



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
ESPECIE *COFFEA ARABICA* VARIEDADES BOURBON, GEISHA Y
MARSELLA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ LÓPEZ



CDMX

AÑO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Reyes Salas Eugenio Octavio**

VOCAL: **Profesor: Cañizares Macías María del Pilar**

SECRETARIO: **Profesor: Miranda Martínez Inés**

1er. SUPLENTE: **Profesor: García Saturnino Verónica**

2º SUPLENTE: **Profesor: Enríquez Villeda Manuel Esteban**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 228 “MÉTODOS DE FLUJO CONTINUO”, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

SUSTENTANTE:

María Guadalupe Martínez López

INDÍCE GENERAL

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS-HIPOTESIS.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
1. El café	5
1.1 Historia y definición.....	5
1.2 Clasificación y características.....	5
1.3 Producción.....	7
1.3.1 Cultivo y cinturón del café	7
1.3.2 Producción nacional e internacional.....	7
1.4 Proceso y composición del café	9
1.4.1 Beneficiado del café: Natural, lavado y honey	10
1.4.2 Café verde	12
1.4.3 Café tostado	13
2. Capacidad antioxidante.....	15
2.1 Antioxidantes, estrés oxidativo y radicales libres.....	15
2.2 Polifenoles: estructura, propiedades y análisis	17
2.3 Ácido clorogénico: estructura, propiedades y análisis.....	20
2.4 Métodos para determinar la capacidad antioxidante	21
2.4.1 Ensayo FRAP.....	22
3. Métodos de flujo continuo	23
3.1 FIA (Análisis por inyección en flujo)	25
3.2 SIA (Análisis por inyección secuencial)	27
METODOLOGIA.....	30
Instrumentación y equipo.....	30
Reactivos	30
Preparación de disoluciones	31
Muestras.....	33
Estrategia experimental	33
Preparación de muestras.....	34
Tratamiento.....	34

Extracción.....	34
Determinación de polifenoles totales.....	35
Determinación de la capacidad antioxidante	36
Determinación de ácido clorogénico	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Curva de calibración para polifenoles.....	39
Polifenoles totales en muestras	42
Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante	43
Capacidad antioxidante de muestras	44
Determinación de ácido clorogénico por HPLC-DAD.....	45
Curva de calibración de ácido clorogénico.	45
Contenido de ácido clorogénico en las muestras de café	47
Análisis de los resultados	48
Efecto de la variedad de café en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de las muestras.	49
Efecto del tipo de beneficiado de la cereza del café en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de las muestras.	52
Efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de las muestras	59
CONCLUSIONES.....	68
Bibliografía	69

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del fruto de café (Galanakis, 2017)	6
Figura 2. Cinturón del café	7
Figura 3. Producción mundial de café, elaborado con datos de la ICO.....	8
Figura 4. Estados productores de café en México, elaborado con datos de: Café mexicano. <i>Planeación agrícola nacional 2017-2030</i> (SAGARPA, 2017).....	9
Figura 5. Estructura química general de algunos polifenoles (Ross Watson, 2014)	18
Figura 6. Estructura química de los ácidos clorogénicos. A la izquierda ácido quínico. A la derecha, R:H ácido cumárico; R: OH ácido cafeico; R: OCH ₃ ácido ferúlico.....	20
Figura 7. Esquema de la reacción del ensayo FRAP (Santos & Silva, 2020).....	23
Figura 8. Señal analítica característica de los sistemas de análisis en flujo (Cañizares Macías, 2002)	25
Figura 9. La dispersión en FIA: A (Inyección de la muestra); B (Reacción de la muestra con los reactivos); C (El producto fluye al detector) (Ruzicka, FLOW INJECTION ANALYSIS, 2019).....	26
Figura 10. Mezclado por dispersión en SIA: A (Inyección de la muestra); B (Inyección de reactivo); C (Dispersión axial);D(Inversión del flujo);E (La mezcla de reacción fluye hacia el detector).....	29
Figura 11. Diagrama de estrategia experimental.....	34
Figura 12. Configuración Folin Ciocalteu-FIA para la determinación de polifenoles.	35
Figura 13. Configuración FRAP-SIA para determinación de capacidad antioxidante.	36
Figura 14. Diagrama para estándar de ácido gálico (ppm)	39
Figura 15. Curva de calibración del estándar de ácido gálico	40
Figura 16. Diagrama del estándar de ácido clorogénico (ppm)	41
Figura 17. Curva de calibración para el estándar de ácido clorogénico	41
Figura 18. Diagrama FRAP con estándar Trolox.....	43
Figura 19. Curva de calibración estándar de Trolox.....	44
Figura 20. Cromatograma de la curva de calibración con estándar de ácido clorogénico.....	46
Figura 21. Curva de calibración para determinación de ácido clorogénico por HPLC-DAD.....	46
Figura 22. Ejemplo de cromatograma de café Marsellesa. En azul resalta el pico cromatográfico correspondiente al ácido clorogénico.....	47

Figura 23. Contenido de polifenoles (PT), ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en variedades de café marsellesa, bourbon y geisha; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.	49
Figura 24. Efecto del beneficiado en el contenido de polifenoles (PT), ácido clorogénico(ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café bourbon; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.	53
Figura 25. Efecto del beneficiado en el contenido de polifenoles (PT) totales, ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café geisha. Usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.	56
Figura 26. Efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles (PT) totales, ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café bourbon honey; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.	60
Figura 27.Efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles totales (PT), ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café bourbon lavado; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.	63

INDÍCE DE TABLAS

Tabla 1. Composición aproximada de <i>Coffea arabica</i> verde % en base seca (Belitz, 2009)	13
Tabla 2. Composición aproximada de <i>Coffea arabica</i> tostado % en base seca (Belitz, 2009)	15
Tabla 3. Ensayos comúnmente usados para determinar capacidad antioxidante usando espectrofotómetro.....	22
Tabla 4. Muestras de <i>Coffea arabica</i> a analizar	33
Tabla 5. Secuencia de aspirado para determinación de capacidad antioxidante. .	37
Tabla 6. Gradiente de elusión para análisis cromatográfico de ácido clorogénico.	38
Tabla 7. Parámetros estadísticos de la curva de calibración de ácido gálico.....	40
Tabla 8. Parámetros estadísticos de la curva de calibración del ácido clorogénico	42
Tabla 9. Contenido de polifenoles totales en muestras de café, determinado por Folin Ciocalteu.....	42
Tabla 10. Parámetros estadísticos de la curva de calibración con estándar Trolox	44
Tabla 11. Capacidad antioxidante en muestras de café, determinada por FRAP .	45
Tabla 12. Parámetros estadísticos de la curva de calibración de ácido clorogénico.	47
Tabla 13. Contenido de ácido clorogénico en muestras de café, determinado por HPLC.....	48

Tabla 14. Análisis de varianza del efecto de la variedad de café en el contenido de polifenoles totales.....	50
Tabla 15. Análisis de varianza del efecto de la variedad de café en la capacidad antioxidante.....	50
Tabla 16. Análisis de varianza del efecto de la variedad de café en el contenido de ácido clorogénico.	50
Tabla 17. Resultado de la prueba de Bonferroni para el efecto de la variedad del café en los parámetros evaluados. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.....	51
Tabla 18. Efecto del tipo de beneficiado en el contenido de polifenoles totales en la variedad Bourbon.....	53
Tabla 19. Efecto del tipo de beneficiado en la capacidad antioxidante para la variedad Bourbon.....	54
Tabla 20. Efecto del tipo de beneficiado en el contenido de ácido clorogénico para la variedad Bourbon.....	54
Tabla 21. Resultados de la prueba de Bonferroni para el efecto del beneficiado en la variedad Bourbon. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.....	55
Tabla 22. Análisis de varianza del efecto del beneficiado en el contenido de polifenoles totales en la variedad Geisha.....	57
Tabla 23. Análisis de varianza del efecto del beneficiado en la capacidad antioxidante en la variedad Geisha.....	57
Tabla 24. Análisis de varianza del efecto del beneficiado en el contenido de ácido clorogénico en la variedad Geisha.....	57
Tabla 25. Resultados de las pruebas de Bonferroni para evaluar el efecto del beneficiado en la variedad Geisha. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.....	58
Tabla 26. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de polifenoles totales en Bourbon Honey.....	61
Tabla 27. Análisis de varianza del efecto del tostado en la capacidad antioxidante en Bourbon Honey.....	61
Tabla 28. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de ácido clorogénico en Bourbon Honey.....	61
Tabla 29. Resultados de las pruebas de Bonferroni del efecto del tostado en Bourbon Honey. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.....	62
Tabla 30. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de polifenoles totales en bourbon Lavado.....	63

Tabla 31. Análisis de varianza del efecto del tostado en la capacidad antioxidante en Bourbon lavado	64
Tabla 32. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de ácido clorogénico en Bourbon lavado	64
Tabla 33. Resultados de las pruebas de Bonferroni del efecto del tostado en Bourbon lavado Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.....	65
Tabla 34. Resumen de resultados, los tipos de café se presentan de un mayor a menor contenido en polifenoles totales, ácido clorogénico y capacidad antioxidante, y se especifica aquellos que no mostraron una diferencia estadísticamente significativa.....	67

ABREVIATURAS

ABTS 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ACG Ácido clorogénico

AG Ácido gálico

ANOVA Análisis de varianza

CA capacidad antioxidante

DAD detector de arreglo de diodos

DI Diámetro interno

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

FIA Análisis por inyección en flujo

F_c Valor crítico para F

FCR Reactivo de Folin Ciocalteu

FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power: Capacidad de reducción del hierro

GL Grados de libertad

HPLC High performance liquid chromatography: Cromatografía de líquidos de alta resolución

ICO international coffee organization: Organización internacional del café.

NOM Norma Oficial Mexicana

ORAC Capacidad de atrapamiento de radicales oxígeno

PT polifenoles totales

RNS Especies reactivas de nitrógeno

SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SIA Análisis por inyección secuencial

TPTZ Tripiridiltriazina

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado la necesidad de incorporar a la dieta alimentos que además del aporte nutrimental, proporcionen compuestos que beneficien la salud (Smrke, E.W. et al, 2013). Dentro de estos los antioxidantes tienen una gran relevancia, pues son sustancias con la capacidad de retardar o inhibir la degradación oxidativa (capacidad antioxidante), y por lo tanto, pueden prevenir los efectos adversos que provoca en el cuerpo humano. Compuestos que han demostrado reducir dichos efectos y por tanto el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como diabetes (Kwak, et al, 2018), son los polifenoles que pueden ser ingeridos en la dieta de diversos alimentos como el café.

El café se ha convertido en la bebida no alcohólica más popular en el mundo. El placentero sabor y aroma, junto con los efectos benéficos en la salud, son algunas de las causas del incremento en su consumo. (Árvay, y otros, 2018). Además de la importancia debido a que su producción y comercio constituyen el pilar de la economía de la mayoría de los países en vías de desarrollo (Quintero Rizzuto & Rosales, 2014), por lo que es de especial valor en México por ser de los principales cultivos industriales y de exportación. (García, et al, 2016).

El contenido de polifenoles en el café ha pasado de ser una propiedad natural a una ventaja competitiva, por lo que su análisis es fundamental.

El contenido de polifenoles en especial el más abundante en café, el ácido clorogénico, es afectado por la variedad de café y el tratamiento por el que pasó la cereza (Macrae, 1989).

El proceso del café consta de cuatro etapas básicas: cultivo, cosecha, beneficiado y tostado. Cada una de las cuales impacta en las características finales en la taza de café.

El beneficiado se puede realizar por tres métodos: natural, lavado y honey; en todos hay una fermentación implícita con la microbiota propia del café. En el primero la cereza se seca al sol y posteriormente se despulpa, en el segundo la

cereza se despulpa y se deja fermentar en agua, se lava y se seca; en el honey la cereza es despulpada, y dejada en fermentación seca sin retirar la capa de mucílago y finalmente se seca.

En este trabajo se determinaron el contenido total de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante a variedades de café arábica, Marsellesa, Bourbon y Geisha, que pasaron por un proceso de beneficiado diferente (natural, lavado y honey) y en un grado de tostado diferente. Se usaron métodos de flujo continuo, que poseen la ventaja de ser rápidos, de menor costo y compatibles con una gran variedad de detectores. (Cañizares, 2002). Específicamente análisis por inyección en flujo y análisis por inyección secuencial para determinar polifenoles totales por Folin- Ciocalteu y capacidad antioxidante por FRAP respectivamente; además de HPLC para la determinación de ácido clorogénico.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto que tienen la variedad de café, el tipo de beneficiado de la cereza y el grado de tostado en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante en el café.

OBJETIVOS-HIPOTESIS

Objetivo general:

Determinar el efecto de la variedad de café, el tipo beneficiado de la cereza y el grado de tostado en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante.

Objetivos particulares:

- Determinar el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante en variedades de café arábica, Marsellesa, Bourbon y Geisha.
- Conocer la variedad de café que aporta un mayor efecto antioxidante.
- Determinar el tipo de beneficiado que nos permite conservar más antioxidantes.
- Evaluar el efecto del grado de tostado en los antioxidantes
- Evaluar la relación entre el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y la capacidad antioxidante.

Hipótesis:

El contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante tendrán una relación directamente proporcional, es decir, al aumentar el contenido de polifenoles y ácido clorogénico, también aumentará la capacidad antioxidante; y van a variar de la siguiente forma, de acuerdo con el proceso de la cereza: natural<lavado<honey; y de acuerdo al grado de tostado disminuirán al aumentar el grado de tostado.

MARCO TEÓRICO

1. El café

1.1 Historia y definición

Según SAGARPA se denomina café o cafeto, a un género de arboles de la familia de las Rubiaceas, a las semillas y la bebida que se prepara con ellas.

En particular café se refiere a las semillas de las cerezas del árbol de café, del género Coffea, a las que se les ha removido completamente el pericarpio y ocasionalmente la piel plateada, las semillas pueden ser verdes o tostadas, enteras o molidas. (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

El árbol del café es nativo de Etiopía, y a través del tráfico de esclavos fue introducido a Yemen (provincia de Arabia), donde se empezó a cultivar en el siglo XV; la llegada del café a Asia y Europa se vio retrasada por el monopolio que ejercía Arabia sobre el café y sus estrictas políticas de no exportar granos fértiles.

En 1615 llegaron los primeros granos de café a Europa. En 1683 se abrió en Venecia el famoso “Caffé Florian” de la plaza de San Marcos; en 1699 el cultivo se extendió a India y lo que ahora es Indonesia, convirtiéndose en la principal fuente de suministro de Europa.

Finalmente se extendió a América, llegando primero a las colonias en Norteamérica; sin embargo, fueron los holandeses los que propagaron su cultivo por centro y sur América, donde actualmente se encuentran los principales cultivos de importancia comercial en el continente. (ICO, 2022)

1.2 Clasificación y características

Es un árbol de hojas perenes, que puede llegar a medir hasta 9 metros, tiene hojas ovaladas, lustrosas y verdes oscuras, que se mantienen de 3 a 4 años. Las flores son blancas y fragantes, y permanecen abiertas durante pocos días, después de seis meses aproximadamente se desarrolla un fruto verde, que se torna rojo con el tiempo.

Son arboles que pertenecen a la familia de las Rubiaceas, existen más de 500 géneros y 800 especies. De las cuales destacan *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (comúnmente conocida como robusta por ser la menos exigente a las condiciones de cultivo), abarcando más del 90% de la producción mundial entre ambas. (Astiasarán & Martínez, 2003).

La especie arábica es la más producida y existen diversas variedades que se cultivan alrededor del mundo y que ofrecen un perfil sensorial único.

Los frutos que crecen en el cafeto son drupas de 1.5 cm de diámetro con dos semillas cada una, conocidas como cereza del café.

