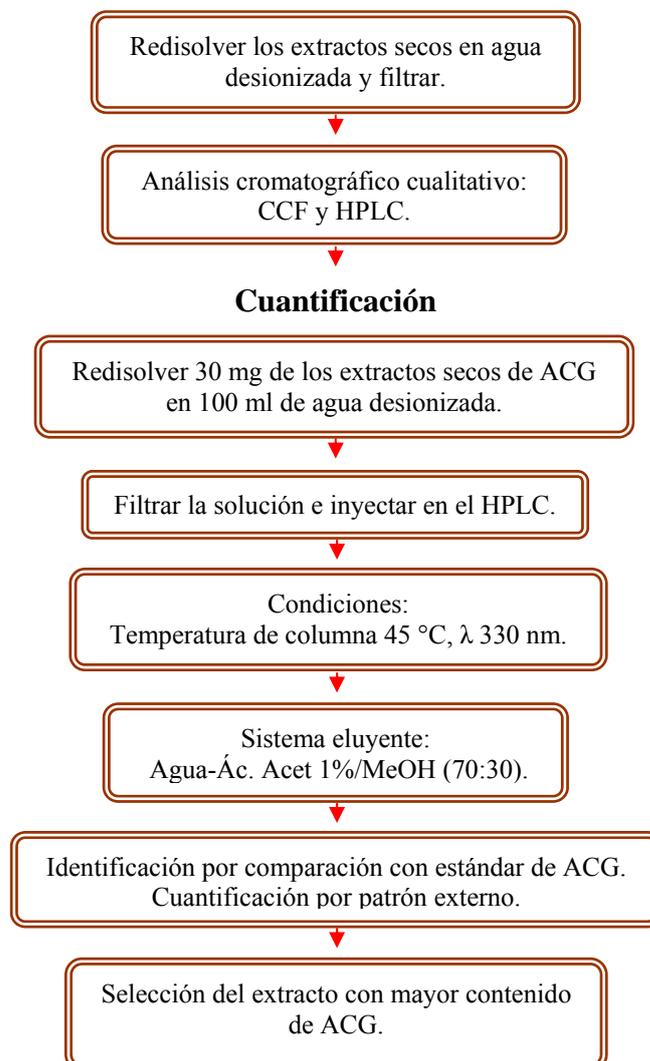
5.3.2.2 *Procedimiento de extracción.*

El método de extracción empleado, está fundamentado en las técnicas que normalmente se aplican para obtener extractos de compuestos fenólicos de las plantas.

La extracción se hizo por triplicado en cada muestra diferente de café verde molido, se pesaron tres lotes de 50 g de cada muestra. Cada lote se extrajo con 300 ml de metanol, la mezcla se mantuvo con una agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm) y manteniendo una temperatura de 4°C . Las extracciones se llevaron a cabo en la noche durante 12 hrs. Transcurrido el tiempo, se separó la fase líquida de la fase sólida por filtración a vacío empleando papel Whatman No. 4. La parte sólida se lavó tres veces con 200 ml de metanol enfriado a 4°C . El extracto y los lavados se juntaron y se procedió a evaporar el disolvente, la destilación se llevó a cabo manteniendo la temperatura del baño a 40°C . El extracto se concentró hasta eliminar el disolvente. El disolvente se recuperó y se determinó el porcentaje de extracto seco obtenido de cada muestra. Al extracto obtenido se le nombró extracto de ACG, aunque es una mezcla de ACGs.

Los extractos generados por cada muestra se mantuvieron refrigerados hasta su utilización en los análisis cromatográficos.

5.3.3 Segunda etapa.



Los extractos obtenidos en la primera etapa se redisolvió en agua desionizada, las soluciones generadas se emplearon en los análisis cromatográficos. En primer lugar se realizaron análisis con cromatografía en capa fina (CCF) para determinar la presencia de ACG en los extractos, posteriormente con el HPLC se realizó la cuantificación del ACG de cada extracto.

5.3.3.1 Análisis por CCF.

La cromatografía en capa fina se utilizó para determinar la presencia de ACG en los extractos obtenidos, los cuales se compararon con un estándar de ACG. En la técnica se emplearon cromatoplasmas de sílica gel como fase estacionaria, la fase móvil consistió

en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3.5:1.3:0.2) las placas se revelaron con una solución de radical-DPPH al 0.2% en metanol. La aparición de manchas color amarillo en contra de un fondo púrpura, indicarían que el radical-DPPH fue reducido por la presencia de compuestos con actividad antioxidante.

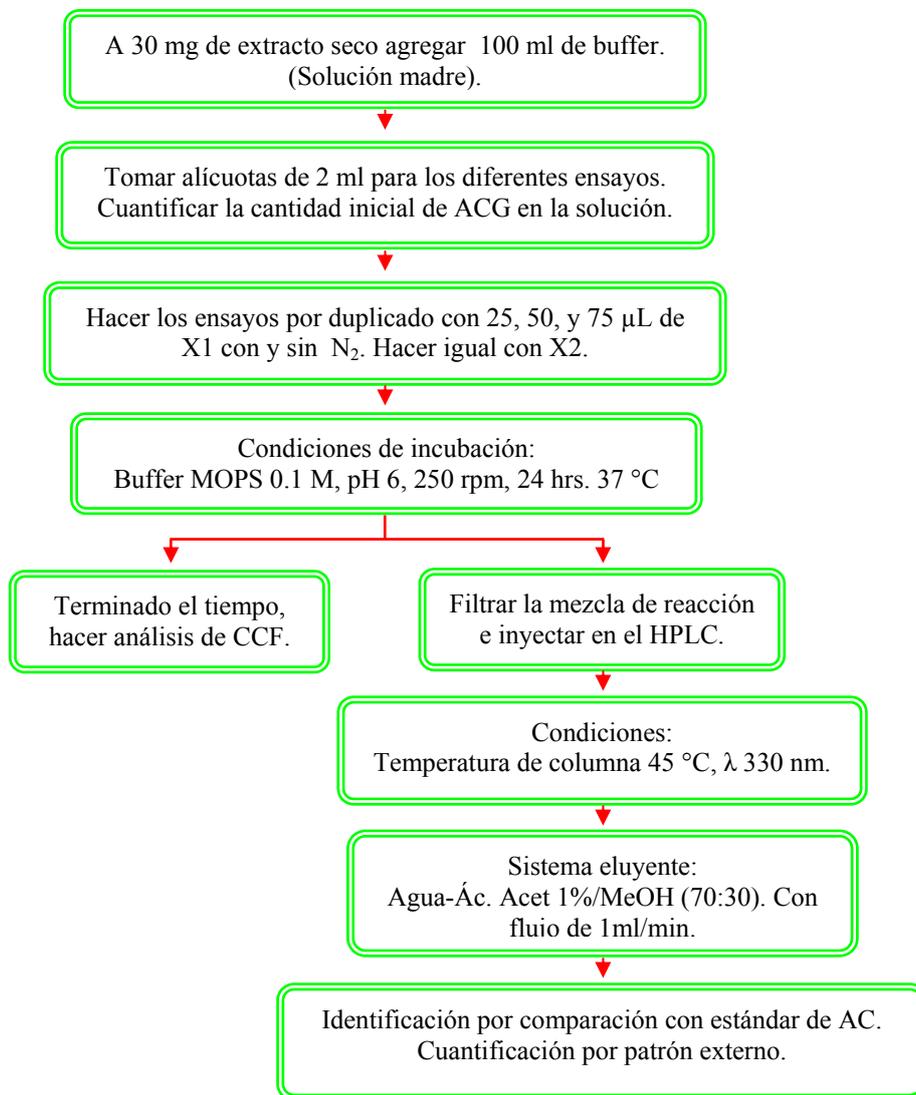
5.3.3.2 *Análisis en HPLC*

El método de HPLC empleado se diseñó a partir de los trabajos de Iwahashi, y cols., **1984**; Rodríguez de Sotillo, y cols. **1994a**; Moon, y cols., **1998**; Jham, y cols., **2002**; Nardini, y cols., **2002**; Nuutila, **2002**.

Se redisolviéron 30 mg de extracto seco de cada muestra en 100 ml de agua desionizada, la solución se filtró en membrana y se inyectó un volumen de 20 μL por triplicado. El sistema eluyente empleado fue agua-ácido acético al 1%/MeOH (70:30) y se aplicó con un flujo constante de 1 ml/min. La columna se mantuvo a una temperatura de 45°C y la detección se hizo a una λ de 330 nm.

La identificación de ACG en cada muestra se realizó por comparación del tiempo de retención con el estándar de ACG. Para hacer la cuantificación de ACG en cada muestra se aplicó el método de patrón externo y se determinó cual de las muestras presentó el mayor contenido de ACG, la cual se empleó como muestra para la hidrólisis enzimática. En la sección de anexos (pag. 71) se muestra la curva patrón de ACG realizada.

5.3.4 Tercera etapa.



5.3.4.1 Hidrólisis enzimática de ACG y cuantificación de AC.

En un principio se intentó obtener el AC aplicando la patente desarrollada por Cheetham, y cols. (2000), empleando lipasa de *C. antarctica*; sin embargo, no se logró su obtención. Posteriormente se utilizaron otras lipasas comerciales, siguiendo las condiciones de la patente, con éstas tampoco se obtuvieron resultados positivos. Por último y siguiendo las mismas condiciones, se emplearon las enzimas X1 y X2; sin embargo, tampoco se logró la obtención del AC.

Con base en los resultados obtenidos, se desarrolló el método aplicado en este trabajo; tomando como antecedente los trabajos y procedimientos para la obtención de AF. El método enzimático empleado, se diseñó tomando como referencia los trabajos de Faulds, y cols., **1993**; Ralet, y cols., **1994**; Bartolomé, y cols., **1997** y Cheetham, y cols., **2000**.

Las enzimas X1 y X2 empleadas para la hidrólisis de ACG, fueron obtenidas de *Aspergillus niger*. Presentan una actividad de 7 U/g y 36 U/g respectivamente. Se realizó un ensayo preliminar en donde el método de hidrólisis desarrollado se llevó a cabo con 100 µL de cada enzima; el análisis cualitativo con CCF, mostró resultados satisfactorios, por lo cual se decidió aplicar el método variando la cantidad de enzima añadida y observar su efecto; los volúmenes de enzima que se estudiaron fueron 25, 50 y 75 µL. Se hicieron ensayos con y sin atmósfera de nitrógeno para observar si se favorecía la hidrólisis logrando mayores rendimientos de reacción.