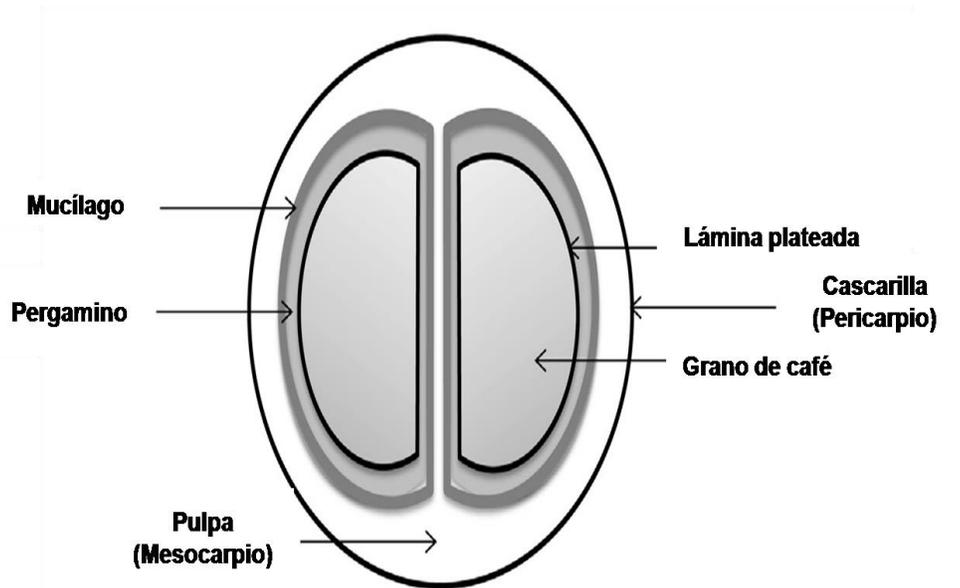


Figura 1. Estructura del fruto de café (Galanakis, 2017)

La capa más externa es el pericarpio comúnmente conocido como cascarilla es color verde cuando están inmaduras pero al madurar se tornan a coloraciones que van del rojo al violeta, dependiendo de la especie de café; recubre al mesocarpio una capa rica en azúcares importantes por ser los sustratos que se requieren en la fermentación de la cereza. La capa más interna es el grano de café y está recubierta por dos capas, la lámina plateada y el pergamino.

1.3 Producción

1.3.1 Cultivo y cinturón del café

El desarrollo del cafeto se ve favorecido en una zona denominada “el cinturón de café” (en la figura 2 podemos apreciar esta zona), comprendida entre los trópicos de cáncer y capricornio, donde se reúnen las condiciones adecuadas para su cultivo, es una zona con clima cálido, pero con alto nivel de humedad, a una altitud de 1000 a 1300 msnm y temperaturas entre 13 a 26°C. .

Las especies más cultivadas son *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, siendo la especie arábica la más cultivada ocupando 75% de la producción mundial.

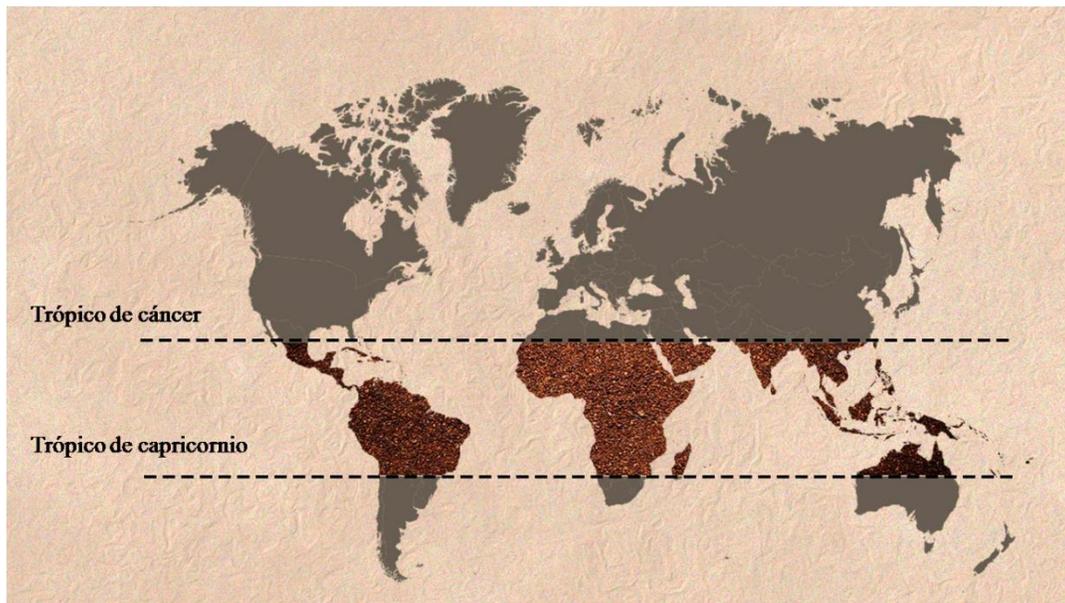


Figura 2. Cinturón del café

1.3.2 Producción nacional e internacional

Es imposible exagerar la importancia del café en la economía mundial. El café es uno de los productos primarios más valiosos, el segundo más valioso a nivel mundial de especial importancia para los países en desarrollo, donde es crucial para la economía y política; y cuyas exportaciones son parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80%.

En el mercado internacional se distinguen cuatro categorías de café de acuerdo con el tipo de grano. En orden descendente con respecto a la calidad y el precio:

- Suaves colombianos, granos de arábica lavados, producidos principalmente en Colombia;
- Otros suaves, granos de arábica, cuyos principales productores son México y Centroamérica.
- Brasileños naturales, granos de arábica sin lavar, provenientes de Brasil y otros países sudamericanos.
- Robustas, producidos en África, Asia y algunos países sudamericanos

Una gran parte de la producción mundial proviene de centro América y Suramérica.

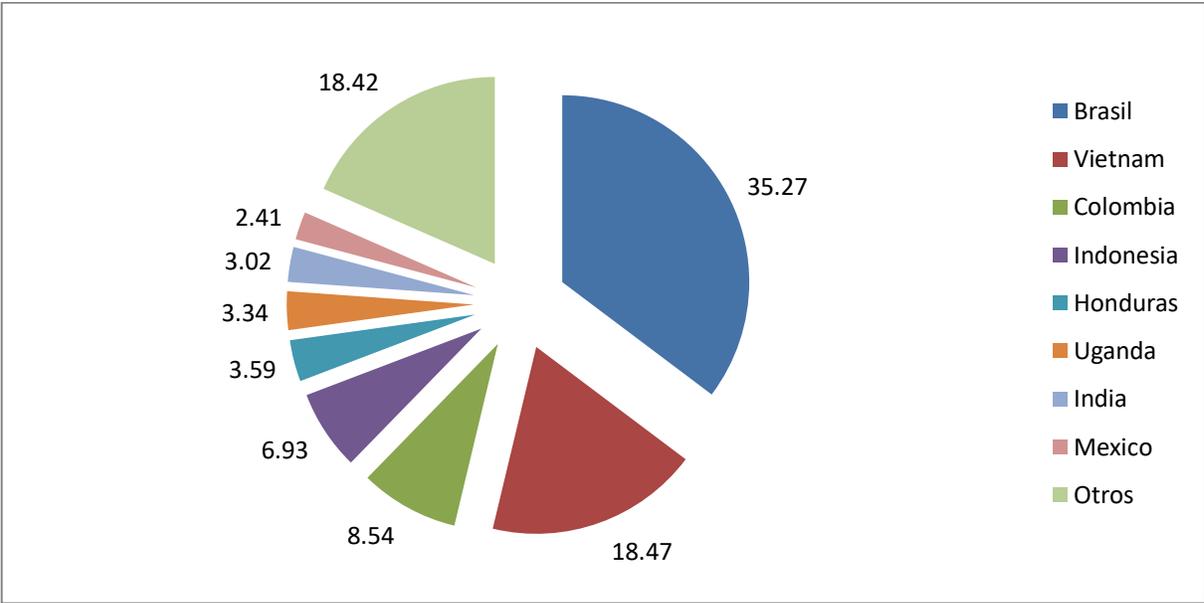


Figura 3. Producción mundial de café, elaborado con datos de la ICO

México es de los principales productores a nivel mundial de café, este sector de la agricultura provee de empleo a 500 mil productores de 15 entidades federativas y 480 municipios; la caficultura se considera como una actividad estratégica fundamental, debido a que permite la integración de cadenas productivas, la

generación de divisas y empleos, el modo de subsistencia de muchos pequeños productores y alrededor de 30 grupos indígenas y, en forma reciente, de enorme relevancia ecológica, pues provee servicios ambientales a la sociedad ya que del 90% de la superficie cultivada con café se encuentra bajo sombra diversificada, que contribuye a conservar biodiversidad (CEDRSSA, 2018).

México es uno de los principales productores de café “orgánico”, en particular este tipo de cultivos ha cobrado relevancia debido a que se convirtió en una alternativa por la caída de los precios en el mercado internacional, y con este café orgánico se puede seguir aprovechando el café como eje del desarrollo comunitario y regional

A nivel nacional los mayores productores son los Estados al sur del país.

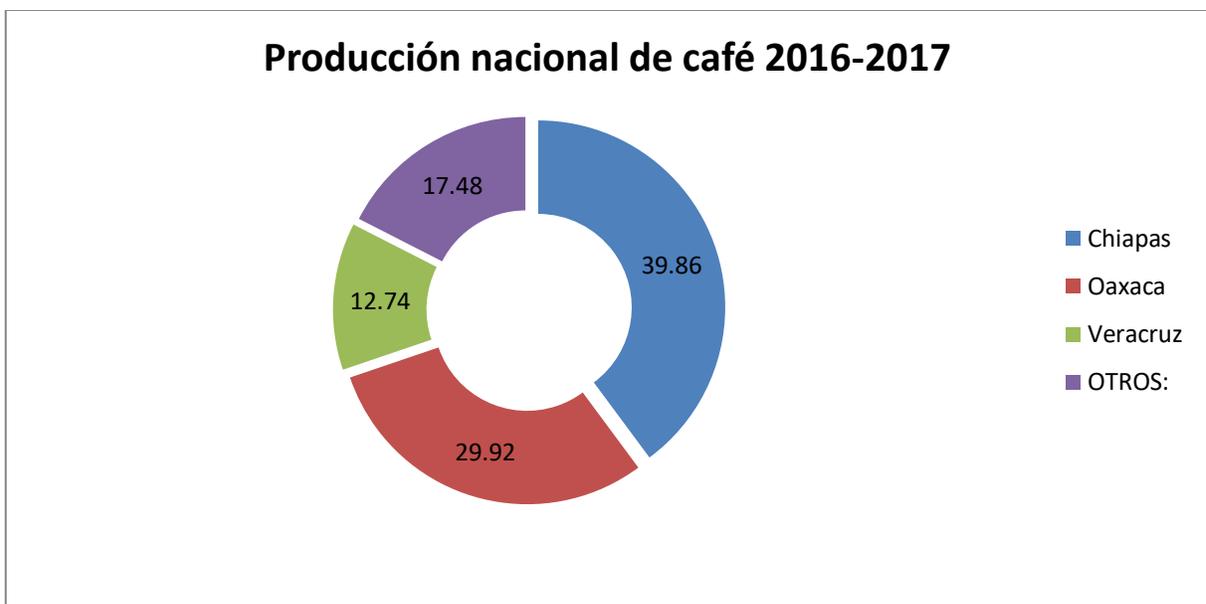


Figura 4. Estados productores de café en México, elaborado con datos de: *Café mexicano. Planeación agrícola nacional 2017-2030 (SAGARPA, 2017)*

1.4 Proceso y composición del café

Una vez la cereza del café ha madurado, se recolecta y pasa por un proceso llamado beneficiado, para transformarla en café verde, este proceso puede tener tres variantes todas con una fermentación implícita, típicamente están el método

natural o seco y el lavado o húmedo, y existe un tercer método denominado método honey. Posterior a tener el café verde, éste se selecciona y se clasifica de acuerdo con las características de calidad que se exigen en las Normas Oficiales Mexicanas y se lleva a torres donde es tostado, con diferentes condiciones según cada productor.

1.4.1 Beneficiado del café: Natural, lavado y honey

El método natural se realiza en lugares donde el clima es consistentemente cálido y seco, y donde la disponibilidad de agua no es suficiente para realizar el método húmedo, y es comúnmente usado para el café robusta. Este método es más directo y relativamente más barato. La cereza del café se puede quedar en el árbol por más tiempo y la selección individual no es necesaria, pues se pueden arrancar por ramas, y las hojas y otros materiales indeseables pueden ser removidos después en los pisos de secado, donde las cerezas son expuestas al sol en capas que no exceden los 5 cm; por la noche o cuando el clima es húmedo las cerezas son agrupadas en montones y se cubren. En un periodo aproximado de 3 semanas se ha alcanzado la humedad necesaria (aproximadamente 12%) se retiran las capas secas y se deja el grano desnudo.

El método lavado es más común para el café arábica: para este se requiere que la mayoría de las cerezas se encuentren sobremaduras.

Se hace un lavado preliminar en el que se hace una separación de las cerezas con menor calidad por flotación y hundimiento; las cerezas pasan a la máquina donde se separa la cascara y la pulpa.

A continuación toma lugar la fermentación en tanques de concreto; la capa de mucilago se rompe por acción enzimática, y después de esto se puede lavar el grano, normalmente ocurre una fermentación natural con enzimas propias que están presentes en la capa de mucilago y con ayuda de otras que provienen de levaduras y bacterias que se desarrollaron al mismo tiempo. Este proceso dura alrededor de 72 horas, pero puede ser acelerado adicionando pectinasas. Cuando

la fermentación esta completa se realiza un lavado más, con agua limpia antes de ser secado.

Después de remover la capa restante de mucilago los granos tienen una humedad de cerca del 50% y pasan a una etapa de secado ya sea al sol o en una máquina, sí se hace en patios de secado la capa va de 2 a 10 cm dependiendo de las condiciones climáticas y también se debe girar o remover constantemente y cuidar de la lluvia y de brisa nocturna hasta que se llegue a una humedad de cerca del 12%; si se tiene la posibilidad hay que hacer torres de secado pues de esta manera no se depende del clima, además de que es más eficiente y requiere menos espacio que el secado al sol. Con frecuencia las técnicas se combinan para economizar, se usa primero el secado al sol hasta remover una tercera parte del agua en exceso y luego pasa a los secadores. Los sistemas de secado funcionan comúnmente con aire caliente y están en movimiento constantemente, cualquiera que sea el método es importante controlar el tiempo y la temperatura de secado para generar el menor daño posible a los granos. Después de este procedimiento obtenemos lo que se conoce como café pergamino. (Macrae, 1989)

El método honey requiere la clasificación de las cerezas maduras, que posteriormente se llevan a la despulpadora donde es de vital importancia dejar la mayor capa de mucilago posible y se pasa directamente al secado, debido a esto el café queda recubierto con una capa pegajosa que asemeja a la miel, de ahí su nombre. A diferencia de los otros métodos en este se puede elegir el tiempo de secado del grano de acuerdo al tipo de sub variante que se quiera obtener, white, yellow, red y black, siendo el tiempo menor para white y mayor para black. (Carnoma, 2020).

Después del beneficiado los granos pasan a cribas donde son clasificados por tamaños e imperfecciones, en este punto ya tenemos lo que se conoce como “café verde” y los granos están listos para su industrialización.

1.4.2 Café verde

Las **NOM-169-SCFI-2007** y **NOM-149-SCFI-2001** definen café verde como:

Materia prima constituida por las semillas o almendras de los frutos maduros del cafeto de la especie *Coffea arabica* a los que se les ha quitado las capas que lo cubren con el fin de estar listos para su industrialización.

El café verde no posee características organolépticas que resulten agradables, si no que estas se adquieren durante el tostado.

Se obtiene a partir del procesamiento de las bayas maduras del árbol de café, retirando las capas externas, el grano en algunos casos conserva la piel plateada y el pergamino y para el caso del café honey aún conserva parte de la pulpa.

La composición química del café verde depende de la especie y variedad en cuestión, también y no menos importante de las prácticas de agricultura, el grado de maduración y las condiciones de almacenamiento. El café verde se debe de almacenar a una humedad relativa no mayor a 80% y temperaturas entre 30 y 50°C, para evitar la degradación de los compuestos, en especial de los ácidos clorogénicos que contribuyen a la capacidad antioxidante de los granos de café.

Dentro de los compuestos importantes en el café verde, desde el punto de vista del proceso, tenemos a la trigonelina, proteínas y aminoácidos, oligosacáridos y polisacáridos. (Tabla 1)

Tabla 1. Composición aproximada de *Coffea arabica* verde % en base seca (Belitz, 2009)

Carbohidratos solubles	9-12.5
Monosacáridos	0.2-0.5
Oligosacáridos	6.9-9.0
Polisacáridos	3-4
Polisacáridos insolubles	46-53
Hemicelulosa	5-10
Celulosa	41-43
Ácidos y fenoles	
Ácidos volátiles	0.1
Ácidos alifáticos no volátiles	2-2.9
Ácidos clorogénicos(ACG)	6.7-9.2
Lípidos	15-18
Cera	0.2-0.3
Aceite	7.7-17.7
Compuestos nitrogenados	11-15
Aminoácidos	0.2-0.8
Proteínas	8.5-12
Cafeína	0.8-1.4
Trigonelina	0.6-1.2
Minerales	3-5.4

1.4.3 Café tostado

Se entiende por café tostado aquel que ha sido obtenido de la torrefacción de café verde.

El tostado es un proceso que consiste en la aplicación de calor a los granos verdes que deben estar en constante movimiento para asegurar un tostado uniforme, hasta que se tengan las características deseadas, llegado el momento

se enfría rápidamente con una corriente de aire, con o sin ayuda de rociadores de agua.

El tostado de los granos es una relación tiempo-temperatura que se realiza en distintos grados, y esto no solo afecta al color si no que también impacta en la composición, y en las características organolépticas de la bebida, sabor, cuerpo, olor, etc.

El tostado es un proceso complejo en el que podemos distinguir cuatro etapas: deshidratación, desarrollo, descomposición y tostado final. Los primeros cambios ocurren a 50°C, cuando las proteínas se desnaturalizan y el agua se evapora, después se empieza a desarrollar el color a 100°C, ocurre la pirolisis de compuestos orgánicos acompañada por la hinchazón de los granos. La fase de descomposición que ocurre entre 180-200°C es reconocible por que los granos estallan liberando un humo azulado, esto está relacionado con el aroma del café. Finalmente bajo condiciones óptimas para la caramelización, se alcanza el tostado máximo donde la humedad del grano final está entre 1.5-3.5%.

El tostado está caracterizado por la desaparición de los compuestos del grano de café verde debido a una serie de reacciones, donde se forman los compuestos que le dan al café su olor, color y aroma característicos.

Las principales reacciones, son las reacciones de Maillard donde la mayoría de los carbohidratos y compuestos nitrogenados reaccionan, las proteínas y aminoácidos (triptófano, treonina, glicina, tirosina, serina, alanina, lisina y arginina los de mayor relevancia) son importantes precursores del aroma del café tostado, los carbohidratos contribuyen en gran medida a la formación de compuestos de aroma, sabor y color.

La trigonelina contribuye en gran medida a la formación de compuestos durante el tostado que se ven reflejados en el aroma y sabor de la bebida.

El resto de los componentes del grano verde como los ácidos clorogénicos (ACG) se ven disminuidos por varias rutas como la migración de grupos acilo, hidrólisis,

oxidación, fragmentación, polimerización y asociación con proteínas desnaturalizadas o degradadas. (Tabla 2)

Tabla 2. Composición aproximada de *Coffea arabica* tostado % en base seca (Belitz, 2009)

Cafeína	1.3
Lípidos	17
Carbohidratos	10
Trigonelina	38
Ácidos alifáticos	1
ACG	2.4
Compuestos volátiles	2.7
Minerales	4.5
Melanoidinas	23

2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total se define como el potencial de una sustancia o compuesto para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato hasta en cantidades muy pequeñas (<1%, comúnmente 1-1000 mg/L) (Benítez-Estrada, et al, 2020). La capacidad antioxidante de los alimentos está directamente relacionado con la presencia de compuestos bioactivos en la matriz alimentaria Su medición es útil para valorar la calidad de un alimento en cuanto a la cantidad de antioxidantes como sistema, o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el mismo.

2.1 Antioxidantes, estrés oxidativo y radicales libres

Los radicales son sustancias químicas que contienen electrones libres o impares en el orbital más externo, lo que les da una gran reactividad, su agresividad y actividad destructora ocurren en fracciones de milésimas de segundos; se producen de manera natural a nivel celular, sin embargo, se pueden aumentar en algunas condiciones, se producen principalmente en la mitocondria. Durante la respiración celular, ocurre una reducción del oxígeno molecular, en este proceso se producen sustancias toxicas intermedias a bajas concentraciones como: Radicales del Ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) generado principalmente por la actividad de

oxidasas intracelulares, y radicales hidroxilos(OH·). Estas especies también pueden ser generadas por reacciones intracelulares mediadas por metales de transición como el Hierro (Fe) y el Cobre (Cu) que poseen la capacidad de ser donadores o aceptores de electrones, generando una actividad sinérgica entre el hierro y este radical libre, provocando lesiones a nivel oxidativo, originando respuestas fisiológicas o una inducción de una respuesta estresante, llevando a la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), reacciones inmunes o la muerte celular

Existen una gran variedad radicales libres producidos por el metabolismo del organismo por medio de diversas rutas de síntesis como: Triclorometil (CCl3), radical superóxido (O₂-), Hidroxilo (OH·), Peroxilo (ROO·), Óxido nítrico (NO), ácido Hipocloroso (HOCl), entre otros. Todas las especies reactivas de oxígeno participan en cadenas reactivas de radicales libres. (Zapata, 2014)

Se conocen también fuentes exógenas que provocan la formación de radicales libres de diferente origen, tanto medioambientales, farmacológicas y nutricionales como contaminantes y aditivos.

El estrés oxidativo se puede definir como una perturbación en el equilibrio de las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras generando cambios en biomoléculas por los radicales formados y las modificaciones funcionales. Químicamente es una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares, lo que está asociado a múltiples enfermedades como las cardiovasculares, infecciosas, el cáncer, la diabetes mellitus y los trastornos neurodegenerativos, como el Alzheimer. Entre los numerosos hallazgos realizados se destaca el papel del oxígeno, una molécula imprescindible para la vida, pero dada su alta reactividad, lo que se cree positivo para los organismos vivos, también es un elemento tóxico (Viada Pupo, 2017). Con el objetivo de contrarrestar tal circunstancia, la naturaleza ha desarrollado sistemas de control, los sistemas antioxidantes, que neutralizan los cambios producidos por el oxígeno y otras sustancias a escala celular.

La contraparte de los radicales libres son los antioxidantes, sustancias de origen natural o sintético con la capacidad de captar radicales libres y retardar o inhibir la oxidación de los sustratos susceptibles a estos, y por lo tanto, pueden prevenir los efectos adversos que las especies reactivas causan en las funciones fisiológicas normales del cuerpo humano.

Existen diversos sistemas de defensa naturales en el organismo con capacidad antioxidante, tanto enzimático (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa), como no enzimáticos como la vitamina C, carotenos, flavonoides y la vitamina E, que pueden ser ingeridos en la dieta.

Los alimentos constituyen una importante fuente de antioxidantes, se pueden encontrar sintéticos y naturales. Sintéticos como el TBHQ, BHA, BHT; sustancias sinérgicas que mejoran la actividad antioxidante, secuestrando a los metales que actúan como catalizadores en reacciones de oxidación; y naturales: aquellos contenidos en los diversos tejidos de las plantas como los son los tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos (Belitz, 2009).

Los antioxidantes que se encuentran en los alimentos son una categoría heterogénea de moléculas y su efectividad depende de sus características químicas y ubicación física dentro del alimento. La importancia de los antioxidantes radica en su desempeño en las vías metabólicas ya que protegen a las células de sufrir oxidaciones y formar especies reactivas que pueden interaccionar con procesos bioquímicos.

2.2 Polifenoles: estructura, propiedades y análisis

Químicamente los polifenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados que se pueden encontrar glucosilados o como ésteres. Son sustancias que se encuentran distribuidas en los diversos tejidos de las plantas y poseen capacidad antioxidante que varía con el número y posición de los grupos hidroxilo y del pH, a

valores menores de 4(acido), su actividad se ve disminuida y a valores mayores a 8(alcalinos) tienen mayor actividad (Belitz, 2009).

“Existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los ácidos fenólicos tienen un solo anillo, mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico. Los compuestos fenólicos como los flavonoides y las antocianinas, reaccionan fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar, o entre sí para formar polímeros, como los taninos”. (Badui, 2013)(Figura 5)

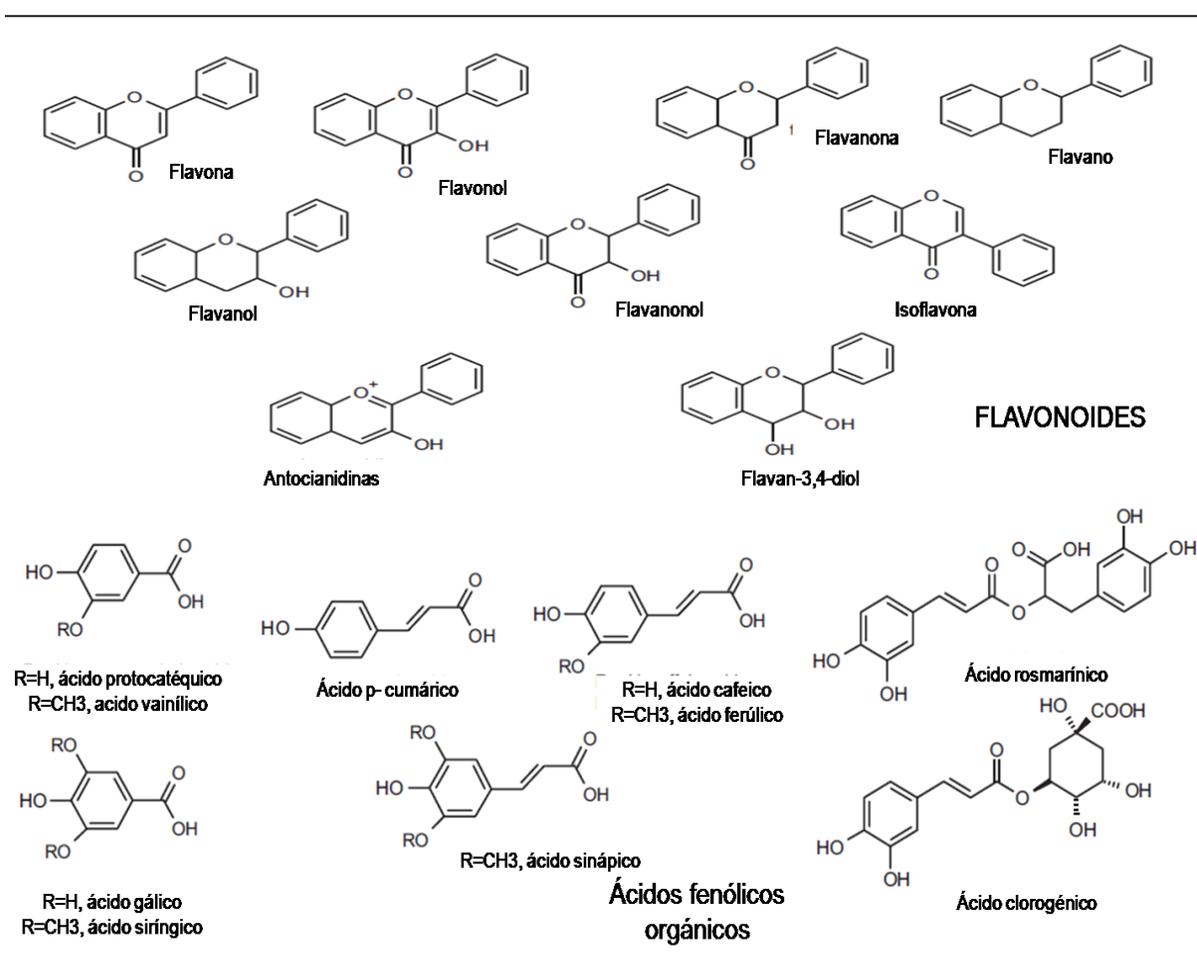


Figura 5. Estructura química general de algunos polifenoles (Ross Watson, 2014)

Los polifenoles son responsables de propiedades organolépticas (color, sabor, astringencia, dureza), y propiedades nutricionales y antioxidantes. La acción en la salud de las sustancias antioxidantes depende de su biodisponibilidad. Los polifenoles se encuentran en diversos alimentos, todos de origen vegetal, como el vino, té verde, café, jugos de granada y bayas, nueces y chocolate.

La gran diversidad de polifenoles en las matrices alimentarias, hace de su análisis algo complejo. El método más común para la determinación de polifenoles es el de Folin Ciocalteu. Este método involucra la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR: una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico) a un complejo colorido azul en una solución alcalina. Sin embargo, la cuantificación se puede ver afectada por otros componentes presentes en los extractos de los alimentos que se pueden comportar como agentes reductores y contribuir a la absorbancia. Con este método no es posible la identificación individual de los compuestos fenólicos porque es poco específico; sin embargo para este propósito existen otros métodos como la cromatografía (en capa fina, HPLC, o de gases). (Ross Watson, 2014)

Para este tipo de análisis se puede acoplar a una gran variedad de sistemas de detección como: fotodiodos, electroquímicos, fluorescentes incluido espectrometría de masas.

Otros métodos de análisis para polifenoles, más específicos son:

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas: se mide la relación masa/carga de los iones producidos en la muestra. La muestra es inyectada en la columna del cromatógrafo y es transferida al espectrómetro de masas, los iones formados son separados de acuerdo al valor de la relación masa- carga.

-HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución)

-Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS)

-Resonancia Magnética Nuclear

-Cromatografía de líquidos acoplado a resonancia magnética nuclear (LC-RMN)

2.3 Ácido clorogénico: estructura, propiedades y análisis

Se entiende por ácido clorogénico (ACG) a un grupo de ésteres de ácido quínico, solubles en agua y en alcoholes de bajo peso molecular, pero insolubles en benceno y cloroformo.

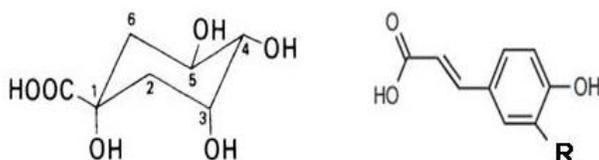


Figura 6. Estructura química de los ácidos clorogénicos. A la izquierda ácido quínico. A la derecha, R:H ácido cumárico; R: OH ácido cafeico; R: OCH3 ácido ferúlico.

El ácido quínico puede ser esterificado en las posiciones 3, 4 y 5. Los ésteres más comunes son con ácido cafeico, ferúlico y cumárico.

Los polifenoles incluidos los ácidos clorogénicos son productos secundarios de las plantas, en particular los granos de café tienen un contenido más elevado de ACG comparado con otras partes de la planta, y están relacionados con el crecimiento de las plantas. Como parte de una dieta contribuyen a retardar el estrés oxidativo.

Los ácidos clorogénicos se pueden analizar por técnicas espectrofotométricas, usando diversos reactivos para la obtención de complejos coloridos, pero tienen la desventaja de solo cuantificar el contenido total y en algunos casos se puede sobre o subestimar la concentración de alguno de los componentes. También se pueden usar métodos cromatográficos (cromatografía de gases o de líquidos) que suelen ser más específicos.

Para el análisis de ácido clorogénico es necesaria la reducción del tamaño de partícula para incrementar la superficie total para la extracción. Los granos de café verdes presentan un problema en particular por su dureza. Para minimizar el riesgo

de la formación de interferencias inducidas por el calor, ya sean químicas o enzimáticas, para ello es recomendable liofilizar o congelar en nitrógeno líquido, Con los granos tostados no es necesario este pre-tratamiento. En general para la extracción se recomienda un tamaño de partícula de 0.5 mm

2.4 Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Hay una variedad de ensayos para medir la capacidad antioxidante de los componentes de los alimentos, dos tipos de ensayos son los más usados para estudios de antioxidantes en alimentos.

El primero tipo de ensayos asociados a la oxidación de lípidos como lo son: TBA (ensayo de ácido tiobarbitúrico), MDA-HPLC (malonaldehído-cromatografía de líquidos de alta resolución), MDA-CG (ensayo de malonaldehído-cromatografía de gases)

El segundo tipo son ensayos asociados con la inhibición de electrones ó radicales: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico)), basados en la desaparición de un radical; FRAP (capacidad de reducción del ion hierro) y FOX(ensayo de oxidación ferrosa en naranja de xilenol), basado en la formación de complejos; FTC (ensayo del tiocianato férrico), ACA(aldehído/ácido carboxílico) (Bartosz, 2014), basado en la oxidación de aldehídos por especies reactivas de oxígeno.

Otro ensayo ampliamente usado en alimentos es ORAC, un ensayo fluorimétrico que tiene la virtud de medir la capacidad antioxidante tanto de los componentes lipofílicos como hidrofílicos y que se realiza en condiciones similares a las fisiológicas. La inactivación de los radicales se evidencia a través de la inhibición de la oxidación de la molécula de fluoresceína.

Tabla 3. Ensayos comúnmente usados para determinar capacidad antioxidante usando espectrofotómetro.