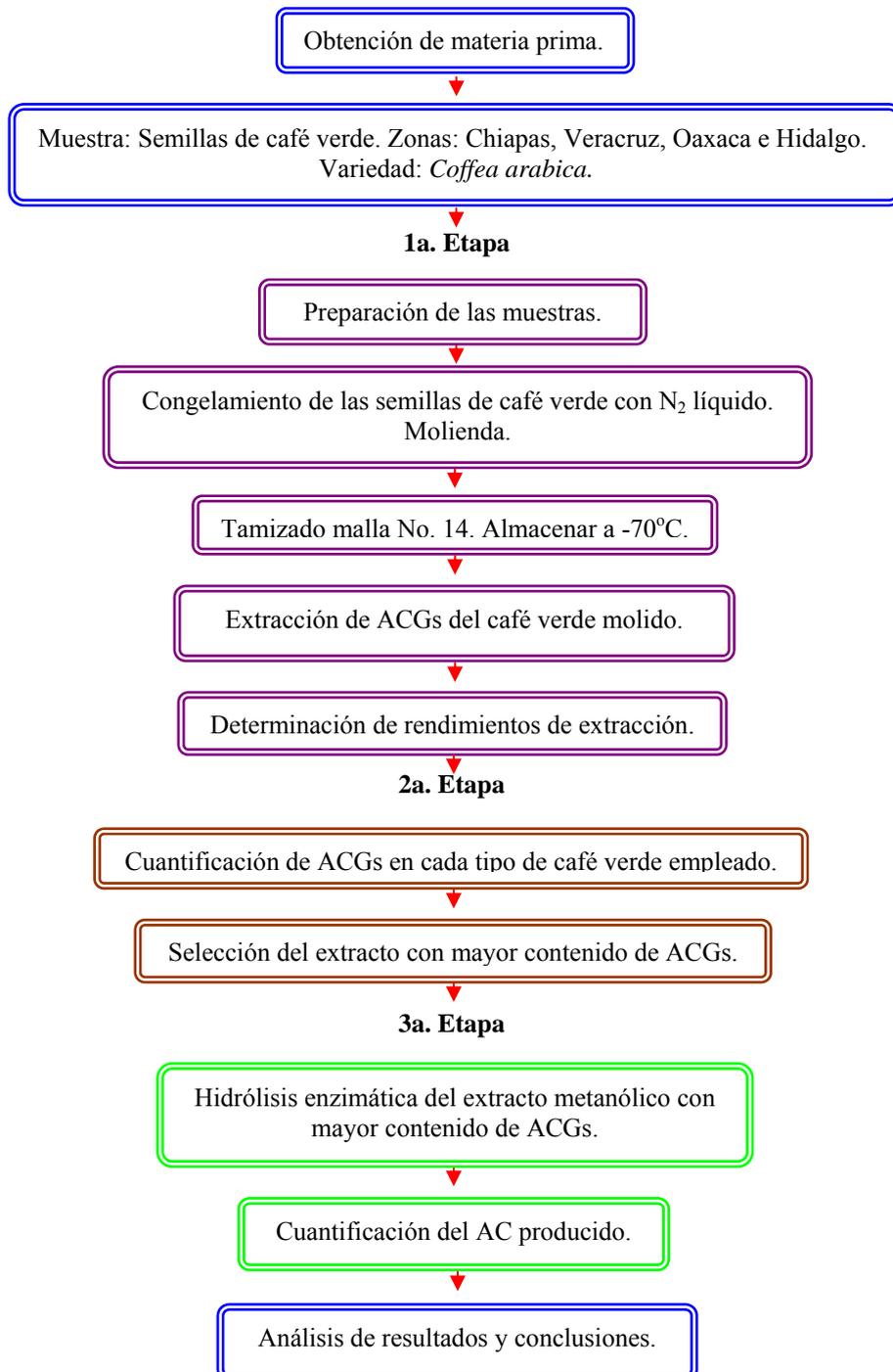
Previo a la hidrólisis se preparó una solución madre con 30 mg de extracto seco en 100 ml de buffer MOPS (ácido 4-morfolina propanosulfónico) 0.1 M y se verificó que el pH se encontrara en 6. Se cuantificó la concentración inicial de ACG y se tomaron alícuotas de 2 ml que se colocaron en viales color ámbar. Se ocuparon 3 viales para hacer los ensayos con los diferentes volúmenes de E1 en atmósfera de nitrógeno y 3 viales para hacer los ensayos sin atmósfera de nitrógeno; se procedió de la misma forma con E2. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se cuantificó el ACG que estuvo presente después del tiempo de hidrólisis.

Las condiciones de la hidrólisis enzimática fueron las siguientes: Los diferentes viales que contenían la solución madre se incubaron a 37°C y una vez que llegaron a esa temperatura, se les agregaron las enzimas en los volúmenes correspondientes. La mezcla de reacción se mantuvo a la misma temperatura y con una agitación constante de 250 rpm durante 24 hrs. Concluido el tiempo, la mezcla de reacción por un lado se analizó con cromatografía en capa fina para determinar la presencia de AC; y por otra parte se filtró en membrana para hacer el análisis con HPLC. Las condiciones de estas técnicas cromatográficas fueron las mismas que para el análisis de ACG; de igual manera, se identificó al AC por comparación con un estándar y se cuantificó por el método de patrón externo.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y su discusión se presentan por etapas tal como está dividido el proyecto: extracción de ACG, cuantificación de ACG e hidrólisis enzimática de ACG para la obtención de AC.

Diagrama general.



6.1 *Obtención de materia prima.*

Se trabajó con cuatro tipos diferentes de semillas de café verde de la especie *Coffea arabica*; las semillas fueron obtenidas de los estados de mayor producción: Chiapas, Veracruz, Oaxaca e Hidalgo. El café empleado no fue de tipo comercial, por lo cual no se tienen los datos de cuando se cosecharon.

6.2 *Primera etapa.*

6.2.1 *Preparación de las muestras.*

Tomando como base los procedimientos de Ky y cols. (1997), Casal y cols. (1999), Rogers y cols. (1999) y Guerrero y cols. (2001); las semillas de café verde de los diferentes estados, se congelaron con nitrógeno líquido e inmediatamente se molieron en un molino para cereales. Las semillas fueron congeladas para que en el momento de la molienda se obtuvieran partículas pequeñas y no se produjera pasta. La molienda fue una operación que se realizó con el objetivo de reducir el tamaño de partícula de las semillas y de esta forma aumentar la superficie de contacto de la muestra con el disolvente durante la operación de extracción, favoreciéndose esta última operación en comparación de haberla hecho directamente en las semillas sin moler. La molienda se tamizó en malla No. 14 (1.44 mm de tamaño de partícula). El resultado de la molienda y tamizado fue utilizado como muestra para la extracción de ACG. Las diferentes muestras se almacenaron a -70°C para prevenir su degradación hasta el momento de su empleo.

6.2.2 *Extracción de ACG.*

La operación de extracción se realizó teniendo una proporción 1:6, esto se refiere a que por cada gramo de muestra se colocaron 6 ml de disolvente. Esta proporción fue la empleada por Rodríguez de Sotillo y cols. (1994a) para la obtención de ACG a partir de la cáscara de papa. Se decidió aplicar su técnica, debido a que se emplea menor cantidad del disolvente de extracción, el cual es únicamente metanol, en comparación con otras técnicas en donde se aplican proporciones de 1:100 usando

metanol/agua (70:30) como disolvente (Ky y cols., **1997**); 1:50 empleando etanol al 80 % (Guerrero y cols., **2001**); y 1:12 con una mezcla de metanol/agua (40:60) (Casal y cols., **1999**). Se hicieron tres lotes de 50 g de café verde molido de cada una de las muestras, cada lote se colocó en un sistema de extracción con 300 ml de metanol, la mezcla se mantuvo con una agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm), a una temperatura de 4°C, durante 12 horas. Las diferentes extracciones se llevaron a cabo durante la noche. Posteriormente, se separó la fase líquida de la fase sólida por filtración a vacío empleando papel Whatman No. 4. La parte sólida se lavó tres veces con 200 ml de metanol enfriado a 4°C. Se juntaron los triplicados de cada extracto y los lavados, y se evaporó el metanol a 40°C. El extracto se concentró eliminando completamente el disolvente; de esta manera se obtuvieron los extractos crudos que contienen ACGs.

6.2.3 Extracto crudo obtenido.

En la tabla 6.1 se muestran los porcentajes promedio de extracto crudo seco del café verde de cada estado, obtenidos con el método propuesto (Anexo I).

Porcentaje de extracto crudo seco

Estado	% de extracto seco
Chiapas	14.9 ± 1.5
Veracruz	11.8 ± 0.8
Oaxaca	11.3 ± 0.4
Hidalgo	10.3 ± 0.5

Tabla 6.1 Tabla de porcentaje de extracto obtenida con el método de extracción empleado.

En la evaporación del disolvente se logró recuperar aproximadamente el 60 % del metanol utilizado para la extracción y los lavados. Se obtuvo de 9.8 a 10.8 % de extracto crudo seco del café verde de Hidalgo; de 10.9 a 11.7 % del café verde de Oaxaca; de 11.0 a 12.6 % del café de Veracruz y de 13.4 a 16.4 % del café de Chiapas. Se puede ver que los valores obtenidos en el café de Oaxaca y Veracruz tienen algunas similitudes, los valores del café de Hidalgo están ligeramente por debajo y los valores obtenidos para el café de Chiapas son más altos. Los resultados anteriores, podrían implicar que hay diferencias en el contenido de ACG de cada tipo de café, según el Estado; y que el café de Chiapas podría presentar el mayor contenido, seguido por el café de Veracruz, Oaxaca e Hidalgo (estas ideas se retomarán cuando se discutan los

resultados obtenidos en la cuantificación por HPLC).

6.3 Segunda etapa.

6.3.1 Identificación y cuantificación de ACG.

Identificación con CCF.

Los extractos crudos secos obtenidos del café verde de Chiapas, Veracruz, Oaxaca e Hidalgo, fueron analizados con CCF; de acuerdo con los resultados obtenidos en las cromatoplasmas hechas, se observó la aparición del ACG (R_f de 0.6, empleando como eluyente el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 3.5:1.3:0.2). En la figura 6.1 se muestra la cromatoplasma hecha para el extracto del café verde de Chiapas. Las aplicaciones hechas correspondieron al extracto de café verde (E) y al estándar de ácido clorogénico (ACG). El resultado observado en esta figura, es el mismo que se obtuvo con cada uno de los extractos de cada muestra.

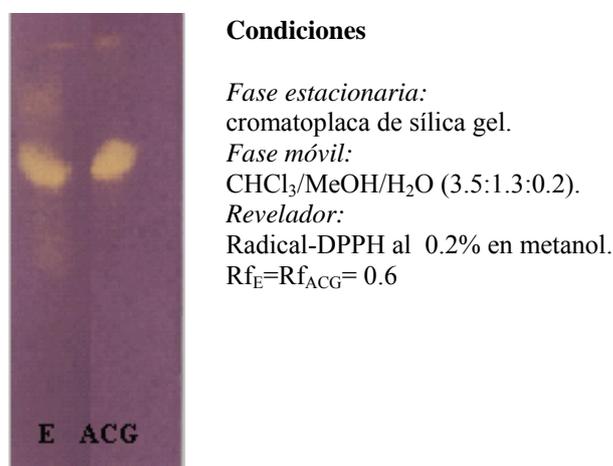


Fig. 6.1 Cromatoplasma hecha para analizar extracto de ACG.