Ensayo Antioxidante	Producto que se monitorea	Absorbancia (nm)
DPPH	DPPH·	517
Decoloración de B-caroteno	B-caroteno radical	470
ABTS	ABTS·	734
FRAP	Fe 2+-TPTZ	593
FOX	Fe 3+-XOC	550
FTC	Fe(SCN)3	500

TPTZ=Tripiridiltriaina ferrosa; XOC= complejo naranja de xilenol

Es importante elegir el ensayo adecuado para la muestra que estamos analizando, en general se recomienda usar tres ensayos diferentes para determinar la capacidad antioxidante de una muestra. (Ross Watson, 2014)

2.4.1 Ensayo FRAP

El ensayo FRAP posee algunas ventajas con respecto a los otros ensayos como lo son: ser sensible, simple y reproducible; a diferencia de ensayos como DPPH no requiere medios orgánicos, y el tiempo de análisis es menor con respecto a análisis como ABTS donde se requiere una incubación del radical por varias horas.

El método FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso. El método FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones. (Mercado, et al, 2013).

Evalúa el efecto combinado de las defensas antioxidantes no enzimáticas. Este método se desarrolla bajo condiciones ácidas (pH 3.6). En presencia de antioxidantes, la forma férrica del compuesto hierro-tripiridil-triazina (Fe³⁺-TPTZ) se reduce a la forma ferrosa (Fe²⁺-TPTZ). El compuesto Fe²⁺-TPTZ produce una coloración azul intensa que tiene una absorción máxima de 593 nm. La capacidad antioxidante de la muestra es cuantificada por comparación con una curva de

calibración con ácido ascórbico o Trolox y en unidades equivalentes al estándar. (Benítez-Estrada, et al, 2020)

El reactivo FRAP es una mezcla de TPTZ (2,4,6-tri(2piridil)-S-triazina) y FeCl_3 (cloruro férrico) en medio ácido.

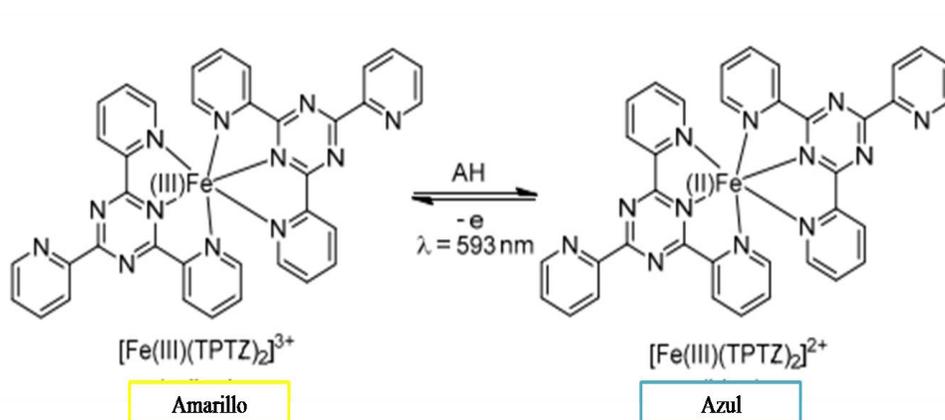


Figura 7. Esquema de la reacción del ensayo FRAP (Santos & Silva, 2020)

3. Métodos de flujo continuo

El uso de los métodos automáticos de análisis va unido a la necesidad de sustituir una operación o medida estática que se realiza manualmente por una operación y medida continua o secuencial. El concepto fue introducido Skeggs en 1957 al presentar el primer sistema de flujo continuo segmentado empleando burbujas de aire para dividir el flujo de la muestra en muchas porciones individuales (Cañizares Macías, 2002).

La importancia de estos métodos radica principalmente en la disminución de la manipulación del analista en el progreso de la reacción además no tienen tiempos elevados de análisis como las técnicas manuales, y son perfectamente válidas y sensibles

El concepto de análisis por inyección en flujo fue introducido en 1975 por Ruzicka y Hansen. Las técnicas de inyección en flujo, son un grupo de técnicas rápidas, automatizadas, miniaturizadas y de bajo costo para el análisis. Actualmente las técnicas de flujo caen dentro de cuatro categorías: Inyección en flujo (FI),

inyección secuencial (SI), inyección de perlas (BI) y cromatografía de inyección secuencial (SIC). Además existe una vertiente llamada Lab-On-Valve (LOV) este formato permite reducir la escala de SI y BI al intervalo de los microlitros a través de la integración y la miniaturización. (Ruzicka, FLOW INJECTION ANALYSIS, 2019)

El fundamento de las técnicas de flujo se puede discutir considerando solo fenómenos de transferencia de masa en tuberías circulares descritos por un modelos que consideran la relación entre la dispersión radial y axial, y aseguran la existencia de un flujo laminar, y por lo tanto una zona bien definida del bolo de muestra, que produce un gradiente de concentración a lo largo del bolo.

Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión del bolo de muestra inyectado: el transporte por convección desarrollado en condiciones de flujo laminar, que origina un perfil parabólico; y el transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración.

Para poder caracterizar la dispersión en un sistema de flujo no segmentado, el coeficiente de dispersión de Ruzicka es el parámetro más adecuado. Se trata de una medida directa de la dilución que sufre el trozo de muestra inyectado cuando pasa por el detector. La dispersión total del sistema depende de las dispersiones originadas por el volumen de muestra y los aspectos geométricos del reactor, el caudal establecido y la dilución provocada por la geometría de la celda de flujo.

Cuando ocurre una reacción química hay que considerar aspectos cinéticos en FIA ya que la medición se realiza en condiciones de no-equilibrio.

“Una reacción química puede alterar el valor del coeficiente de dispersión en FIA de dos maneras: a) cuando se mide la propiedad del producto de la reacción que se produce en el flujo, que es la situación habitual; en este caso la contribución química hace que el valor de la dispersión práctica disminuya por lo tanto cuanto mayor sea la velocidad de reacción menor es la dispersión. b) Cuando se mide la propiedad de uno de los componentes de la reacción que desaparece en el flujo con el tiempo. En este caso la contribución química hace aumentar el valor del

coeficiente de dispersión. Cuanto mayor sea la velocidad de reacción mayor es la dispersión” (Cañizares Macías, 2002)

Los datos que se obtienen del análisis en flujo son resultado de dos procesos simultáneos: la dispersión de la muestra y la reacción química; las técnicas de flujo se basan en controlar estos procesos.

Al ser sistemas continuos se obtiene una señal transiente cuyo máximo es la parte del bolo menos diluida y cuya forma (pico) dependerá del tiempo de residencia de la muestra dentro del sistema. A tiempos cortos no se genera un gradiente y a tiempos largos hay una alta dispersión y forman picos anchos.

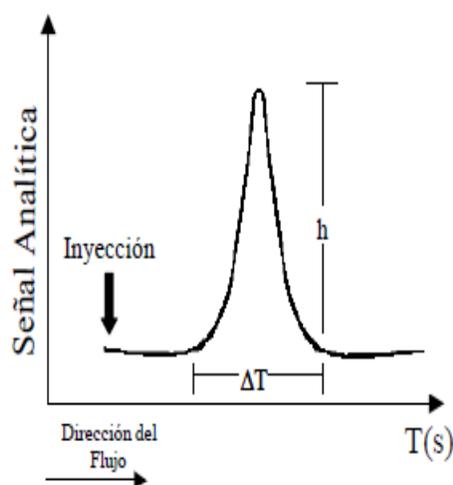


Figura 8. Señal analítica característica de los sistemas de análisis en flujo (Cañizares Macías, 2002)

El procesamiento automatizado de muestras, la alta repetibilidad, la adaptabilidad, la micro-miniaturización, la contención de productos químicos, la reducción de desechos y la economía de reactivos son ventajas que contribuyen a la aplicación de las técnicas de flujo.

3.1 FIA (Análisis por inyección en flujo)

FIA se basa en la inyección de la muestra dentro de una corriente portadora de un flujo unidireccional a la que serán agregados los reactivos en un punto de confluencia. De esta manera se forma un gradiente de concentración debido a la

dispersión de la muestra, y la señal transitoria refleja el gradiente de la zona de muestra, a medida que pasa por el detector.

En la figura 9 se muestra de manera esquemática el proceso de dispersión para los sistemas FIA: Se inyecta una muestra en una corriente de solución portadora que es impulsada por una bomba peristáltica . La inyección de la muestra se realiza bajo dispersión controlada en volúmenes conocidos (A). La solución portadora y la muestra luego se encuentran en puntos de mezcla con los reactivos y reaccionan. El tiempo de reacción está controlado por una bomba y una bobina de reacción (B). El producto de reacción luego fluye a través de un detector (C). La mayoría de las veces, el detector es un espectrofotómetro, ya que las reacciones suelen producir un producto coloreado. Después de pasar por el detector, la muestra fluye hacia el desperdicio. (Ruzicka, **FLOW INJECTION ANALYSIS, 2019**)

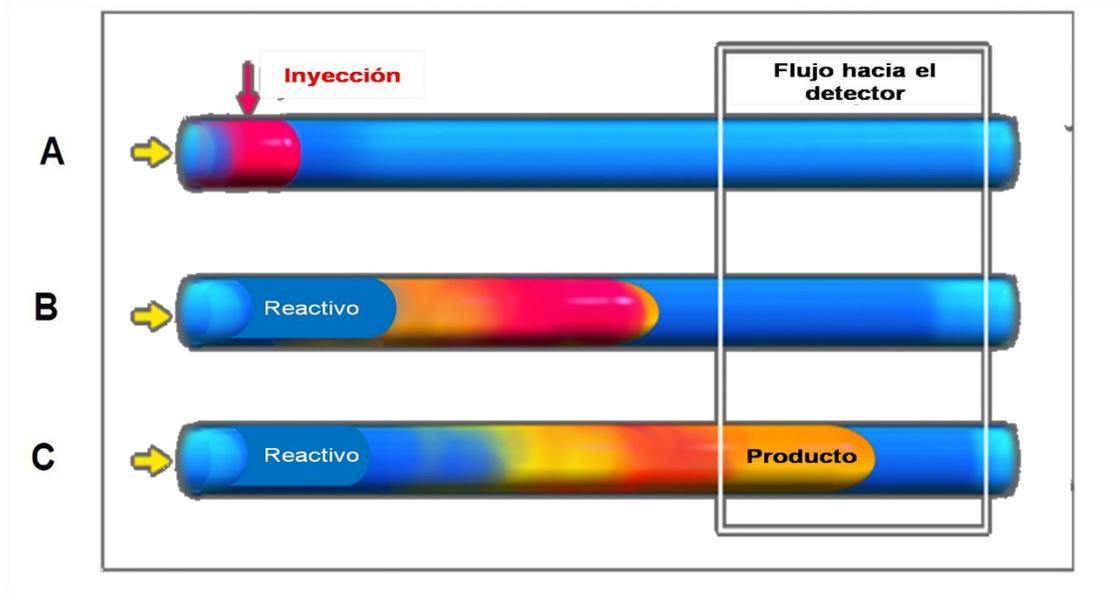


Figura 9. La dispersión en FIA: A (Inyección de la muestra); B (Reacción de la muestra con los reactivos); C (El producto fluye al detector) (Ruzicka, **FLOW INJECTION ANALYSIS, 2019**).

Los sistemas FIA de manera general cuentan con:

Sistema de propulsión: Compuesto de bombas, cuya función es proporcionar un flujo constante y reproducible.

Sistema de inyección: Permite la inserción de un volumen de muestra definido, exacto y reproducible a través de válvulas; rotatoria hexagonal para FIA o de multiposición para SIA

Sistemas de transporte y reacción: transportan la corriente pero también sirven de unión; tubos, conectores, reactores (cuya forma y longitud es en función del tiempo de residencia requerido para que la mezcla de portador muestra y reactivo se lleve a cabo)

Célula de flujo, que permite la medida continúa del analito.

Sistema de detección: Las técnicas de análisis en flujo, son muy versátiles y se adaptan a una gran variedad de detectores, sin embargo, para ser adecuados deben poseer algunos atributos claramente definidos, tales como: bajo nivel de ruido, respuesta rápida y lineal en un amplio intervalo de concentraciones y alta sensibilidad.

3.2 SIA (Análisis por inyección secuencial)

SIA se basa en la inyección secuencial de la muestra y los reactivos, dentro de una corriente portadora, seguido de una inversión del flujo que promueve la mutua dispersión de las zonas inyectadas. El flujo de la corriente portadora es programado para optimizar el ensayo.

A diferencia de las técnicas en lote donde la mezcla de reactivo y analito es homogénea e instantánea, SIA es una técnica que se basa en la dispersión gradual de la zona de muestra, lo que forma un gradiente de concentración a medida que la muestra avanza hacia el detector.

La respuesta del sistema SI es el resultado de dos procesos ambos de naturaleza cinética, el proceso físico de la dispersión de las zonas de muestra y reactivos, y el proceso químico, de formación de la especie química en la interfase de las zonas.

En la figura 10 se muestra el proceso de dispersión en SIA: En SIA ocurren dos procesos de transferencia de masa que promueven la mezcla de la muestra con los reactivos, las dispersiones axial y radial. Primero la inyección de la muestra (A) y segundo se inyecta el reactivo (B), el reactivo penetra la zona de la muestra debido a la dispersión axial a medida que las zonas combinadas se mueven en flujo "hacia adelante" (C). Una vez se invierte el flujo (D), se causa un flujo turbulento por la aceleración que promueve la dispersión radial y axial a medida que la mezcla de reacción pasa a través de la tubería hacia la celda de flujo. Cuando la mezcla de reacción llega a la celda de flujo (E), la mezcla ha sido completada (**Ruzicka, FLOW INJECTION ANALYSIS, 2019**). Por lo que el sistema debe construirse de tal manera que se maximice la dispersión radial, se optimice la dispersión axial (que determina la penetración de las zonas de muestras y zonas de reactivos) y se maximice la velocidad de las reacciones químicas para lograr una alta frecuencia de muestreo.

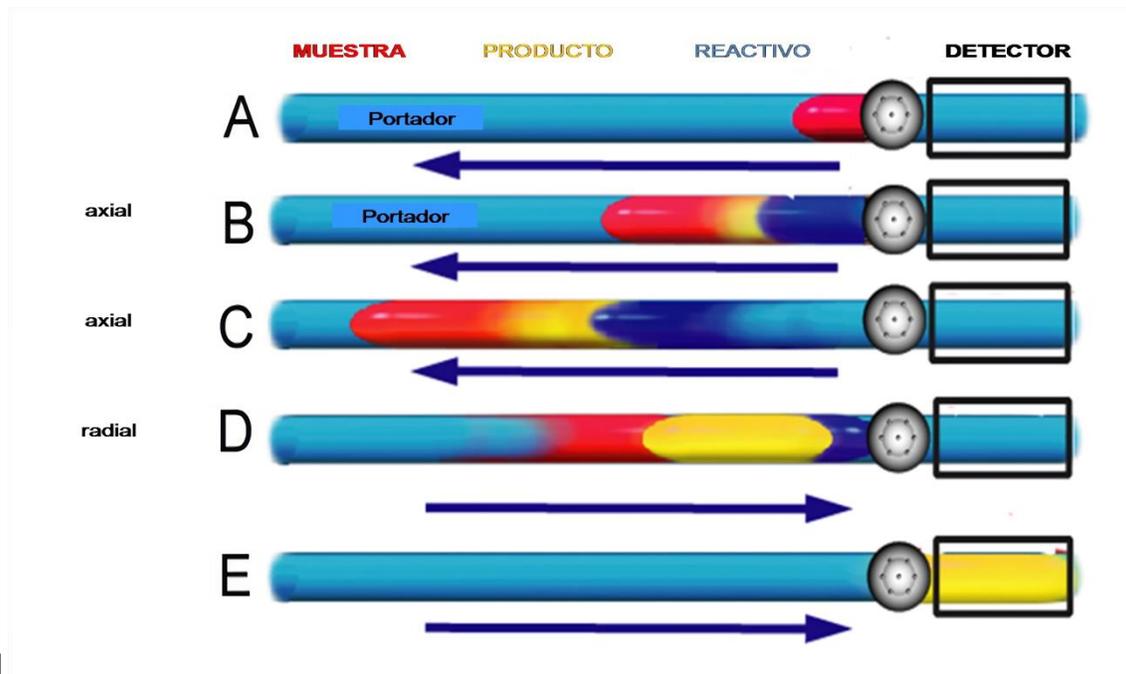


Figura 10. Mezclado por dispersión en SIA: A (Inyección de la muestra); B (Inyección de reactivo); C (Dispersión axial);D(Inversión del flujo);E (La mezcla de reacción fluye hacia el detector)

Un sistema SIA convencional está compuesto por una jeringa bidireccional, un bucle de espera, una válvula de multiposición convencional, un reactor y un detector.