El resultado antes mencionado, indicó la presencia de ACG en los extractos crudos obtenidos del café verde de Chiapas, Veracruz, Oaxaca e Hidalgo; dado que al comparar cada uno de estos extractos contra el estándar de ACG, se observaron las mismas características.

Identificación y cuantificación de ACG con HPLC.

El método de HPLC implementado en este trabajo se diseñó a partir de los métodos siguientes:

Iwahashi: Columna C₁₈, temperatura de 40°C, sistema eluyente: agua /metanol (1:1) más Ác. Fosfórico 10 mM/Metanol. λ de 325 nm (Iwahashi, y cols., **1984**).

Rodríguez de Sotillo: Columna C₁₈, con flujo de 1.0 ml/min, sistema eluyente: agua /metanol /Ác. Acético (64:35:1 v/v/v). λ de 313 nm (Rodríguez de Sotillo, y cols. **1994a**).

Moon: Columna C₁₈, temperatura de 50°C, con flujo de 3.0 ml/min, sistema eluyente: agua /metanol /Ác. Acético (75:24:1 v/v/v). λ de 254 nm (Moon, y cols., **1998**).

Jham: Columna C₁₈, temperatura de 40°C, sistema eluyente: Ác. Fosfórico al 1 %. λ de 210 nm (Jham, y cols., **2002**).

Nardini: Columna C₁₈, temperatura de 30°C, con flujo de 1.0 ml/min, volumen de inyección de 50 μ L y sistema eluyente: 1.5 % de Ác. Acético glacial/agua más metanol (Nardini, y cols., **2002**).

Nuutila: Columna C₁₈, con flujo de 0.8 ml/min, sistema eluyente: Metanol 20 a 60 % más 300 μ L/L de Ác. trifluoroacético. λ de 280 y 340 nm (Nuutila, **2002**).

En general, de estas técnicas se tomaron las condiciones que se utilizaron en el método implementado que se describe a continuación. Se emplearon las condiciones siguientes: columna C₁₈, temperatura de 45°C, con flujo de 1.0 ml/min, volumen de inyección de 20 μ L y sistema eluyente: Agua-ácido acético al 1%/metanol (70:30). La columna se mantuvo a una temperatura de 45°C ya que esto aunado a todo el sistema,

permitió que el tiempo de retención en el que aparecieron las señales de los compuestos fuera menor en comparación con otras metodologías, en donde se tienen tiempos que son de 5 y hasta 23 minutos (Rodríguez de Sotillo, y cols. **1994a**; y Nardini, y cols., **2002**). Tomando en cuenta el trabajo de Kurkin (**2003**), dónde define que los máximos de absorción son de $\lambda = 247, 299, \text{ y } 327 \text{ nm}$ para AC y $\lambda = 243, 300 \text{ y } 330 \text{ nm}$ para ACG, la detección de las señales de los diferentes compuestos estudiados con el sistema implementado en este trabajo se hizo a una λ de 330 nm.

Utilizando el método de HPLC implementado en este proyecto, se determinó que el tiempo de retención en el que apareció la señal del estándar de ACG fue de 3.2 ± 0.1 minutos. El resultado de la aplicación de los extractos de cada muestra de café, fue la aparición de una señal que cayó dentro de dicho tiempo de retención. En la figura 6.2 se observa el cromatograma obtenido del análisis del extracto del café verde de Chiapas, en él se puede observar la señal característica que apareció en todos los extractos. Con base a estos resultados, se corroboró lo obtenido por CCF y se confirmó la presencia de ACG en los diferentes extractos obtenidos. Estos resultados revelaron que con el método propuesto fue posible obtener ACG presente en el café verde.

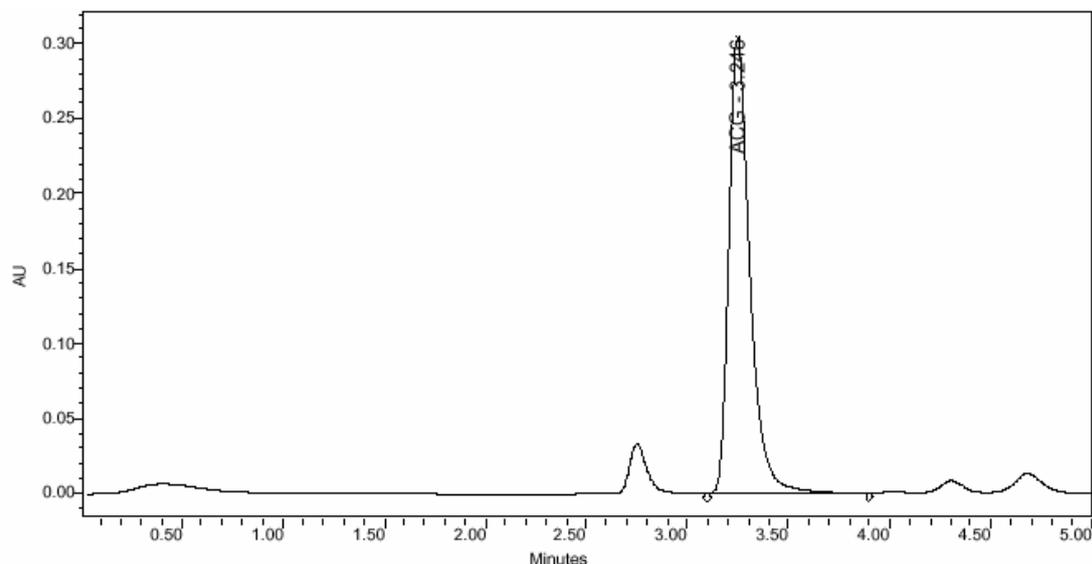


Fig. 6.2 Cromatograma de HPLC del extracto de café verde de Chiapas. ACG= ácido clorogénico; tiempo de retención: 3.246 minutos. Condiciones: Columna fase reversa C_{18} . Temperatura de columna 45°C , λ 330 nm. Sistema eluyente: Agua-Ác. Acético 1%/MeOH (70:30). Con flujo de 1ml/min

6.3.2 Concentraciones de ACG obtenidas en cada muestra.

Con base a los resultados obtenidos por HPLC (Anexo II, págs. 70-72), se calcularon las concentraciones de ACG obtenidas en el café verde de cada Estado (Anexo II, págs. 70-73). Dichos resultados se observan en la tabla 6.2.

Concentraciones de ACG

Muestra	Lote	g ACG / 50 g de café molido
Chiapas	1	1.2
	2	1.2
	3	1.3
Veracruz	1	0.7
	2	1.0
	3	1.1
Oaxaca	1	1.1
	2	0.8
	3	0.9
Hidalgo	1	0.8
	2	0.7
	3	0.8

Tabla 6.2 Tabla de concentraciones de ACG obtenida a partir de los resultados de HPLC.

Para comparar los resultados cuantitativos obtenidos en este proyecto contra los reportados en la literatura, las concentraciones de ACG se expresaron en porcentaje (Anexo II, pág. 74). Dichos valores se presentan en la tabla 6.3. (Se hizo el promedio de los resultados obtenidos en los tres lotes hechos de cada tipo de café estudiado).

Porcentaje de ACG

Estado	% ACG
Chiapas	2.6 \pm 0.14
Veracruz	2.0 \pm 0.44
Oaxaca	1.9 \pm 0.22
Hidalgo	1.6 \pm 0.15

Tabla 6.3 Tabla de porcentaje de ACG obtenida a partir del análisis cuantitativo de HPLC.

En la tabla 6.3 se observó que sí varió el contenido de ACG en cada tipo de café y que como se había supuesto en la etapa anterior, el mayor porcentaje de ACG lo

presentó el café verde de Chiapas con un 2.6 ± 0.14 %, seguido por el café de Veracruz, Oaxaca e Hidalgo con un 2.0 ± 0.44 , 1.9 ± 0.22 y 1.6 ± 0.15 % respectivamente. Los porcentajes de ACG obtenidos con la técnica de extracción empleada (proporción 1:6, metanol como disolvente), están por debajo del promedio reportado que es del 7 % de ACG en la especie *Coffea arabica*. Al comparar contra el método usado por Ky y cols., **1997**, (proporción 1:100 usando metanol/agua (70:30) como disolvente) en el que se obtuvo un 6.05 % de ACG; y el método empleado por Guerrero y cols., **2001**, (proporción 1:50 empleando etanol al 80 % como disolvente) en donde se obtuvo de 7.87 a 11.13 % de ACG, se puede ver que el método de extracción que se emplee influye en el rendimiento de ACG extraído, pues depende del disolvente que se utilice. Se encontraron referencias donde se reporta un intervalo de 5 a 8 % (Kirk-Othmer, **1983**). Por otro lado, Rogers y cols. (**1999**) reportan un intervalo de 5 a 10 %, mientras que Belitz (**1997**) reporta el intervalo más amplio que es de 4.5 a 11.1 %. En un trabajo posterior, Ky y cols. encontraron un intervalo de 3.4 a 4.8 % en otros tipos de *C. arabica*. Sin embargo, en una referencia más reciente, se reportó que hay tipos de *C. arabica* que tienen un intervalo de 1.2 a 3.8 % (Pchelkin **2003**) los cuales se asemejan a los resultados obtenidos en este proyecto.

La variación del contenido de ACG en el café es muy amplia, en el capítulo 2 ya se comentó que hay grandes variaciones en la composición química de los diferentes tipos de café de una misma especie. Retomando nuevamente el trabajo de Guerrero y cols. (**2001**) en donde se analizaron diferentes tipos de *C. arabica*, se reporta que obtuvieron un intervalo muy amplio del contenido de ACG que va de 7.87 a 11.13 % y que estuvo en función del tipo de *C. arabica*. Sin embargo, no sólo depende de la especie, sino también de las condiciones de cultivo, la edad y del grado y tipo de daño de las semillas, ya que se ha reportado que las semillas inmaduras, de baja densidad, negras o dañadas por insectos presentan menor cantidad de ACG (Franca y cols., 2005). El método de obtención de las semillas también tiene influencia en la composición química final del café. La semilla se obtiene a partir de la drupa mediante dos métodos, si se aplica la *Vía húmeda*, el fruto se procesa inmediatamente, éste es despulpado y se fermenta desde 11 horas hasta varios días, mientras más prolongada sea esta etapa, hay mayor degradación de compuestos químicos, posteriormente se realiza el lavado en donde hay pérdida de polifenoles. En el caso de la *Vía seca*, el fruto se pone a secar al

sol durante tres semanas, posteriormente se realiza la decorticación; en esta técnica no hay lavado, razón por la cual lleva su nombre, por lo tanto hay menor pérdida de antioxidantes (Kirk-Othmer, **1983**; Belitz, **1997**).

En las técnicas de extracción de ACG que comúnmente se emplean en el laboratorio para trabajar con semillas de café, se emplea poca cantidad de muestra, se utilizan mezclas de agua con algún alcohol o solamente agua como disolvente, se ocupa un gran volumen de éste, por cuya etapa de evaporación se hace muy larga, sobre todo por la cantidad de agua que se debe eliminar. Además en tales técnicas, el problema es mucho mayor al escalar el tamaño de muestra inicial (Ky y cols., **1997**; Casal y cols., **1999**; Guerrero y cols., **2001**). En la técnica de extracción propuesta, se utiliza menor cantidad de disolvente, que además se puede recuperar en un 60% y se puede reutilizar; además de que la muestra inicial es mucho más grande. Al realizar esta técnica bajo condiciones de laboratorio, se tiene un ahorro de tiempo, energía y dinero. Estos hechos podrían resultar benéficos si se piensa en obtener ACG a escala industrial. Además de que la técnica propuesta puede optimizarse aún más, modificando el tamaño de la partícula de la molienda, la velocidad de agitación durante la extracción, se pueden probar otros disolventes que aumenten el rendimiento de extracción y que se eliminen fácilmente como el etanol o se puede aumentar el volumen de metanol utilizado en la extracción.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, no se puede asegurar que el café nacional presenta un bajo contenido de ACG, ya que como se mencionó, depende de muchos factores; por lo que se sugiere hacer más estudios al respecto. Sin embargo, para los fines de este trabajo, los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

Debido a que el extracto de café verde de Chiapas presentó el mayor contenido de ACG, se seleccionó para emplearlo en la hidrólisis enzimática (tercera etapa de este proyecto).

6.4 Tercera etapa.

Se obtuvo un extracto enriquecido de ACG a partir del extracto crudo, se utilizó una columna empacada de celulosa y metanol al 5 % como fase móvil para separar los carbohidratos presentes en el extracto crudo. Con el extracto enriquecido en ACG se hicieron ensayos previos aplicando la metodología de la patente 6, 066,311 (Cheetham y cols., 2000). En esta se describe que empleando una hidrolasa es posible obtener AC a partir de ACG. La metodología que maneja la patente es la siguiente: A 200 mg de ACG se le adicionan 10 ml de buffer de fosfato (pH 6.81). El pH de la solución se ajusta a 7.0 usando hidróxido de sodio 1 M, posteriormente la mezcla se incubaba a 37°C con 200 mg de lipasa de *C. antarctica*. La solución es incubada por 24 horas agitando a 200 rpm. Siguiendo estos pasos, se realizó esta metodología en el laboratorio utilizando lipasa de *C. antarctica* y otras hidrolasas comerciales (lipasa pancreática, Chirazime , Lipozima, X1 y X2), sin embargo no se logró la obtención de AC en ninguno de los diferentes ensayos.

Al no tener los resultados que se deseaban, se tomaron en consideración los procedimientos enzimáticos empleados para la obtención de AF, ya que es un compuesto que al igual que el AC pertenece al grupo de los AHC, tienen una estructura química muy similar y comparten ciertas propiedades (Capítulo 2, pág. 21).

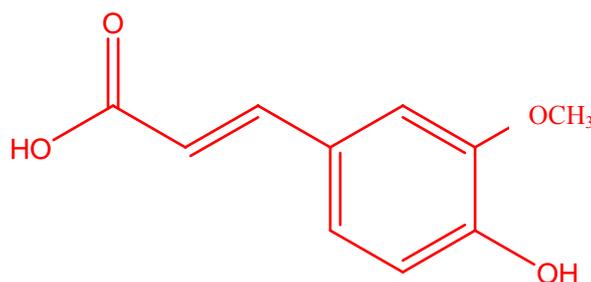


Fig. 6.3 Estructura del AF.

El método enzimático empleado, se diseñó tomando como referencia los trabajos de Faulds, y cols., 1993; Ralet, y cols., 1994; Bartolomé, y cols., 1997 y Cheetham, y cols., 2000. Capítulo 5, pág. 50-51. Con esta metodología propuesta solamente las

enzimas X1 y X2 produjeron el AC. El hecho de que solamente estas enzimas realizaran la hidrólisis deseada, se podría deber a que las esterasas preferentemente rompen enlaces éster de compuestos de cadenas hidrocarbonadas cortas, como es nuestro caso; a diferencia de las lipasas que actúan sobre cadenas hidrocarbonadas largas (Fojan, y cols., 2000).

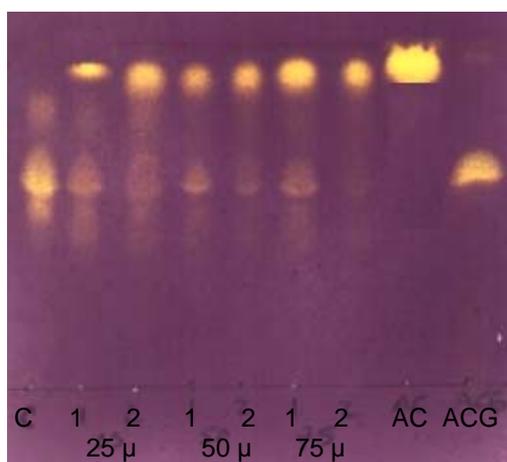
El hecho de que X1 y X2 realizaran la hidrólisis deseada empleando la técnica propuesta fue muy importante en este trabajo; las enzimas X1 y X2, así como la información relacionada con ellas, pertenecen a una patente de carácter confidencial; además, la técnica se probó directamente en el extracto crudo y se obtuvo el mismo resultado, por lo cual la obtención del extracto rico en ACG ya no fue necesaria. Los resultados fueron los siguientes.

6.4.1 Identificación cualitativa de AC.

Identificación con cromatografía en capa fina.

En la siguiente figura se muestra la cromatoplaqueta hecha al extracto crudo con ACG obtenido del café de Chiapas y que fue sometido al método de hidrólisis enzimático propuesto.

En la figura 6.4 se presentan las aplicaciones de izquierda a derecha: extracto crudo (C), extracto hidrolizado con X1 (1) y X2 (2) a los diferentes volúmenes de enzima establecidos previamente (25, 50 y 75 μ L), estándar de ácido caféico (AC) con Rf de 0.89 y estándar de ácido clorogénico (ACG) con Rf de 0.60.



Condiciones

Fase estacionaria:
cromatoplaqueta de sílica gel.

Fase móvil:
CHCl₃/MeOH/H₂O (3.5:1.3:0.2).

Revelador:
radical-DPPH al 0.2% en metanol.

Fig. 6.4 Cromatoplaqueta para analizar extracto de ACG hidrolizado con 25,50 y 75 μ L de E1 y E2.

En la imagen se puede apreciar la disminución del ACG del extracto crudo (mancha con Rf de 0.60) y la aparición de AC (mancha con Rf de 0.89) que se tuvo como resultado de la acción de las enzimas X1 y X2 en todos los casos. En el ensayo con 75 μ L de enzima X2, el ACG desapareció aparentemente por completo; se obtuvo un resultado diferente con la enzima X1, en donde se observa que hubo una presencia mayor de ACG. Estos resultados sugirieron que tal vez la enzima X2 era más eficaz que la enzima X1 para realizar la hidrólisis de ACG en las condiciones aplicadas, este resultado concuerda con las actividades que se conocen de las enzimas X1 y X2 (7 y 36 U/g respectivamente) para la obtención del AF. Sin embargo, para asegurarlo, hacían falta los análisis cuantitativos.

Identificación con HPLC.

Se determinó el tiempo de retención en el que aparece la señal del estándar de AC utilizando el método de HPLC desarrollado. Con este método el AC aparece en 4.3 ± 0.1 minutos. Este resultado reveló que el método de HPLC empleado permite la determinación simultánea de AC y ACG, como podemos observar en la figura 6.4. En el cromatograma, se logra identificar la aparición de AC en el extracto hidrolizado.

Con los resultados cualitativos obtenidos (análisis con CCF y HPLC) se puede asegurar que las enzimas X1 y X2 son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis del ACG y que permiten la obtención de AC, así que es posible obtener AC a partir de ACG recuperado de café verde nacional aplicando la metodología enzimática propuesta.

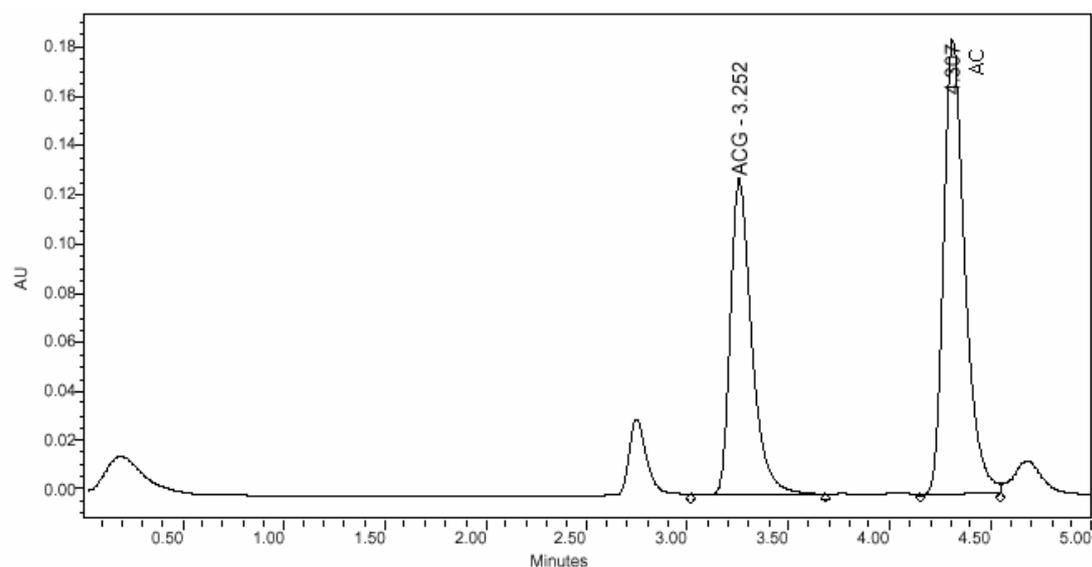


Fig. 6.4 Cromatograma de HPLC del extracto de café verde de Chiapas hidrolizado. ACG = ácido clorogénico; tiempo de retención: 3.252 minutos. AC = ácido caféico; tiempo de retención: 4.307 minutos. Condiciones: Columna fase reversa C₁₈. Temperatura de columna 45°C, λ 330 nm. Sistema eluyente: Agua-Ác. Acético 1%/MeOH (70:30). Con flujo de 1ml/min

6.4.2 Cuantificación de AC.

La solución de extracto de ACG de la que se partió para hacer los diferentes estudios (solución madre), presentó una concentración inicial de ACG de 0.142 milimoles por litro (mM). En la siguiente tabla se presentan las concentraciones promedio de AC obtenidas en las diferentes condiciones de hidrólisis.