La programación del flujo hace muy versátil esta técnica, pues se puede controlar todos los parámetros desde la inyección de la muestra, la dispersión y el tiempo, todo controlado desde un software, que realiza la reconfiguración física del sistema

METODOLOGIA

Instrumentación y equipo

Balanza analítica

Molino para café Toastmaster modelo 1119

Parrilla de agitación magnética Thermoscientific modelo SP131635

Centrifuga Hettich zentrifugen D-78532 Tuttlingen

Bomba peristáltica ISMATEC, modelo ISM4408

Detector espectrofotométrico UV-VIS Ocean Optics USB4000

Fuente de luz DT-MINI-2GS

Fibras ópticas 600 μm de diámetro interno y 61 cm de longitud

Celda de flujo ámbar en zeta con paso óptico de 10 mm

Válvula de inyección de 6 vías Rheodyne

Equipo *FIAlabSICrom*

Vortex Maxi Mix Thermoscientific

Cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1260 Infinity con detector de fotodiodos.

Columna Agilent extend-C18, 5 μm , 4.6 x 150 mm, Numero de parte 773450-902

Reactivos

Acetato de zinc dihidratado 99% J, T. Baker

Ácido acético glacial 99.9% J.T. Baker

Hexacianoferrato de potasio trihidratado 99% Sigma Aldrich

Reactivo de Folin Ciocalteu (RFC) 2N Sigma Aldrich

NaOH 98% Femont

ACG 95% Sigma Aldrich

Metanol 99% Sigma Aldrich

Acido gálico monohidratado 98% Sigma Aldrich

TPTZ (2, 4, 6-tri (2.piridil)-5-triazina) 99% Sigma Aldrich

Cloruro férrico hexa hidratado 99% Analit

Acido clorhídrico 36.8% J. T. Baker

Trolox (Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) 97% Sigma Aldrich

Preparación de disoluciones

Reactivo de Carrez I: Se disolvieron 24 g de acetato de zinc en 50 mL de agua destilada, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se agregaron 3 mL de ácido acético glacial, se llevó al aforo con agua destilada.

Reactivo de Carrez II: Se disolvieron 15 g de hexacianoferrato de potasio en 50 mL de agua destilada, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 M; Se midieron 10.0 mL del Reactivo de Folin Ciocalteu concentrado con pipeta volumétrica y se colocaron en un matraz volumétrico de 100.0 mL, se llevó al aforo con agua destilada. Se almacenaron en un frasco de vidrio ámbar.

Hidróxido de sodio 0.5 M: Se pesaron 2.04 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 50 mL de agua destilada, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Estándar de ácido gálico 250 ppm: se pesaron 12.7 mg de ácido gálico, se disolvieron con aproximadamente 30 mL de agua destilada, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Estándar de ácido clorogénico 500 ppm: se pesaron 26.3 mg de ácido clorogénico con 95% de pureza y se disolvieron en 20 mL de metanol, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50.0 mL y se llevó al aforo con metanol.

Estándar de Trolox 400 μ M: se pesaron 10.32 mg de Trolox, se disolvieron en 10 mL de etanol, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Ácido clorhídrico 0.005 M: se tomaron 41.5 μ L de ácido clorhídrico concentrado y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100.0 mL con una cama de agua, y se llevó al aforo con agua destilada.

Ácido clorhídrico 0.04 M: se tomaron 333 μ L de ácido clorhídrico concentrado y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100.0 mL con una cama de agua, y se llevó al aforo con agua destilada.

Cloruro férrico 20 mM: se pesaron 140 mg de cloruro férrico y se disolvieron en 10 mL de agua se transfirieron a un matraz volumétrico de 25,0 mL y llevó al aforo con agua destilada.

TPTZ 10 mM: se pesaron 15.7 mg de TPTZ y se disolvieron en ácido clorhídrico 0.04 M y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 5.0 mL.

Reactivo de FRAP: se mezclaron HCl 0.005 M, TPTZ μ M y FeCl₃ 20 mM, en relación 10:1:1, para preparar 5 mL del reactivo de FRAP al 80%, se tomaron 4 mL de la mezcla y se llevaron al aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 5.0 mL.

Ácido acético 0.2%: se tomaron 0.5 mL de ácido acético concentrado y se colocaron en un matraz volumétrico de 250.0 mL que contenía un poco de agua destilada y posteriormente se llevaron al aforo.

Muestras

Se analizaron doce muestras de café tostado provenientes del Estado de Oaxaca, once de las cuales fueron adquiridas en la Finca Las Nieves y una de la Finca Brújula. Las muestras pertenecen al género *Coffea arabica*, de las variedades Geisha, Bourbon y Marsellesa. Procesadas por un método de beneficiado diferente (Natural, lavado, honey).

Tabla 4. Muestras de *Coffea arabica* a analizar

Variedad	Método	Tipo de café	Código
Bourbon	Honey	Bourbon honey tostado al 14%	BH14
		Bourbon honey tostado al 20%	BH20
		Bourbon honey tostado al 26%	BH26
	Lavado	Bourbon lavado tostado al 14%	BL14
		Bourbon lavado tostado al 20%	BL20
		Bourbon lavado tostado al 26%	BL26
Natural	Bourbon natural tostado al 14%	BN14	
Geisha	Honey	Geisha honey tostado en julio al 14 %	GH14Jl
		Geisha honey tostado en junio al 14 %	GH14Jn
	Lavado (Finca Brújula)	Geisha lavado adicionado con moo	GL
	Natural	Geisha natural tostado al 14%	GN14
Marsellesa	Honey	Marsellesa honey tostado al 14%	M

Estrategia experimental

En la figura 11 se muestra la estrategia experimental realizada para determinar los parámetros que se evaluarán en las muestras de café.

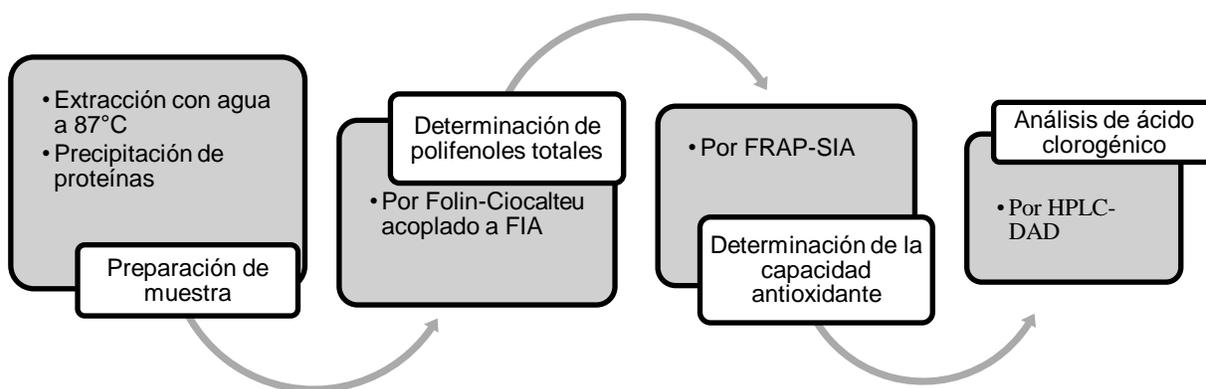


Figura 11. Diagrama de estrategia experimental.

Preparación de muestras

Tratamiento

Las muestras se molieron por 30 s en un molino para café Toastmaster® modelo 1119; posteriormente se tamizaron, en una malla del número 40, equivalente a tamaños de partícula menores o iguales a 425 μm .

Extracción

Se tomaron 0.9 g de la muestra molida y se colocaron en 20 mL de agua destilada a 87°C y se mantuvo en esta temperatura por 5 min con agitación constante. Se dejó enfriar y se filtró, con papel filtro #609 de filtración lenta, finalmente se colocó en un matraz volumétrico de 25.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Precipitación de proteínas con reactivos de Carrez

De la disolución anterior se tomaron 10 mL, se colocaron en un tubo para centrifuga y se le adicionaron 1 mL del reactivo de Carrez I y 1 mL del reactivo de Carrez II, después se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, pasado este tiempo, se realizó una filtración con papel filtro #609 de filtración lenta, para retirar los sólidos, el líquido recuperado se llevó a un aforo de 10.0 mL.

Determinación de polifenoles totales

Esta determinación se realizó por el método de Folin Ciocalteu acoplado al sistema FIA; en la figura 12 se muestra la configuración usada.

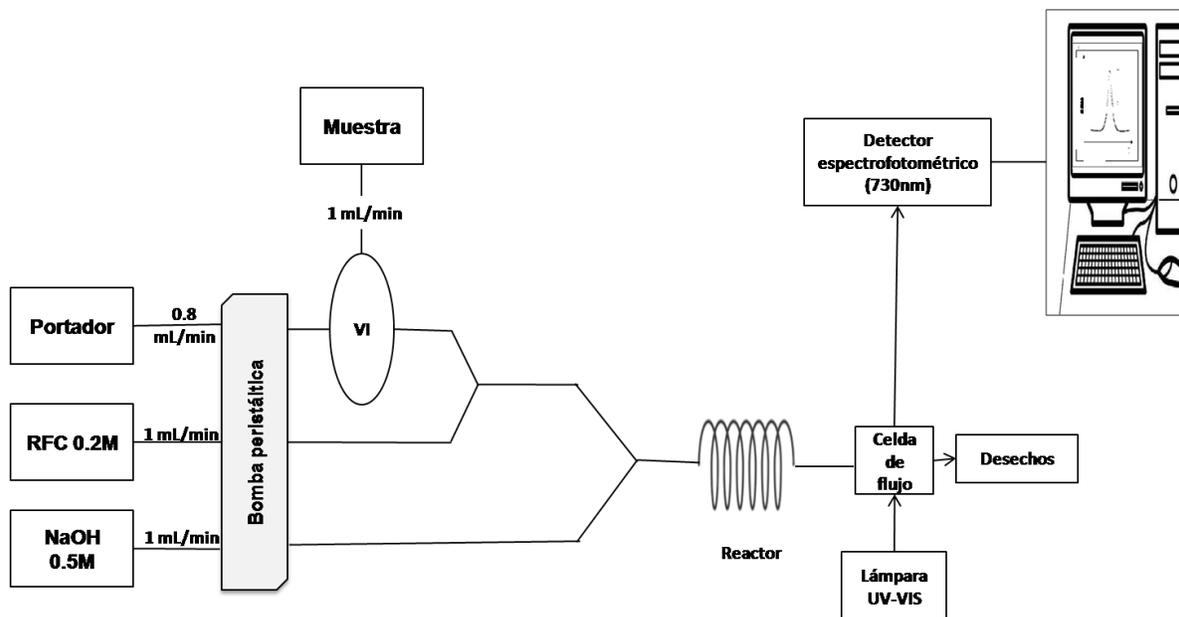


Figura 12. Configuración Folin Ciocalteu-FIA para la determinación de polifenoles.

Se usó una bomba peristáltica con cuatro canales para hacer pasar hidróxido de sodio 0.5 M , RFC 0.2 M y la muestra a través de tuberías tygon de 1.2 mm de diámetro interno (DI) y con flujo de 1 mL/min, y el portador (agua) en tuberías de tygon de 0.72 mm de diámetro interno a un caudal de 0.8 mL/min; hasta puntos de confluencia donde los reactivos se mezclan y son transportados a un reactor de 100 cm de longitud y DI de 0.5 mm para finalmente pasar por un sistema de detección espectrofotométrico de UV-VIS Ocean Optics USB4000 acoplado a una fuente de luz DT-MINI-2GS a través de fibras ópticas (600 μm de D.I. y 61 cm de longitud), las cuales registraron la señal analítica por medio de una celda de flujo ámbar con paso óptico de 10 mm. La lectura se realiza a 730 nm y el registro se lleva a cabo con el programa Suite Spectra.

Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante se usó el método FRAP acoplado al sistema SIA usando la configuración implementada en el laboratorio en 2022 que se muestra en la figura 13.

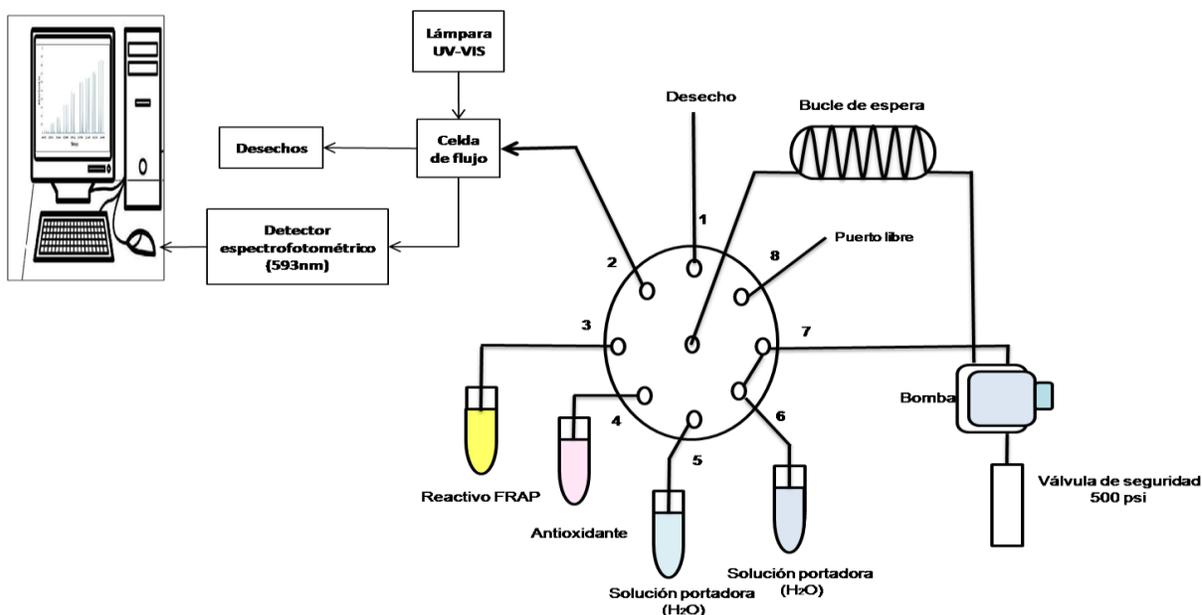


Figura 13. Configuración FRAP-SIA para determinación de capacidad antioxidante.

Los análisis se realizaron en las siguientes condiciones:

Las disoluciones fueron analizadas usando el equipo FIALabSICrom, integrado por una válvula de multiposición de 8 puertos, un bucle de espera de tubería PEEK 0.5mm de DI y una capacidad de 1 mL, un reservorio de disolución portadora con capacidad de 4 mL, y una bomba de jeringa. En los puertos 1, 2, 3, 4 y 5 se usaron tuberías de teflón de 0.75 mm de DI y para el puerto 6 de DI de 1.55 mm.

El sistema de detección consistió en un espectrofotómetro de UV-VIS Ocean Optics USB4000 acoplado a una fuente de luz DT-MINI-2GS, a través de fibras ópticas (600 μ m de D.I. y 61 cm de longitud), las cuales registraron la señal analítica por medio de una celda de flujo ámbar en zeta con paso óptico de 10 mm.

La secuencia en que el equipo lleva acabo el análisis es mostrada en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de aspirado para determinación de capacidad antioxidante.

Acción	Puerto	Descripción	Caudal ($\mu\text{L/s}$)	Dirección de flujo	Tiempo (s)
Llenado de bomba con el portador	6-7	La bomba es llenada con 1.5 mL de agua destilada.	100	Inverso	15
Aspirado de Solución FRAP	3	Se aspira 33 μL de solución FRAP al bucle de espera.	70	Inverso	0.47
Aspirado de antioxidante	4	Se aspira 38 μL del antioxidante al bucle de espera.	70	Inverso	0.54
Aspirado de Solución FRAP	3	Se aspira 33 μL de solución FRAP al bucle de espera.	70	Inverso	0.47
Aspirado de portador	5	Se aspira 110 μL de agua al bucle de espera con 1 s de espera.	50	Inverso	3.2
Dispensado hacia el detector	2	Se dispensa 100 μL al detector y se espera 20 s.	20	Hacia delante	25
Dispensado hacia el detector	2	Se dispensa 1614 μL del bucle de espera y la bomba, al detector.	35	Hacia delante	46

Determinación de ácido clorogénico

La cuantificación de ácido clorogénico se realizó mediante HPLC-DAD, Agilent Technologies 1260 infinity, los resultados se procesaron a través del software EZ Chrom.

Se realizó una cromatografía en fase reversa con un gradiente de A (ácido acético 0.2%) y B (Metanol), que se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Gradiente de elusión para análisis cromatográfico de ácido clorogénico.

Tiempo(min)	%A	%B
0	70	30
3	70	30
5	50	50
6	50	50
8	30	70
10	30	70

La columna que se usó es una zorbax extend C18 Agilent, 5 μm , 4.6x150 mm. Se inyectó un volumen de 10 μL , a un flujo de 0.5 mL/min y se midió a 324 nm utilizando un detector de arreglo de diodos

Las muestras se filtraron con una jeringa NORM-JECT® de 1 mL, en la cual se colocó un filtro de acetato de celulosa con un tamaño de partícula de 0,45 μm NALGENE®, se colocó en viales de vidrio Agilent de 2mL, dentro del cual se colocó un inserto de vidrio de 250 μL donde se depositó la muestra. Los viales con la muestra se colocaron por unos segundos en un vortex para eliminar burbujas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de calibración para polifenoles

Se realizaron dos curvas de calibración usando dos estándares uno de ácido gálico en concentraciones de 12.5 a 150 ppm y otro de ácido clorogénico en concentraciones de 15 a 150 ppm.

El registro de las absorbancias se presenta en los diagramas, para el estándar de ácido gálico en la figura 14 y para el estándar de ácido clorogénico en la figura 16.

Las figuras 15 y 17 muestran la representación gráfica de las curvas de calibración para los estándares de ácido gálico y clorogénico, respectivamente.

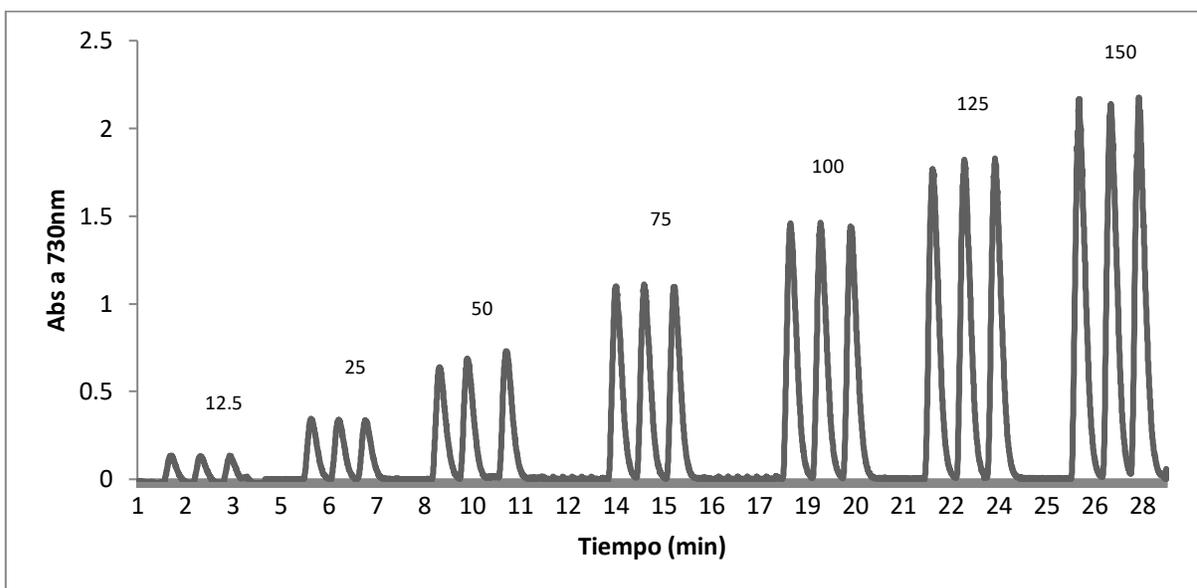


Figura 14. Diagrama para estándar de ácido gálico (ppm)

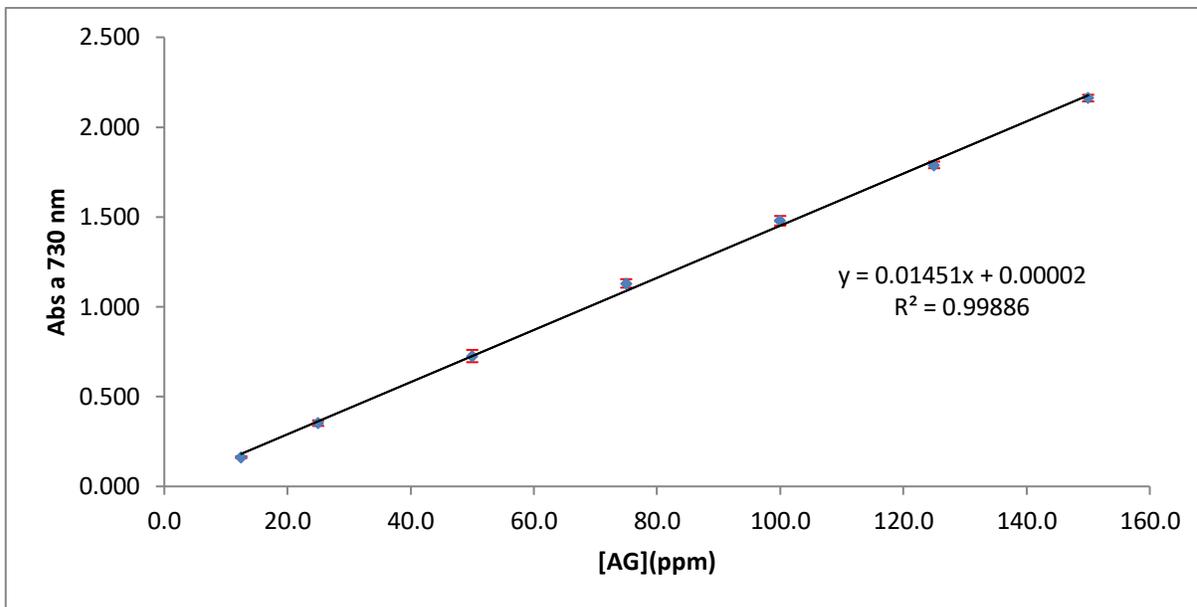


Figura 15. Curva de calibración del estándar de ácido gálico

Tabla 7. Parámetros estadísticos de la curva de calibración de ácido gálico

Pendiente	0.0145±0.0001
Ordenada al origen	2.0000E-5±6.3300E-3
R ²	0.9989

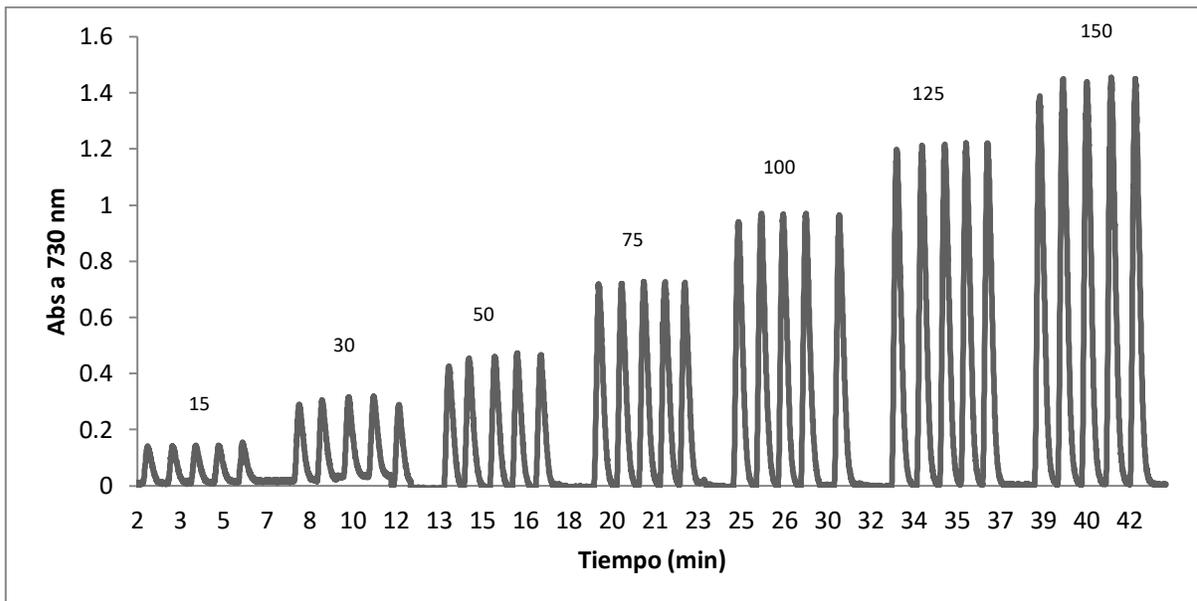


Figura 16. Diagrama del estándar de ácido clorogénico (ppm)

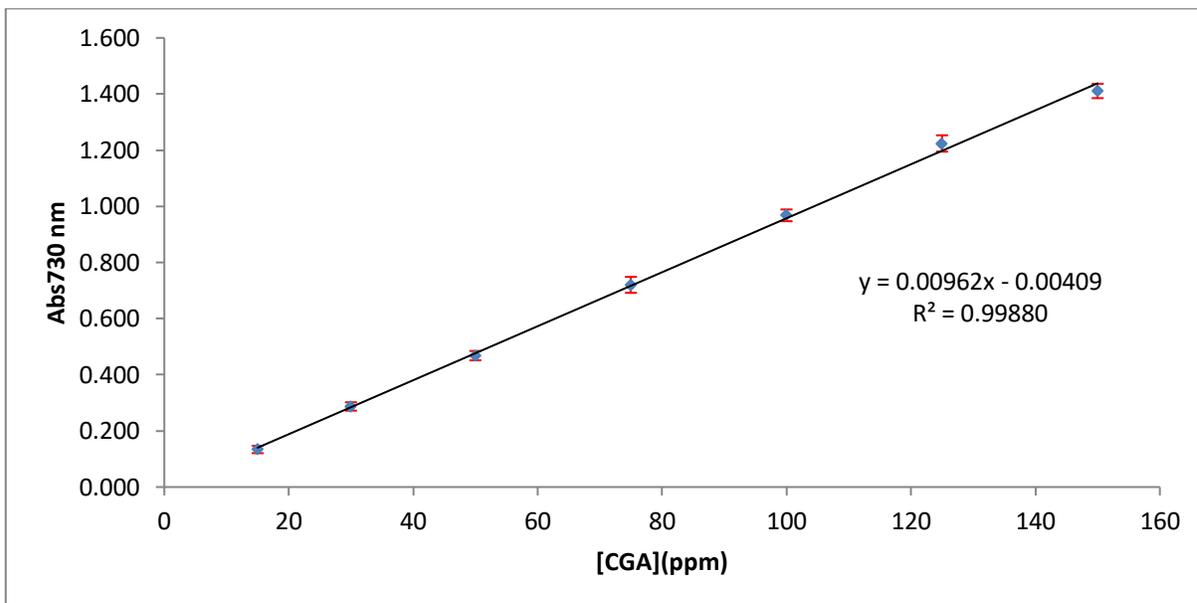


Figura 17. Curva de calibración para el estándar de ácido clorogénico

Tabla 8. Parámetros estadísticos de la curva de calibración del ácido clorogénico

Pendiente	0.0096±0.0001
Ordenada al origen	-0.0041±0.0051
R ²	0.9988

Polifenoles totales en muestras

La cantidad de polifenoles en la muestra se expresó como miligramos y micro moles de ácido gálico por gramo de muestra (mg AG/g y $\mu\text{mol AG/ g}$) o miligramos y micro moles de ácido clorogénico por gramo de muestra (mg ACG/g y $\mu\text{mol ACG/ g}$). Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Contenido de polifenoles totales en muestras de café, determinado por Folin Ciocalteu

Muestra	mg AG /g café	μmol AG/ g café	mg ACG/g café	$\mu\text{mol ACG/ g}$ café
Marsellesa	26.50±0.20	155.75±1.18	41.43±0.31	116.94±0.88
Bourbon natural 14%	23.54±0.26	138.35±1.52	36.84±0.40	103.97±1.14
Geisha Honey Junio	23.65±0.31	139.03±1.81	37.02±0.48	104.47±1.35
Geisha Honey Julio	19.21±0.45	112.94±2.64	30.09±0.70	84.93±1.97
Geisha lavado	22.92±0.15	134.71±0.89	35.86±0.24	101.21±0.67
Geisha natural 14%	21.55±0.16	126.69±0.96	33.75±0.25	95.26±0.72
Bourbon lavado 26%	24.33±0.12	143.01±0.73	38.05±0.19	107.39±0.55
Bourbon lavado 20%	25.28±0.14	148.58±0.82	39.53±0.22	111.56±0.61
Bourbon lavado 14%	25.83±0.10	151.82±0.56	40.38±0.15	113.97±0.42
Bourbon honey 26%	22.18±0.04	130.37±0.22	34.70±0.06	97.94±0.16
Bourbon honey 20%	24.77±0.06	145.58±0.36	38.76±0.09	109.39±0.27
Bourbon honey 14%	25.15±0.33	147.87±1.91	39.37±0.51	111.12±1.43

Para polifenoles totales se usaron dos estándares: ácido gálico, porque se encuentra en una gran variedad de plantas y frutas, y el de ácido clorogénico porque es el polifenol más abundante en el café (Awwad, et al, 2021).

En ambos estándares el comportamiento es el mismo en las muestras, sin embargo, se decidió usar los resultados expresados en términos de ácido

clorogénico, para la posterior interpretación de los resultados; por ser el polifenol más abundante en el café.

Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante

Se realizó una curva de calibración usando Trolox, el estándar antioxidante por excelencia, comúnmente utilizado en la mayoría de los estudios sobre capacidad antioxidante; en concentraciones de 5 a 120 μM , el registro de las absorbancias se muestra en el siagrama de la figura 18. La representación gráfica de la curva se muestra en la figura 19.

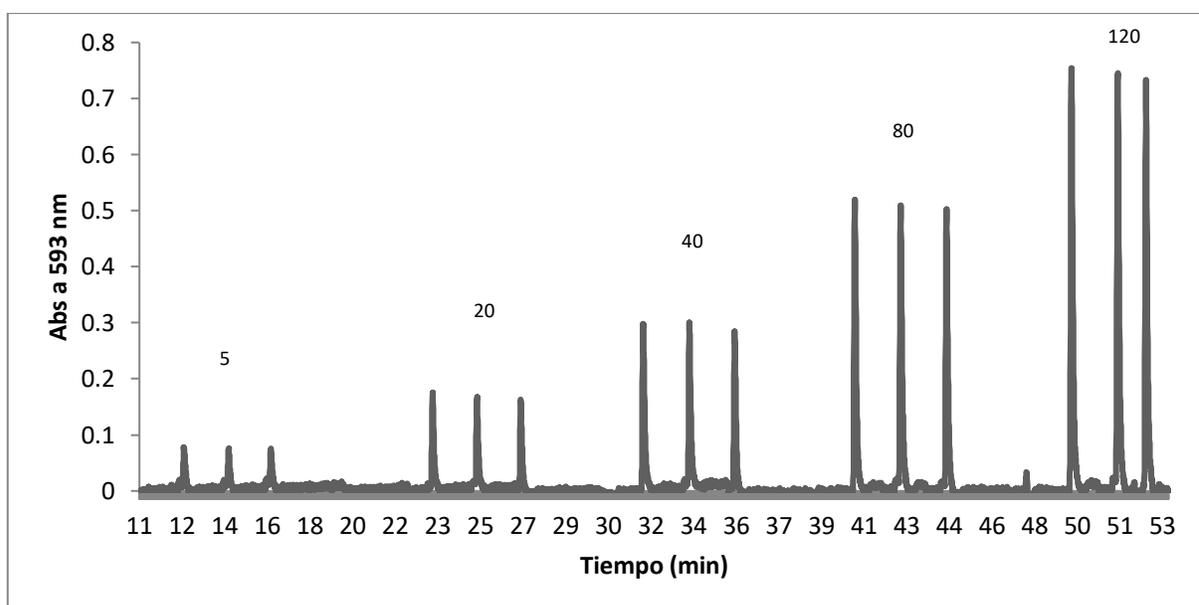


Figura 18. Siagrama FRAP con estándar Trolox

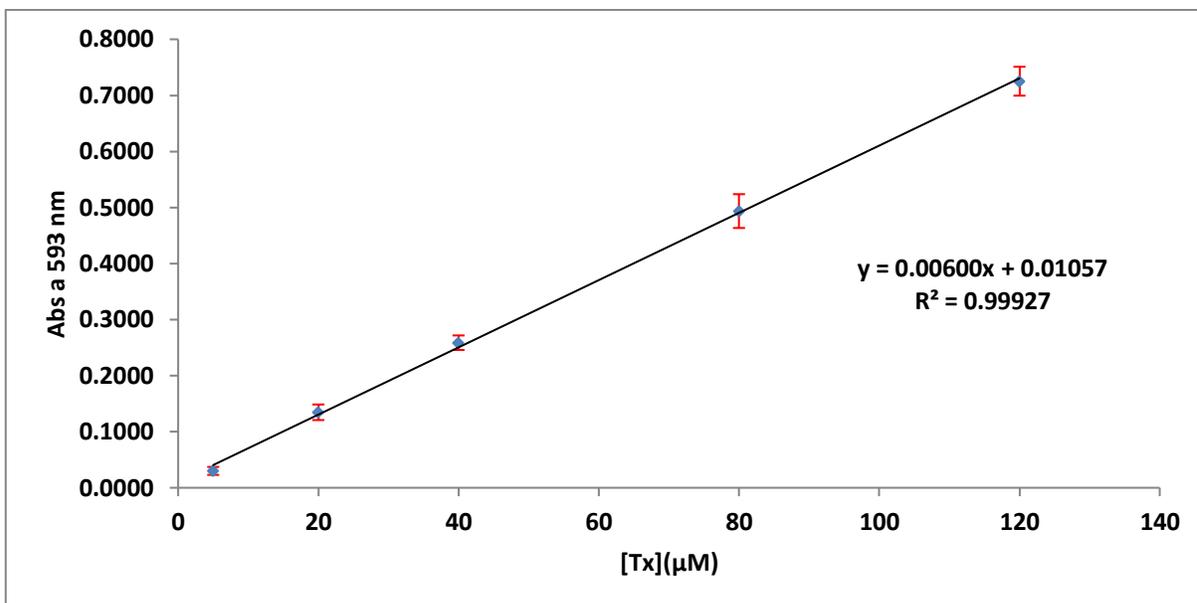


Figura 19. Curva de calibración estándar de Trolox

Tabla 10. Parámetros estadísticos de la curva de calibración con estándar Trolox

Pendiente	0.0060±0.0001
Ordenada al origen	0.0106±0.0049
R ²	0.9993

Capacidad antioxidante de muestras

La capacidad antioxidante de las muestras fue cuantificada por comparación con una curva de calibración con estándar Trolox y en unidades equivalentes al estándar. (Benítez-Estrada, et al, 2020); los resultados se expresan como miligramos y micro moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg ETx/g y μmol ETx /g) y se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Capacidad antioxidante en muestras de café, determinada por FRAP