Concentraciones de AC obtenidas por la hidrólisis enzimática

C (μl) de enzima	Sin N ₂ (mM)	Con N ₂ (mM)
25 X1	0.194 ± 0.013	0.174 ± 0.007
25 X2	0.282 ± 0.005	0.277 ± 0.025
50 X1	0.249 ± 0.011	0.320 ± 0.004
50 X2	0.292 ± 0.021	0.377 ± 0.026
75 X1	0.280 ± 0.020	0.328 ± 0.012
75 X2	0.305 ± 0.021	0.333 ± 0.008

Tabla 6.4 Concentraciones de AC obtenidas a diferentes concentraciones de X1 y X2 en atmósfera con y sin N₂. Concentración inicial de ACG: 0.142 mM. mM = milimoles/ litro.

En la tabla 6.4 se presentan las concentraciones milimolares de AC obtenidas a partir de los diferentes ensayos de hidrólisis del extracto de café de Chiapas. Donde se observa que la enzima X2 produjo mayor concentración de AC que la enzima X1. Por ejemplo, con atmósfera de nitrógeno y a 50 μL de cada enzima, mientras que X2

produjo 0.377 mM. Por otro lado, con una atmósfera libre de nitrógeno X2 produjo 0.292 mM y X1 produjo 0.249 mM. Estos resultados indican que la enzima X2 es más eficaz que X1 para realizar la reacción de hidrólisis del ACG y producir AC en las condiciones en que se desarrolló la técnica. Este resultado concuerda con lo que se conoce de las enzimas X1 y X2, ya que tienen actividades de 7 y 36 U/g respectivamente. Dichas actividades hidrolíticas ya se conocían al utilizar como sustrato otros compuestos (como ya se mencionó para la obtención de AF), no así para la obtención del AC. En la tabla 6.4 también se observa que a 25 μ L de enzima, X1 y X2 produjeron mayor cantidad de AC en una atmósfera libre de nitrógeno que realizando la reacción en atmósfera de nitrógeno. Por el contrario, al aumentar la cantidad de enzima a 50 y 75 μ L, se observó que la mayor producción de AC se obtuvo en la atmósfera de nitrógeno. Sobre todo este efecto se ve más claro a 50 μ L, donde X1 produjo 0.320 mM en atmósfera de nitrógeno contra 0.249 mM en atmósfera libre de nitrógeno. Mientras que X2 en atmósfera de nitrógeno produjo 0.377 mM contra 0.292 mM en atmósfera libre de nitrógeno. De acuerdo al último resultado mencionado, se aprecia que tal como ocurre en la hidrólisis química del ACG en los trabajos reportados por Nardini y cols., **2002**; y Nuutila, **2002**, al hacer la reacción en atmósfera de nitrógeno se favorece el incremento del rendimiento del AC obtenido.

La reacción de hidrólisis de ACG, tiene una estequiometría 1:1, es decir, que por cada mol de ACG se producirán una mol de AC y una mol de AQ. Revisando este fundamento, se observa en los resultados de la tabla 6.4 un sobrerendimiento, ya que se partió de 0.142 mM de ACG y todas las concentraciones de AC obtenidas posteriores a la hidrólisis enzimática estuvieron por arriba de dicho valor. Además, después de aplicar el método de hidrólisis, se tuvieron remanentes de ACG. Lo que sobreestimaría aún más los rendimientos de reacción. Ya que como se observa en la tabla 6.5, para el caso de 25 μ L de enzima X1 en atmósfera con y sin nitrógeno, se tuvieron remanentes de 0.085 y 0.041 mM respectivamente; y 0.021 mM con 50 μ L de X1 en atmósfera de nitrógeno. A continuación en la tabla 6.5 se muestran las concentraciones de los remanentes y los casos en los que se presentaron.

Concentración de ACG remanente después de la hidrólisis

Volumen de enzima (μL)	Concentración mM de ACG en atmósfera sin nitrógeno		Concentración mM de ACG en atmósfera con nitrógeno	
	X1	X2	X1	X2
25	0.041 \pm 0.006	0.000	0.085 \pm 0.011	0.000
50	0.000	0.000	0.021 \pm 0.002	0.000
75	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 6.5 Tabla de concentraciones de ACG remanente después de la hidrólisis enzimática con los diferentes volúmenes de enzima estudiados y en atmósfera con y sin nitrógeno. Datos obtenidos con el análisis cuantitativo con HPLC.

En la tabla 6.6 se presentan los porcentajes de hidrólisis de ACG obtenidos en los diferentes ensayos a partir de los datos obtenidos en la tabla 6.5.

Porcentaje de hidrólisis de ACG

Volumen de enzima (μL)	% de hidrólisis en atmósfera sin nitrógeno		% de hidrólisis en atmósfera con nitrógeno	
	X1	X2	X1	X2
25	70.9	100.0	40.4	100.0
50	100.0	100.0	84.9	100.0
75	100.0	100.0	100.0	100.0

Tabla 6.5 Tabla de porcentaje de ACG hidrolizado con los diferentes volúmenes de enzima estudiados y en atmósfera con y sin nitrógeno. Porcentajes calculados con respecto al ACG inicial: 0.14285 mM.

Finalmente, en la tabla 6.5 se observa que la enzima X2 hidrolizó por completo al ACG en todos los casos, reiterando su mayor eficacia en comparación con X1. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos por Asther y cols. (2005) recientemente, donde en su trabajo también obtuvieron sobrerendimientos de AC al emplear una enzima aislada de *A. níger* para hidrolizar al ACG.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se piensa que X1 y X2 no sólo hidrolizan al ACG, si no que también presentan actividad sobre otros ésteres de AC presentes en el café verde tales como los ácidos dicafeoilquínicos, los ácidos feruilcafeoilquínicos o incluso sobre los cafeoilglucósidos, dando como resultado la producción de AC; la cual sumándose a la producción de AC por la hidrólisis del ACG, explicaría por qué se tienen sobrerendimientos. Por otro lado, al no separar los carbohidratos en el extracto crudo, el ACG puede estar unido a éstos y al no estar libre, no se cuantificó al inicio; al agregar las enzimas X1 y X2 (las cuales presentan actividad

celulosa), podrían liberar el ACG unido a los carbohidratos y aumentar la concentración de ACG inicial e impactar directamente en el rendimiento de AC obtenido al final de la hidrólisis

Con los resultados obtenidos en esta investigación se demuestra que el nuevo método desarrollado, fue eficaz para la obtención de AC a partir de ACG recuperado de café verde nacional. Dando la pauta a nuevas investigaciones para su posible aplicación industrial, ya que es un método rápido y sencillo.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- Se puede recuperar ACG del café verde nacional con el método de extracción propuesto.
- Hay diferencias en el contenido de ACG de cada café estudiado a pesar de que todas las semillas de café eran la especie *Coffea arabica*.
- El café verde de Chiapas tiene el mayor contenido de ACG con un 2.6 %, seguido por el café de Veracruz, Oaxaca e Hidalgo con un 2.0, 1.9 y 1.6 % respectivamente.
- Los rendimientos de ACG obtenidos con el método de extracción empleado son bajos comparados con el 7 % promedio, pero están dentro de los intervalos reportados.
- El método de extracción utilizado, al parecer ofrece un menor gasto de energía y un ahorro de tiempo y dinero en comparación con las metodologías que se emplean bajo condiciones de laboratorio. Esto puede ser interesante si se piensa en un método para la obtención de ACG a escala industrial.
- Las enzimas X1 y X2 llevan a cabo la hidrólisis de ACG y producen AC.
- La enzima X2 es más eficaz que la enzima X1 bajo las condiciones desarrolladas en este trabajo para la obtención de AC a partir de ACG.
- Se obtienen mejores rendimientos de AC producido, cuando el método de hidrólisis se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno a 50 y 75 μL de las enzimas X1 y X2.
- Con el método de hidrólisis desarrollado se tiene sobre rendimiento de AC producido debido a que X1 y X2 tienen la habilidad de presentar actividad sobre otros ésteres de AC presentes en el café verde.

- El método enzimático desarrollado, es una técnica novedosa que permite la obtención de AC a partir de ACG recuperado de café verde nacional.
- El café verde nacional es una fuente importante de AC y ACG.

CAPÍTULO 8. ANEXOS

Anexo I. Cálculo del porcentaje de extracto seco.

Para hacer el cálculo se empleó la siguiente ecuación.

$$\% E = (M_{BE} - M_M) 100 / M_{CM}$$

En dónde,

$\% E$ = Porcentaje de extracto crudo obtenido.

M_E = Masa de extracto.

M_M = Masa del matraz.

M_{CM} = Masa de café molido.

Ejemplo:

Extracto de Café de Oaxaca. Lote 1.

$$\% E = (128.4300g - 122.5920g) 100 / 50g$$

$$\% E = \mathbf{11.6760}$$

En la tabla siguiente se presenta el porcentaje de extracto crudo obtenido en cada muestra y la masa inicial de extracto que se tuvo en cada caso a partir de los 50 g de café molido.

Tabla de porcentaje de extracto crudo obtenido

OAXACA					
LOTE	m café molido(g)	Exto.+ matraz(g)	Matraz(g)	Extracto(g)	% Extracto
1	50	128.4300	122.5920	5.8380	11.6760
2	50	91.7573	86.0787	5.6786	11.3572
3	50	91.5328	86.0787	5.4541	10.9082
VERACRUZ					
LOTE	m café molido(g)	Exto.+ matraz(g)	Matraz(g)	Extracto(g)	% Extracto
1	50	46.1813	39.8314	6.3499	12.6998
2	50	34.2019	28.4547	5.7472	11.4944
3	50	34.4810	28.9501	5.5309	11.0618
HIDALGO					
LOTE	m café molido(g)	Exto.+ matraz(g)	Matraz(g)	Extracto(g)	% Extracto
1	50	48.6251	43.2028	5.4223	10.8446
2	50	127.6250	122.5920	5.0330	10.0660
3	50	89.5184	84.6039	4.9145	9.8290
CHIAPAS					
LOTE	m café molido(g)	Exto.+ matraz(g)	Matraz(g)	Extracto(g)	% Extracto
1	50	129.3800	122.5870	6.7930	13.5860
2	50	50.8953	42.63280	8.2625	16.5250
3	50	91.8109	84.5990	7.2119	14.4238

Anexo II. Cálculo de concentraciones y porcentajes de ACG en cada tipo de café.

Para obtener el % de ACG fue necesario obtener una serie de datos previos. En primer lugar se obtuvo la concentración de ACG en cada caso empleando la ecuación de la curva estándar.