Muestra	mg ETx /g café	μmol ETx /g café
Marsellesa	21.01±1.40	83.95±5.59
Bourbon natural 14%	17.60±1.59	70.32±6.34
Geisha Honey Junio	17.33±0.85	69.23±3.41
Geisha Honey Julio	15.48±1.77	61.84±7.07
Geisha lavado	20.11±0.57	80.33±2.27
Geisha natural 14%	16.50±1.13	65.94±4.53
Bourbon lavado 26%	17.18±0.25	68.63±1.02
Bourbon lavado 20%	17.40±0.89	69.51±3.56
Bourbon lavado 14%	19.70±0.67	78.69±2.67
Bourbon honey 26%	14.57±1.97	58.22±7.89
Bourbon honey 20%	16.83±0.91	67.24±3.64
Bourbon honey 14%	19.96±1.12	79.76±4.47

Determinación de ácido clorogénico por HPLC-DAD

Curva de calibración de ácido clorogénico.

Para la curva de calibración se usó ácido clorogénico en un intervalo de concentraciones de 5 a 100 ppm. En la figura 20 se muestra un ejemplo de las señales de respuesta para el estándar de ácido clorogénico a las distintas concentraciones, cuya señal se empieza a apreciar en el minuto 6.25.

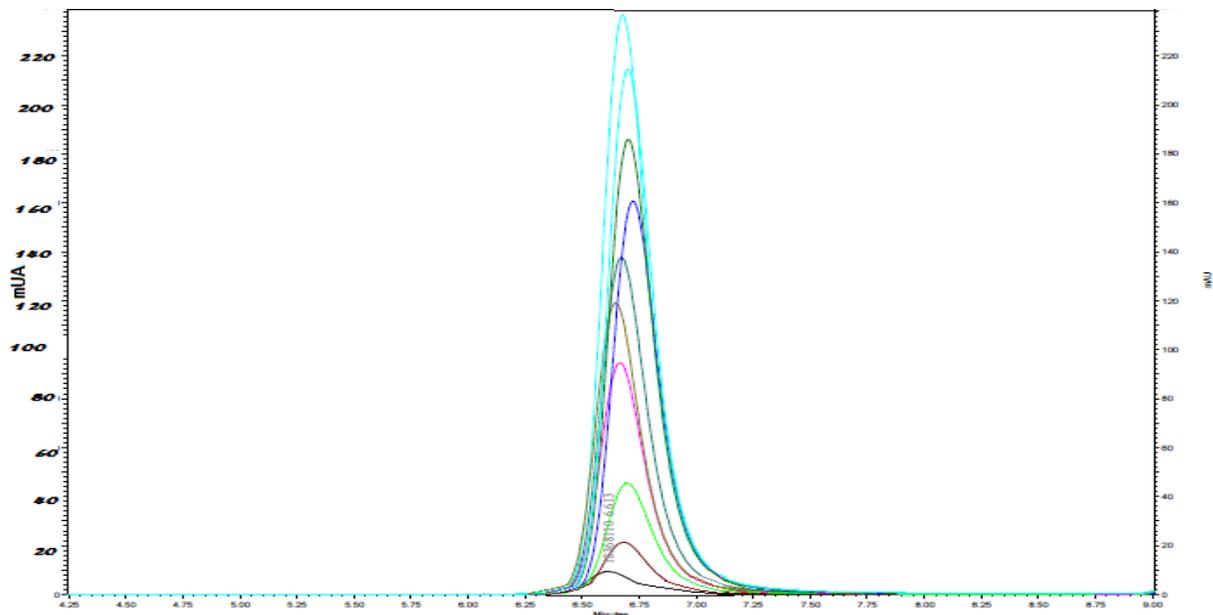


Figura 20. Cromatograma de la curva de calibración con estándar de ácido clorogénico

Se usó el área bajo la curva (ABC) de la respuesta y se construyó una curva de calibración cuya representación gráfica se muestra en la figura 21.

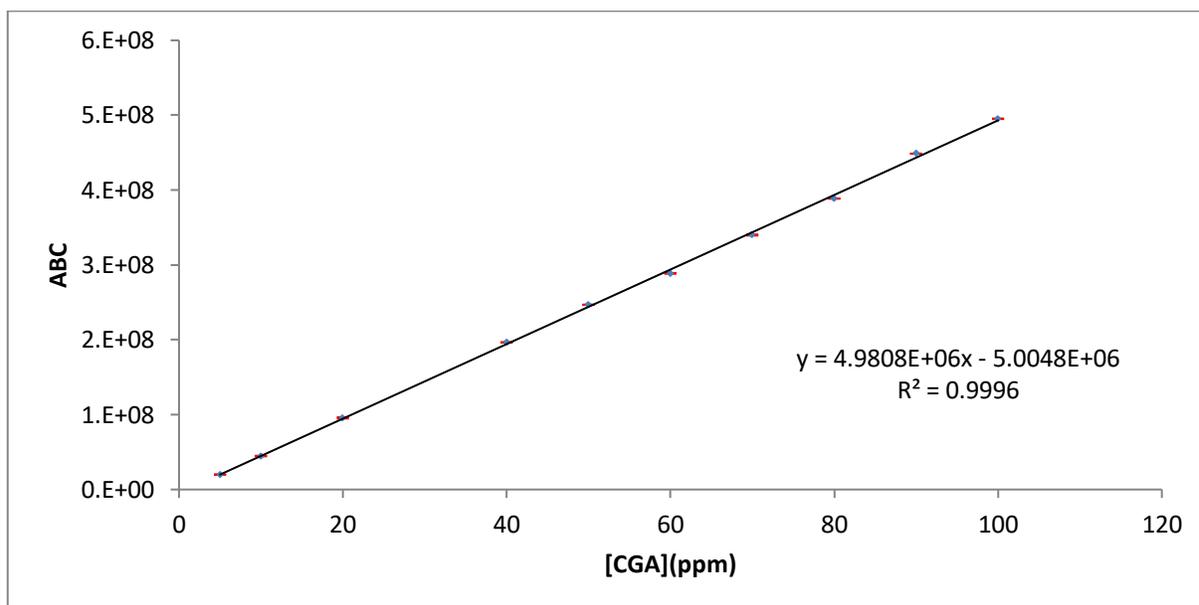


Figura 21. Curva de calibración para determinación de ácido clorogénico por HPLC-DAD.

Tabla 12. Parámetros estadísticos de la curva de calibración de ácido clorogénico.

Pendiente	4.9808E+06±2.0014E+04
Ordenada al origen	-5.0048E+06±1.2277E+06
R ²	0.9996

Contenido de ácido clorogénico en las muestras de café

En la figura 22 se muestra el ejemplo de un cromatograma para la muestra de café Marsellesa.

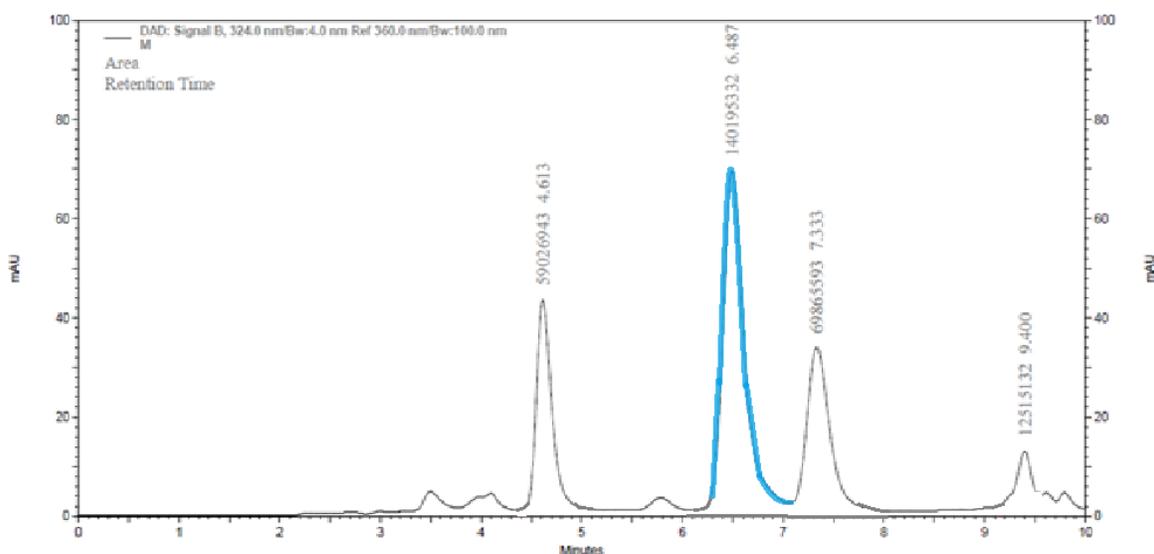


Figura 22. Ejemplo de cromatograma de café Marsellesa. En azul resalta el pico cromatográfico correspondiente al ácido clorogénico.

La cuantificación de ácido clorogénico en las muestras se realizó por interpolación con la curva de ACG, los resultados se expresan como miligramos y micro moles de ácido clorogénico por gramo de muestra (mg ACG/g y $\mu\text{mol ACG/g}$) y se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Contenido de ácido clorogénico en muestras de café, determinado por HPLC.

Muestra	mg ACG/g café	μmol ACG/ g café
Marsellesa	7.36±1.83E-03	20.77±0.01
Bourbon natural 14%	5.76±1.17E-02	16.25±0.03
Geisha Honey Junio	6.65±1.19E-02	18.77±0.03
Geisha Honey Julio	6.14±9.72E-03	17.33±0.03
Geisha lavado	6.05±1.22E-03	17.06±0.00
Geisha natural 14%	6.51±2.96E-02	18.37±0.08
Bourbon lavado 26%	4.37±1.90E-03	12.33±0.01
Bourbon lavado 20%	5.20±3.34E-02	14.69±0.09
Bourbon lavado 14%	5.71±6.23E-03	16.12±0.02
Bourbon honey 26%	5.29±1.66E-02	14.94±0.05
Bourbon honey 20%	6.61±3.08E-02	18.66±0.09
Bourbon honey 14%	7.01±6.45E-02	19.77±0.18

Análisis de los resultados

Para evaluar el efecto que tienen la variedad, el tipo de beneficiado y el grado de tostado, en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante del café, se llevo a cabo un análisis, por medio de ANOVA de un factor, realizadas en Microsoft Excel. Con el objetivo de determinar cómo estas tres etapas de la producción del café, influyen en los componentes que otorgan un efecto antioxidante se realizaron los siguientes análisis:

- a) Para determinar el efecto de la variedad de café: se usaron las muestras Marsellesa, Bourbon honey tostado al 14% y Geisha honey tostado al 14% en junio.
- b) Para determinar el efecto del tipo de beneficiado de la cereza: se usaron dos grupos de muestras de las variedades Geisha y Bourbon beneficiadas de diferentes maneras, el primer grupo: Geisha natural, Geisha lavado y Geisha honey; el segundo grupo: Bourbon natural tostado al 14%, Bourbon lavado tostado al 14%, y Bourbon honey tostado al 14%.
- c) Para determinar el efecto del grado de tostado se usaron las muestras Bourbon honey tostados al 14, 40 y 26%, y Bourbon lavado tostados al 14, 20 y 26%.

Para todas los análisis de varianza realizados se considera la hipótesis nula (H_0) como la igualdad de las muestras y la hipótesis alterna (H_i) como la presencia de al menos una muestra diferente a las demás.

Posteriormente como prueba post hoc, se realizó la prueba de Bonferroni para determinar qué muestras eran diferentes. Esta prueba nos permite reducir el error global y ver diferencias reales entre muestras.

Efecto de la variedad de café en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de las muestras.

Para este análisis se usaron muestras de tres variedades, beneficiadas de la misma manera (honey) y todas tostadas en un 14%. Las muestras que se usaron para evaluar el efecto de la variedad son Marsellesa (M), Bourbon (BH14) y Geisha (GHJn).

En la figura 23 se muestra la representación gráfica de las muestras analizadas para evaluar el efecto de la variedad en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico.

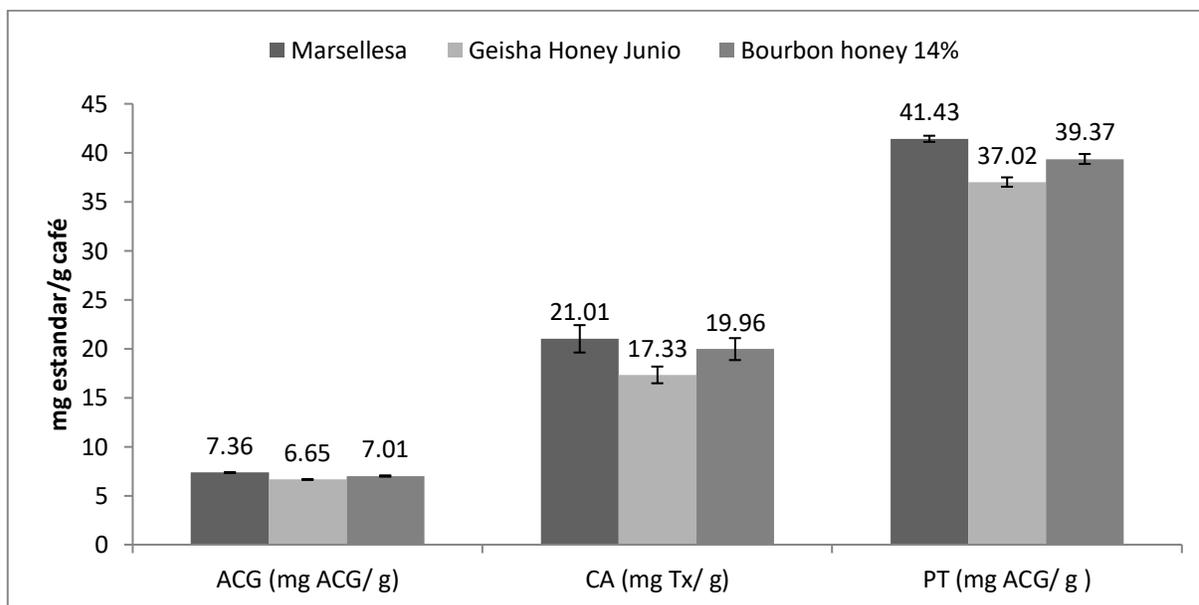


Figura 23. Contenido de polifenoles (PT), ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en variedades de café marsellesa, bourbon y geisha; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.

Las tablas 14, 15 y 16 muestran los resultados de las ANOVA realizadas para evaluar el efecto de la variedad de café en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de ácido clorogénico, respectivamente.