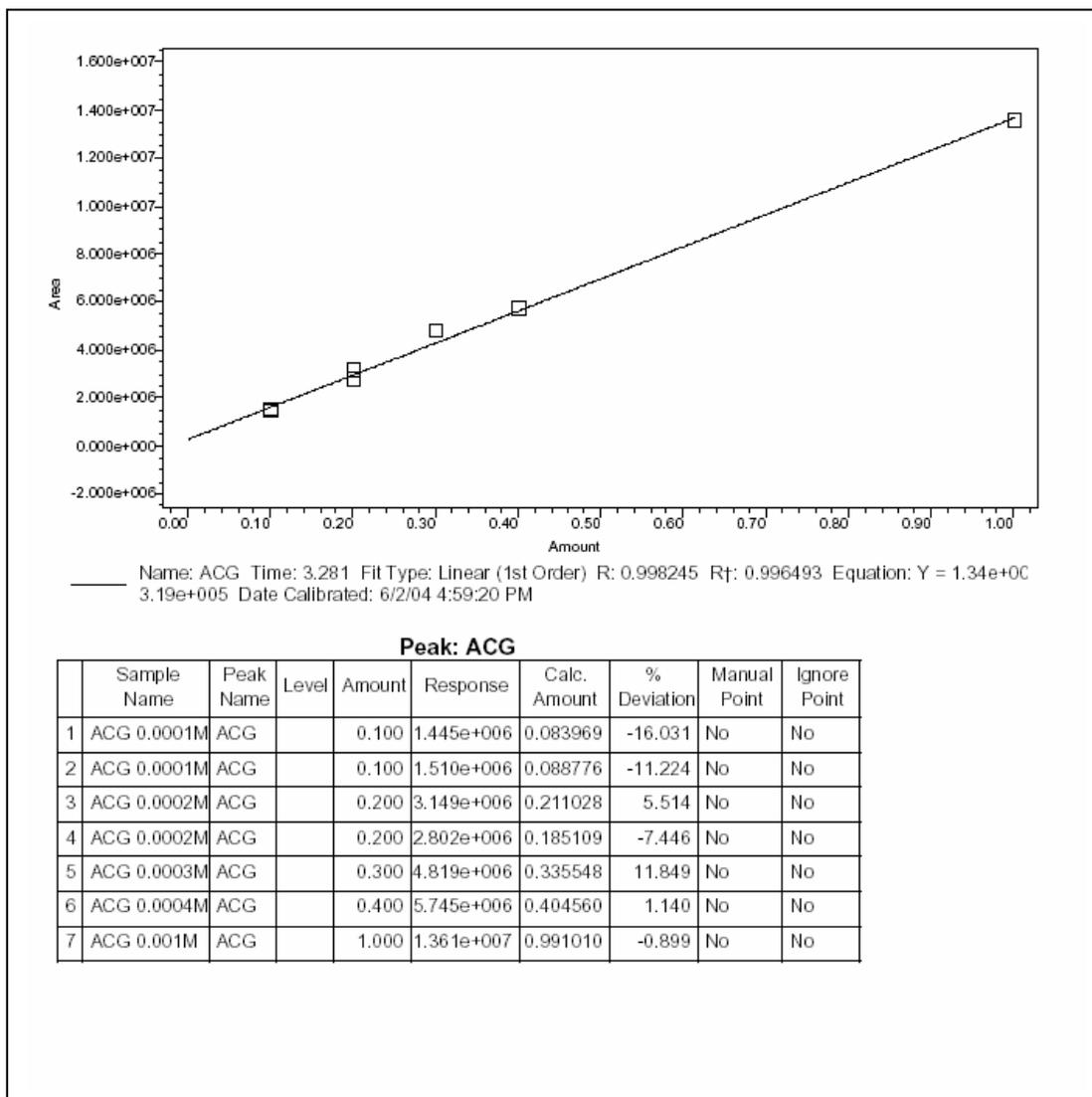
$$Y = X 1.34 \times 10^7 - 3.19 \times 10^5$$

En donde:

Y = Área de la señal obtenida en el cromatograma de cada muestra.

X = Concentración de ACG.

Curva estándar de ACG



Ecuación de la curva

$$Y = (1.34 \times 10^7) X + 3.19 \times 10^5$$

De la ecuación se despejó X.

$$X = \frac{Y - 3.19 \times 10^5}{1.34 \times 10^7}$$

Ejemplo de cálculo de % ACG para Oaxaca Lote 1, Area 1.

$$X = \frac{386543 - 3.19 \times 10^5}{1.34 \times 10^7} = 0.15429 \text{ mM}$$

En la tabla que se muestra a continuación se presentan las concentraciones obtenidas en cada caso.

Muestra	Lote	M en100ml MOPS (g)	Área			C _{ACG} (mM)		
			Inyección			1	2	3
			1	2	3			
	1	0.03010	2386543	2321889	2389406	0.15429	0.14947	0.15451
O	2	0.03090	1985969	2077824	2036047	0.12440	0.13125	0.12814
	3	0.03130	2249202	2368559	2402532	0.14404	0.15295	0.15549
	1	0.03620	1913342	1925389	1900583	0.11898	0.11988	0.11803
V	2	0.03100	2421634	2729127	2463209	0.15691	0.17986	0.16001
	3	0.03320	2729624	3034939	3034571	0.17989	0.20268	0.20265
	1	0.03010	2084882	2344827	2056258	0.13178	0.15118	0.12965
H	2	0.03820	2346008	2519906	2381518	0.15127	0.16425	0.15392
	3	0.03390	2427205	2432089	2289750	0.15733	0.15769	0.14707
	1	0.03070	2431554	2126019	2722405	0.15765	0.13485	0.17936
C	2	0.03600	2349158	2761385	2531531	0.15150	0.18227	0.16511
	3	0.03130	2483329	2683302	2465940	0.16152	0.17644	0.16022

O: Café de Oaxaca.

V: Café de Veracruz.

H: Café de Hidalgo.

CE: Café de Chiapas.

CA: Café de Chiapas.

M en100ml MOPS: Masa de extracto diluida en 100 ml de MOPS para el análisis en HPLC.

C_{ACG}: Concentración de ACG en el extracto crudo de cada tipo de café.

En segundo lugar, se calculó la masa de ACG presente en cada extracto crudo empleando las concentraciones de ACG y el peso molecular ($PM_{ACG} = 354 \text{ g/mol}$).

Continuando con el ejemplo:

$$0.15429 \times 10^{-3} \text{ mol/L} (354 \text{ g/mol}) = 0.0562 \text{ g/L} (100 \text{ ml}/1000 \text{ ml}) = \mathbf{0.00546 \text{ g}}$$

Con este valor y empleando la masa de extracto crudo usada en el análisis de HPLC, que para el ejemplo es 0.0301 g, se hace la siguiente relación.

$$\begin{array}{l} 0.0301\text{g} \quad \text{---} \quad 100\% \\ 0.00546\text{g} \quad \rightarrow \quad X \end{array} \quad X = \mathbf{18.1457\%} \text{ de ACG en el extracto seco.}$$

Con este dato se calculó la masa de ACG presente en la masa total de cada extracto.

Siguiendo el ejemplo:

El extracto seco obtenido fue de 5.8380 g, con estos datos hacemos la relación siguiente:

$$\begin{array}{l} 5.8380\text{ g} \quad \text{---} \quad 100\% \\ X \quad \leftarrow \quad 18.1457\% \end{array} \quad X = \mathbf{1.05935\text{ g}}$$

Se encontró 1.05935 g de ACG en el extracto obtenido a partir de los 50 g de café molido. A continuación se muestran los datos obtenidos en cada muestra.

Muestra	Lote	% ACG en extracto para HPLC			Extracto(g)	g ACG en extracto
		1	2	3		
	1	18.14573	17.57886	18.17161	5.83800	1.05935
O	2	14.25165	15.03641	14.68012	5.67860	0.80929
	3	16.29079	17.29850	17.58577	5.45410	0.88852
	1	11.63506	11.72307	11.54216	6.34990	0.73881
V	2	17.91811	20.53885	18.27211	5.74720	1.02979
	3	19.18104	21.61106	21.60786	5.53090	1.06088
	1	15.49838	17.77997	15.24787	5.42230	0.84037
H	2	14.01821	15.22107	14.26379	5.03300	0.70554
	3	16.42915	16.46674	15.35775	4.91450	0.80741
	1	18.17853	15.54948	20.68190	6.79300	1.23487
C	2	14.89750	17.92322	16.23582	8.26250	1.23091
	3	18.26776	19.95519	18.12073	7.21190	1.31745

Finalmente se calcula el porcentaje de ACG obtenido en cada tipo de café verde.

Para el ejemplo:

$$\begin{array}{l} 50 \text{ g} \text{ ——— } 100\% \\ 1.5935 \text{ g} \text{ — } \rightarrow \text{ X} \end{array} \quad \text{X} = 2.11869 \%$$

Masa de ACG en extracto seco

Muestra	Lote	%ACG			%ACG prom.	%ACG p/mta.
		1	2	3		
O	1	2.11869	2.05251	2.12172	2.09764	1.87430
	2	1.61859	1.70771	1.66725	1.66452	
	3	1.77703	1.88695	1.91829	1.86076	
V	1	1.47763	1.48881	1.46583	1.47742	1.98394
	2	2.05958	2.36082	2.10027	2.17356	
	3	2.12176	2.39057	2.39022	2.30085	
H	1	1.68074	1.92817	1.65357	1.75416	1.59826
	2	1.41107	1.53215	1.43579	1.45967	
	3	1.61482	1.61852	1.50951	1.58095	
C	1	2.46973	2.11255	2.80984	2.46404	2.62507
	2	2.46181	2.96181	2.68297	2.70220	
	3	2.63491	2.87830	2.61370	2.70897	

Anexo III. Producción de AC con la hidrólisis enzimática.

Para hacer la cuantificación de AC se partió de una solución madre de ACG que se sometió a la hidrólisis.

mM de ACG inicial

Se pesaron 0.028g de extracto seco del café CA que tuvo en mayor contenido de ACG y se disolvieron en 100 ml de MOPS.

0.028g / 100 ml. MOPS

El área de respuesta en HPLC fue: 260022

Empleando estos datos y la ecuación de la curva de ACG, se calculó la concentración inicial de ACG en la solución madre.

$$\frac{2260022 - 3.19 \times 10^5}{1.34 \times 10^7} = 0.14485$$

Se tuvo 0.14285 mM de ACG inicial, lo cual equivale a 0.0050568g de ACG.

Cálculo de AC.

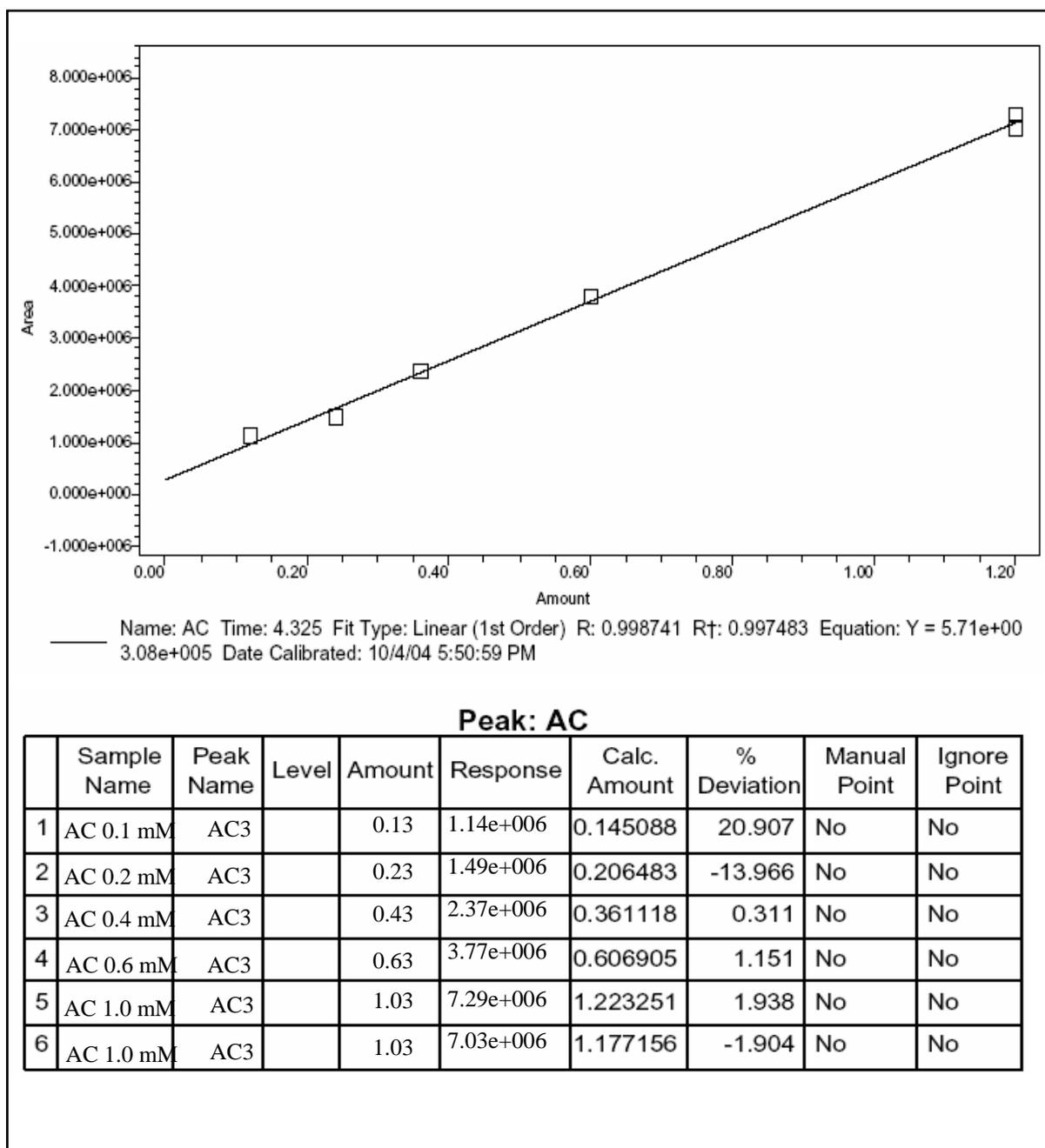
Para identificar el AC producido, se empleó la ecuación de la curva estándar:

$$Y = (5.71 \times 10^6) X + 3.08 \times 10^5$$

donde se despejó X

$$X = \frac{y - 3.08 \times 10^5}{5.71 \times 10^6}$$

Curva estándar de AC



En las tablas siguientes se presentan las concentraciones de AC obtenidas y los remanentes de ACG en las diferentes condiciones de hidrólisis.

Nomenclatura utilizada en las tablas.

CE = Concentración de enzima; M = Repetición; A_{ACG} = Área de ACG; A_{AC} = Área de AC; C_{ACG} (mM) = Concentración de ACG; C_{AC} (mM) = Concentración de AC; Prom. C_{AC} (mM) = Concentración promedio de AC.

Enzima 1 sin N₂.

CE μ l	M	A _{ACG}	A _{AC}	C _{ACG} (mM)	C _{AC} (mM)	Prom. C _{AC} (mM)
25	1	952268	1355305	0.04725	0.18341	0.19465
	2	966425	1380217	0.04832	0.18777	
	3	777491	1946975*	0.03422	0.28703	
	4	806539	1523084	0.03638	0.02127	
50	1	0	1723458	0	0.24789	0.24929
	2	0	1804281	0	0.26204	
	3	0	1764797	0	0.25513	
	4	0	1633459	0	0.23212	
75	1	0	1975651	0	0.29205	0.28095
	2	0	2009352	0	0.29796	
	3	0	1746448	0	0.25191	
	4	0	1917402	0	0.28185	

Enzima 1 con N₂.

CE μ l	M	A _{ACG}	A _{AC}	C _{ACG} (mM)	C _{AC} (mM)	Prom. C _{AC} (mM)
25	1	1699345	1274552	0.10301	0.16927	0.17422
	2	1441357	1366319	0.08376	0.18534	
	3	1328044	1273665	0.07530	0.16911	
	4	1371135	1296750	0.07852	0.17316	
50	1	626379	2133963	0.02294	0.31978	0.32071
	2	641567	2172501	0.02407	0.32653	
	3	577662	2115406	0.01930	0.31653	
	4	588010	2135389	0.02007	0.32003	
75	1	0	2099326	0	0.31371	0.32829
	2	0	2138397	0	0.32055	
	3	0	2226726	0	0.33602	
	4	0	2266083	0	0.34291	

Enzima 2 sin N₂.

CE μ l	M	A _{ACG}	A _{AC}	C _{ACG} (mM)	C _{AC} (mM)	Prom. C _{AC} (mM)
25	1	0	1915495	0	0.28152	0.28235
	2	0	1960956	0	0.28948	
	3	0	1879838	0	0.27527	
	4	0	1922344	0	0.28272	
50	1	0	1852239	0	0.27044	0.29208
	2	0	1863771	0	0.27246	
	3	0	2097463	0	0.31339	
	4	0	2089714	0	0.31203	
75	1	0	1958851	0	0.28911	0.30573
	2	0	1982847	0	0.29331	
	3	0	2263998	0	0.34255	
	4	0	2009383	0	0.29796	

Enzima 2 con N₂.

CE μ l	M	A _{ACG}	A _{AC}	C _{ACG} (mM)	C _{AC} (mM)	Prom. C _{AC} (mM)
25	1	0	1729492	0	0.24894	0.27715
	2	0	1764059	0	0.25500	
	3	0	2030078	0	0.30158	
	4	0	2038794	0	0.30311	
50	1	0	2617820	0	0.40452	0.37781
	2	0	2603169	0	0.40195	
	3	0	2269363	0	0.34349	
	4	0	2371062	0	0.36130	
75	1	0	2249584	0	0.34003	0.33306
	2	0	2237644	0	0.33794	
	3	0	2128172	0	0.31876	
	4	0	2223884	0	0.33553	

Ejemplo de cálculos.

Para 25 μ l E1, primera repetición. Se tuvo un área de 952268 de ACG.

Sustituyendo en la ecuación de la curva estándar de ACG:

$$A = 952268$$

$$X = \frac{952268 - 3.19 \times 10^5}{1.34 \times 10^7} = 0.04725 \text{ mM}$$

Se obtuvo un área de 1355305 de AC.

Sustituyendo en la ecuación de la curva estándar de AC:

$$A = 1355305$$

$$X = \frac{1355305 - 3.08 \times 10^5}{5.71 \times 10^6} = 0.18341 \text{ mM}$$

1,3-AdiCQ	Ácido 1,3-dicafeoilquínico
3,4-AdiCQ	Ácido 3,4-dicafeoilquínico
3,5-AdiCQ	Ácido 3,5-dicafeoilquínico
3-ACQ	Ácido 3-cafeoilquínico
4,5-AdiCQ	Ácido 4,5-dicafeoilquínico
4-ACQ	Ácido 4-cafeoilquínico
5-ACQ	Ácido 5-cafeoilquínico
5-AFQ	Ácido 5-feruloilquínico
AC	Ácido caféico
ACG	Ácido clorogénico
ACGs	Ácidos clorogénicos
ACQs	Ácidos cafeoilquínicos
AdiCQs	Ácidos dicafeoilquínicos
AF	Ácido ferúlico
AFE	Ácido ferúlico esterasas
AFQ	Ácidos feruloilquínico
AFQs	Ácidos feruloilquínicos
AHC	Ácidos hidroxicinámicos
AQ	Ácido quínico
C	Extracto crudo de ACGs
CCF	Cromatografía en capa fina
E	Extracto de ACG
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EM	Espectroscopia de masas
HPCE	Electroforesis capilar de alta resolución
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectroscopia de masas
HPLC-SM-IES	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectroscopia de masas con ionización con electrospray
IQPA	Interfase de ionización química a presión atmosférica
IR	Infrarrojo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MOPS	
ODS	Octadecililano
RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Asther, M., Estrada, M., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lsage-Meessen, L., Record, E. Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology*, 115, 47-56, **2005**.
2. Barco, A., Benetti, S., De Risi, C., Marchetti, P., Pollini, G., Zanirato, V. D-(-)-Quinic acid: a chiron store for natural product synthesis. *Tetrahedron: Asimmetry*, 8(21)1, pp. 3515-3517, **1997**.
3. Bartolomé, B., Faultd, C., Kroon, P., Waldron, K., Gilbert H., Hazlewood, G., Williamson, G. An *Aspergillus niger* Esterase (Ferulic Acid Esterase III) and Recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulose* Esterase (XyID) Release a 5-5' Ferulic Dehydrodimer (Diferulic Acid) from Barley and Wheat Cell Walls. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), pp. 208-212, **1997**.
4. Bastos, C., Alves, R. Métodos para análise de ácido clorogénico. *Quim. Nova*, 7(4), pp. 586-592, **2004**.
5. Belitz, H. O., Química de los alimentos. Acribia, S. A. 2ª edic., Zaragoza, pp. 1011-1013, **1997**.
6. Bergeron, C., Gafner, S., Batcha, L., Angerhofer, C. Stabilization of Caffeic Acid Derivatives in *Echinacea purpurea* L. Glycerin Extract. *J. Agric. Food Chem.*, 50(14), pp. 3967-3970, **2002**.
7. Cartron, E., Carbonneau, M., Fouret G., Descomps, B., Léger, C. Specific Antioxidant Activity of Caffeoyl Derivatives and Other Natural Phenolic Compounds: LDL Protection against Oxidation and Decrease in the Proinflammatory Lysophosphatidylcholine Production. *J. Nat. Prod*, 64(4), pp. 480-482, **2001**.
8. Casal, S., Andrade, P., Oliveira, M., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Ferreira, M. Analysis of hydroxycinnamic acids of coffee: a comparison of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 22(4), pp. 513-521, **1999**.
9. Cervantes, A. Extracción y evaluación del ácido clorogénico del café como un antioxidante natural. Tesis de licenciatura (Químico de Alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 28-34, 1996.
10. Cheetham, P. S. J., y cols. Production and uses of caffeic acid and derivatives thereof. *United States Patent*: 6, 066,311, **2000**.
11. Chen, J., y Ho, C. Antioxidant Activities of Caffeic and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45(7), pp. 2374-2378, **1997**.
12. Chuda, Y., Suzuki, M., Nagata, T., Tsushida, T. Contents and Cooking Loss of Three Quinic Acid Derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 46(4), pp. 1437-1439, **1998**.
13. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates –nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, 80, pp. 1033-1040, **2000**.
14. Cos, P., Rajan, P., Vedernikova, I., Callome, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Augustyns, k., Haemers, A., Berghe, D. In *Vitro* Antioxidant Profile of Phenolic Acid Derivatives. *Free Radical Research.*, 36(6), pp. 711-712, **2002**.
15. Cotellet, P., y Vezin, H. Reaction of caffeic acid derivatives with acidic nitrite. *Tetrahedron Letters*, 42, pp. 3303-3305, **2001**.

16. Faulds, C., y Williamson, G. Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, pp. 349-359, **1993**.
17. Rosana, M., Silvina, B., Lotito, M., Ferraro, G., Phraga, C. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, 20(10), pp. 1437-1438, **2000**.
18. Foer, K. Biotransformations in Organic Chemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4ta. Edición, Alemania, pp.63-94, **2000**.
19. Fojan, P., Jonson, P., Petersen, M., Petersen, S. What distinguishes an esterase from lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, 82, pp. 1033-1041, **2000**.
20. Franca, A., Oliveira, L., Mendonça, J., Silva, X. Physical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chemistry*, 90, pp. 89-94, **2005**.
21. Francis, J. Encyclopedia of food science and technology. John Wiley & Sons, Inc. 2a. Edic. Massachusetts, vol. 1, pp. 354-355, **1997**.
22. Friedman, M. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 45(5), pp. 1523-1540, **1997**.
23. Gacesa, P. y Hubble, J. Tecnología de las enzimas. Acribia, S. A. Zaragoza, pp. 11-14, 113-115, **1990**.
24. Gillet, F., Mesnard, F., Fliniaux, O., Monti, J., Fliniaux M. Chlorogenic acid in a *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension. *Plant Physiol. Biochem.*, 37(11), pp. 869-875, **1999**.
25. Guerrero, G. y Suárez, M. Chlorogenic Acids as a Potential Criterion in Coffee Genotype Selections. *J. Agric. Food Chem.*, 49(5), pp. 2454-2458, **2001**.
26. Iwahashi, H., Morishita, H., Osaka, N., Kido, R. 3-O-feruloyl-4-O-caffeoylquinic acid from coffee beans. *Phytochemistry*, 24(3), pp. 630-632, **1984**.
27. Janicsák, G., Máthé, I., Miklóssy-Vári, V., Blunden, G. Comparative studies of rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, pp. 733-738, **1999**.
28. Jham, G., Fernandes, S., Garcia, C., Araujo Da Silva, A. Comparison of GC and HPLC for the Quantification of Organic Acids in Coffee. *Phytochem. Anal.*, 13, 99-104, **2002**.
29. Khramov, V., y Dmitrienko, N. V. Chlorogenic acid in leaves and lyophilized extracts of *Stevia*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34(11), pp. 34-35, **2000**.
30. Kim, S., Lee, J., Kim, H., Shin, C., Park, H., Lee, Y. Synthesis and HIV-1 Integrase Inhibitory Activities of Caffeoylglucosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, pp. 1879-1882, **2000**.
31. Kirk-Othmer. Encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, Inc, 4a. Edic. New York, vol. 6, pp. 793-795, **1983**.
32. Kopsch, R., y cols. Process for separating and producing chlorogenic acid. *United States Patente*: 4, 872,987, **1989**.
33. Kroon, P., Faulds, C., Brézillon, C., Williamson, G. Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. *Eur. J. Biochem.*, 248, pp. 245-251, **1997**.
34. Kurkin, V. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 39(2), pp. 123-152, **2003**.
35. Kweon, M., Hwang, H., Sung, H. Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo. (*Phyllostachys edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, 49(10), pp. 4646-4655, **2001**.

36. Ky, C., Noirot, M., Hamon, S. Comparison of five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea sp.*). *J. Agric. Food Chem.*, 45(3), pp. 786-787, **1997**.
37. Ky, C., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., Noirot, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75, pp. 227-228, **2001**.
38. Llorach, R., Espín, J., Tomás-Barberán, F., Ferreres, F. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a Potential Source of Health-Promoting Antioxidant Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 50(12), pp. 3460-3461, **2002**.
39. McCarty, M. Nutraceutical resources for diabetes prevention- an update. *Medical Hypotheses*, 64, pp. 151-158, **2005**.
40. Medrano, A. Obtención de antioxidantes de *Licania arborea* proveniente de la biosfera de Huautla, Morelos. Tesis de licenciatura (Químico de Alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 6, 39-43, **2002**.
41. Moguel, P. y Toledo, V. El café en México, ecología, cultura indígena y sustentabilidad. *Ciencias* No. 43, **1996**.
42. Mohamed, M., Mohamed, T., Mohamed, S., Fahmy, A. Distribution of lipases in the Gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, 73, pp. 227-234, **2000**.
43. Moon, J. y Terao, J. Antioxidant Activity of Caffeic Acid and Dihydrocaffeic Acid in Lard and Human Low-Density Lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.*, 46(12), pp. 5062-5065, **1998**.
44. Mori, H., Kawabata, K., Matsunaga, K., Ushida, J., Fujii, K., Hara, A., Tanaka, T., Murai, H. Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. *BioFactors*, 12, pp. 101-102, **2000**.
45. Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., Mitani, T. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 48(11), pp. 5512-5516, **2000**.
46. Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., Scaccini, C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79, pp. 119-124, **2002**.
47. Nishitani, E. y Sagesaka, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, pp. 675-685, **2004**.
48. Nuutila, A., Kammiovirta, K., Oksman-Caldentey, K. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, pp. 519-525, **2002**.
49. Onyeneho, S. y Heuiaraohchy, N. Antioxidant Activity, Fatty Acids and Phenolic Acids Compositions of Potato Peels. *J. Sci. Food Agric.*, 62, pp. 345-350, **1993**.
50. Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6, pp. 153-154, **2000**.
51. Pauli, G., Poetsch, F., Nahrstedt, A. Structure Assignment of Natural Quinic Acid Derivatives using Proton Nuclear Magnetic Resonance Techniques. *Phytochemical Analysis*, 9, pp. 177-185, **1998**.

52. Pchelkin, V. P. Medicinal plants. Natural phenolic and lipophilic complexes of chlorogenic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(1), pp. 25-27, **2003**.
53. Pedrosa M., Muzquiz, M., García-Vallejo, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Ayet, G., Robredo, L. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower sedes. *J. Sci. Food Agric.*, 80, pp. 459-464, **2000**.
54. Pontes, P., Moreira, R., Trugo, L., De María, C. The content of chlorogenic acids in tropical fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 82, pp. 1178-1179, **2002**.
55. Rajan, P., Vedernikova, I., Cos, P., Vanden, D., Augustyns, K., Haemers, A. Synthesis and Evaluation of Caffeic Acid Amides as Antioxidants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, 11, pp. 215-216, **2001**.
56. Ralet, M., Faults, C., Williamson, G., Thibault, J. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 263, pp. 257-269, **1994**.
57. Rice, C. y Packer, L. Flavonoids in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc. 2a. Edition, New York, pp. 1-32, **2001**.
58. Rodríguez de Sotillo, D., Hadley, M., Holm, E. Phenolics in Aqueous Potato Peel Extract: Extraction, Identification and degradation. *Journal of food Science.*, 59(3), pp. 649-651, **1994a**.
59. Rodríguez de Sotillo, D., Hadley, M., Holm, E. Potato Peel Waste: Stability and Antioxidant Activity of a Freeze-Dried Extract. *Journal of food Science.*, 59(5), pp. 1031-1033, **1994b**.
60. Rogers, W., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*Coffea arabica*) coffees. *Plant Science.*, 149, pp. 115-116, **1999**.
61. Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paulino, T., Bonina, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 199, pp. 39-40, **2000**.
62. Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., Osawa, T. Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *J. Agric. Food Chem.*, 46(2), pp.454-457, **1998**.
63. Sefkow, M. First Efficient Synthesis of Chlorogenic Acid. *Eur. J. Org. Chem.*, pp. 1137-1141, **2001**.
64. Serrano, R. Introducción a las aplicaciones de las enzimas. Alambra, 1ª. Edición, España, pp. 1-5, **1985**.
65. Silva, F., Borges, F., Ferreira, M. Effect of Phenolic Propyl Esters on the Oxidative Stability of Refined Sunflower Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 49(8), pp. 3936-3941, **2001**.
66. Sivetz, Ch. Coffee technology. Avi publishing company, Inc. Oregon, pp. 56-79, **1963**.
67. Sosa, M. Evaluación de la actividad antioxidante de compuestos aislados de plantas mexicanas y su aplicación para la conservación de cacahuete tostado. Tesis de licenciatura (Químico de Alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 20,21,37, **2003**.
68. Staubmann, R., Ncube, I., Gubitza, G., Steiner, W., Read, J. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology*, 75, pp. 117-126, **1999**.

-
69. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th edition. Editorial staff. Publisher by Merck research laboratorios division of Merck Fco., Inc. New Jersey. pp. 274, 298,1443. **2001**.
 70. Tolonen, A., Joutsamo, T., Mattila, S., Kamarainen, T., Jalonen, J. Identification of Isomeric Dicafeoylquinic Acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR Methods. *Phytochem, Anal.*, 13, pp. 316-328, **2002**.
 71. Tucker, G. Enzymes in Food Processing, Blackie Glasgow and London and Son Ltd, USA, pp. 22-33, **1991**
 72. Ulloa, J., Verreth, J., Van Weerdet, J., Huisman, E. Effect of different chemical treatments on nutritmental and antinutritional properties of coffe pulp. *Animal Feed Science and Technology*, 10785, pp. 1-10, **2002**.
 73. www.oic.com (página principal)
 - a) www.ico.org/ed/crisisc.pdf International Coffee Organization. Global Coffee Crisis: A threat to sustainable development. Osorio, N. September, **2002**.
 74. www.incae.com(página principal)
 - a) www.incae.ac.cr/ES/clacds/investigacion/pdf/cen550.pdf. González, A. Diagnóstico de la competitividad de la Industria del café en Costa Rica. CEN 550, septiembre, **1998**.
 75. www.infoagro.com/herbaceos/industriales/cafe2.asp. Cultivo del café (apartados 2.2.2 al 3) Infoagro.com **2002**.