Tabla 14. Análisis de varianza del efecto de la variedad de café en el contenido de polifenoles totales.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	48.82448	2	24.41224	125.86215	3.88529
Dentro de grupos	2.32752	12	0.19396		
Total	51.15201	14			

Tabla 15. Análisis de varianza del efecto de la variedad de café en la capacidad antioxidante.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	21.60132	2	10.80066	8.22615	5.14325
Dentro de grupos	7.87779	6	1.31297		
Total	29.47911	8			

Tabla 16. Análisis de varianza del efecto de la variedad de café en el contenido de ácido clorogénico.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	0.75236	2	0.37618	261.72044	5.14325
Dentro de grupos	0.00862	6	0.00143		
Total	0.76099	8			

Para la tres ANOVAS dado que el valor crítico para F es menor al calculado, se puede decir que hay por lo menos una variedad de café que tiene un contenido de polifenoles significativamente diferente al resto.

Posteriormente derivado de los resultados de la ANOVA y de encontrar una diferencia significativa para el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y ácido clorogénico, se procedió a realizar una prueba de Bonferroni para determinar cuáles muestras son estadísticamente diferentes. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Resultado de la prueba de Bonferroni para el efecto de la variedad del café en los parámetros evaluados. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.

Parámetro	Variedad de café		
	Marsellesa	Bourbon	Geisha
Polifenoles totales	A	B	C
Capacidad Antioxidante	A	AB	B
Acido clorogénico	A	B	C

El contenido de polifenoles y ácido clorogénico influyen de manera directa en la capacidad antioxidante de la muestra, dado que el potencial antioxidante de los alimentos está directamente relacionado con la presencia de compuestos bioactivos en la matriz alimentaria. (Benítez-Estrada, et al, 2020), como lo son en este caso los polifenoles, es decir, entre mayor sea el contenido de polifenoles , mayor será la capacidad antioxidante del café.

De la figura 23 y la tabla 17 se puede apreciar que existe una diferencia entre las tres variedades de café en cuanto al contenido de polifenoles y de ácido clorogénico; de mayor a menor, el contenido en las variedades de café es Marsellesa, Bourbon, Geisha.

En la tabla 17 se puede apreciar que la capacidad antioxidante de la variedad bourbon es similar a la de las variedades geisha y marsellesa, pero es diferente entre estas últimas dos. De la figura 23 se observa que la variedad marsellesa presenta un mayor efecto antioxidante con respecto a geisha.

Las diferencias en el contenido de polifenoles y ácido clorogénico, así como en la capacidad antioxidante asociadas a la variedad del café, se deben a que genéticamente cada variedad es diferente y por lo tanto afecta directamente en la composición química final de los granos de café verde, y posteriormente durante el tostado dicha composición afectara en la cantidad y tipo de productos que se formarán, aunque también contribuye en gran medida el lugar y condiciones del cultivo. (Internacional Centro de Comercio, 2022).

De las tres variedades, geisha es la que menos propiedades antioxidantes presenta; en cuanto a marsellesa y bourbon, si bien el contenido de polifenoles y ácido clorogénico es mayor en Marsellesa, el efecto antioxidante total no difiere con respecto a Bourbon, por lo que, la elección de la variedad de café que se quiera consumir, se podría inclinar a la variedad Bourbon, debido a que es una de las que más dominan en el mercado y está asociada a una alta calidad de la taza. Aunque las variedades geisha y marsellesa están asociadas con mejores características organolépticas en la cata; también es cierto que su costo en el mercado es superior, debido a que su cultivo requiere algunas condiciones específicas, y como ya se ha mencionado anteriormente sus características antioxidantes no son excepcionales.

Efecto del tipo de beneficiado de la cereza del café en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de las muestras.

Para evaluar el efecto del beneficiado en el grano se tomaron muestras de la variedad Bourbon y Geisha., beneficiados de tres maneras (natural, lavado y honey) y todos tostados al 14%. El primer análisis que se realizó fue para las muestras Bourbon natural, Bourbon lavado y Bourbon honey. Posteriormente se

analizaron las muestras Geisha natural, Geisha lavado y Geisha honey. Esto con el fin de ver el efecto del beneficiado independientemente de la variedad.

En la figura 24 se muestra la representación gráfica de las muestras analizadas para evaluar el efecto del beneficiado en la variedad Bourbon, en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico.

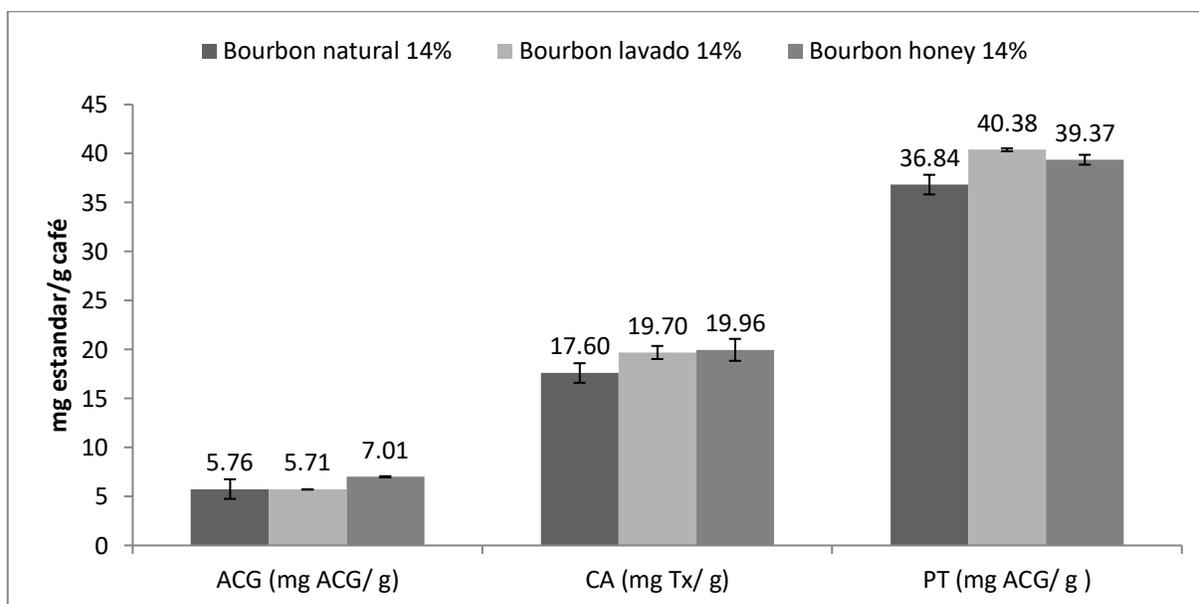


Figura 24. Efecto del beneficiado en el contenido de polifenoles (PT), ácido clorogénico(ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café bourbon; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.

En la tablas 18, 19 y 20 se muestran los resultados de la ANOVA realizadas para analizar el efecto del tipo de beneficiado en el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y ácido clorogénico, respectivamente, para la variedad Bourbon.

Tabla 18. Efecto del tipo de beneficiado en el contenido de polifenoles totales en la variedad Bourbon.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	Valor F calculado	Valor critico de F
Entre grupos	33.35882	2	16.67941	113.82010	3.88529
Dentro de grupos	1.75850	12	0.14654		
Total	35.11732	14			

Tabla 19. Efecto del tipo de beneficiado en la capacidad antioxidante para la variedad Bourbon

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Entre grupos	10.04500	2	5.02250	3.57185	5.14325
Dentro de grupos	8.43679	6	1.40613		
Total	18.48179	8			

Tabla 20. Efecto del tipo de beneficiado en el contenido de ácido clorogénico para la variedad Bourbon

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Entre grupos	3.23483	2	1.61742	1117.63511	5.14325
Dentro de grupos	0.00868	6	0.00145		
Total	3.24351	8			

Con estos resultados se puede concluir que el tipo de beneficiado afecta el contenido de polifenoles totales y ácido clorogénico, dado que el valor F calculado es mayor al valor crítico, habiendo una diferencia significativa en al menos dos de los procesos; sin embargo, para la capacidad antioxidante el valor crítico de F es mayor al valor calculado, por lo que no existe una diferencia en la capacidad antioxidante asociada al tipo de beneficiado para la variedad Bourbon.

Posteriormente derivado de los resultados de la ANOVA y de encontrar una diferencia significativa en el contenido de polifenoles y ácido clorogénico, se procedió a realizar una prueba de Bonferroni para determinar cuáles muestras son estadísticamente diferentes. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la prueba de Bonferroni para el efecto del beneficiado en la variedad Bourbon. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.

Parámetro	Bourbon natural Bourbon lavado Bourbon honey		
	Beneficiado		
Polifenoles totales	A	B	C
Ácido clorogénico	A	A	B

De la tabla 21 y la figura 24 se observa que el contenido de polifenoles es diferente con cada tipo de beneficiado; siendo el método natural el que otorga la menor cantidad de polifenoles, esto se debe a la simpleza del método, pues el secado no es uniforme y si bien existe una fermentación intrínseca en el grano las condiciones bajo las que se desarrolla no son favorables para la ruptura enzimática de las capas en las que se encuentran los compuestos de interés; y en parte a su dependencia de las condiciones medioambientales, además de que en el despulpado se retiran capas de la cereza que podrían tener compuestos polifenólicos, lo que deja al grano con pocos polifenoles, que posteriormente se destruyen durante el tostado.

El método que aporta un mayor contenido de polifenoles es el lavado. El método honey aporta una menor cantidad de polifenoles que el método lavado, esto tiene que ver con las etapas de cada proceso. Por el método honey se queda en el grano una capa de mucílago rica en azúcares que durante el tostado genera polímeros que no poseen estructuras fenólicas, mientras que por el método lavado al no existir esa capa se generan productos que conservan la estructura fenólica.

En la tabla 21 se observa que el contenido de ácido clorogénico no es diferente por los métodos natural y lavado, pero si por el método honey. En la figura 24 es notorio que el beneficiado honey es el que conserva una mayor cantidad de ácido clorogénico, esto se puede asociar con las capas que no son removidas del grano

del café y que de alguna manera protegen el ácido clorogénico de las reacciones en las que pueda llegar a degradarse durante la etapa del tostado.

El segundo análisis fue para el tipo de beneficiado en la variedad Geisha. En la figura 25 se muestra la representación gráfica de las muestras analizadas para evaluar el efecto del grado del beneficiado en la variedad Geisha, en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico.

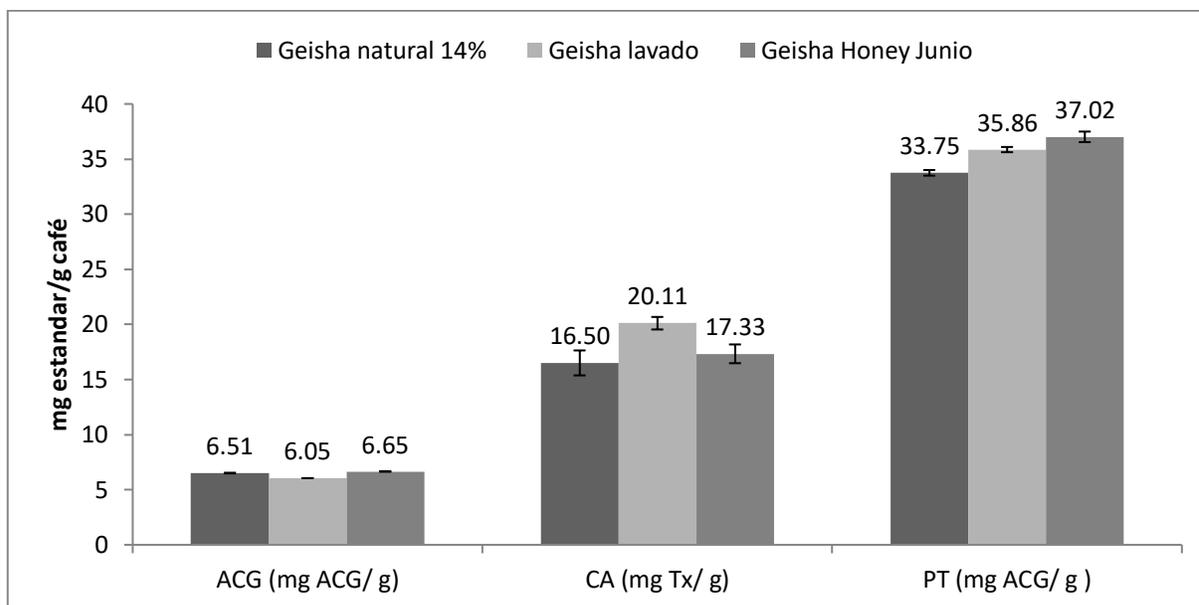


Figura 25. Efecto del beneficiado en el contenido de polifenoles (PT) totales, ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café geisha. Usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.

De la figura 25 se observa para la variedad geisha un comportamiento según lo esperado en cuanto al contenido de polifenoles, siendo de menor a mayor: natural, lavado, honey. Esto cambia para la capacidad antioxidante donde el lavado es el que tiene un mayor valor esto se debe a que este café proviene de una finca diferente al resto y fue adicionado con microorganismos, y contrastando con que el contenido de ácido clorogénico es el menor de los tres métodos, se deduce que este café en particular posee un grupo de compuestos que le otorgan una capacidad antioxidante superior.

En la tablas 22, 23 y 24, se muestran los resultados de la ANOVA realizadas para analizar el efecto del tipo de beneficiado en el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y ácido clorogénico, respectivamente.

Tabla 22. Análisis de varianza del efecto del beneficiado en el contenido de polifenoles totales en la variedad Geisha

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	27.37626	2	13.68813	117.63972	3.88529
Dentro de grupos	1.39627	12	0.11635		
Total	28.77253	14			

Tabla 23. Análisis de varianza del efecto del beneficiado en la capacidad antioxidante en la variedad Geisha

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	21.3741717	2	10.6870859	13.72956	5.14325
Dentro de grupos	4.67039647	6	0.77839941		
Total	26.0445682	8			

Tabla 24. Análisis de varianza del efecto del beneficiado en el contenido de ácido clorogénico en la variedad Geisha

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	0.59859	2	0.29929	878.63683	5.14325
Dentro de grupos	0.00204	6	0.00034		
Total	0.60064	8			

Derivado del resultado de las ANOVA realizadas para la variedad Geisha, para el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y ácido clorogénico, dado que el

valor F calculado es mayor al valor crítico de F, se concluye que existe una diferencia entre al menos dos muestras.

Posteriormente se realiza una prueba de Bonferroni para determinar entre que muestras de café Geisha existe una diferencia significativa. En la tabla 25 se muestran los resultados de la prueba.

Tabla 25. Resultados de las pruebas de Bonferroni para evaluar el efecto del beneficiado en la variedad Geisha. Las muestras que compartan la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.

Parámetro	Geisha natural	Geisha lavado	Geisha honey
Polifenoles totales	A	B	C
Capacidad antioxidante	A	B	A
Ácido clorogénico	A	B	C

De la tabla 25 se aprecia que el contenido de polifenoles y ácido clorogénico es diferente dependiendo del tipo de beneficiado de la cereza, y que la capacidad antioxidante solo es diferente en el café lavado.

El hecho de que la muestra lavada sea diferente a las demás deja ver del efecto de la adición de microorganismos, derivado del metabolismo de microorganismos cambian las características y composición del grano, a los cuales se les atribuye el incremento en el efecto antioxidante.

Excepto por la muestra lavada, Geisha presenta un comportamiento similar a Bourbon en cuanto al efecto del tipo de beneficiado

De los análisis realizados para ambas variedades se puede decir que el tipo de beneficiado si afecta la cantidad de polifenoles y ácido clorogénico que se generan, sin embargo, también se puede notar que no afecta la capacidad antioxidante, si bien para la variedad geisha podría no ser tan notorio hay que recordar que geisha lavado ha sido adicionada con microorganismos y proviene de

un lugar diferente, pero se puede notar que aquellas muestras que fueron producidas en el mismo lugar y bajo las mismas condiciones, no presentan diferencias.

El contenido de polifenoles, varía debido al tipo de beneficiado, porque el proceso en sí es distinto. Las principales etapas que influyen en la composición del grano antes del tostado son: el secado ya sea al sol o en equipos de secado; las capas que se le retiran al grano, mientras que el método natural retira varias capas que pueden contener polifenoles, el método honey deja una capa rica en azúcares; y la fermentación implícita que cada beneficiado conlleva.

La composición del grano verde influye en las reacciones que se dan durante el tostado, definiendo así la cantidad y tipo de productos que se generaran. (Córdoba Castro & Guerrero Fajardo, 2016).

Las condiciones como la temperatura del aire, la calidad del agua que se usa, la higiene, el tipo de fermentación ya sea abierta o cerrada, sólida (para el caso del método natural y honey) o sumergida (para el método lavado) y la cantidad de sustrato disponible. (Puerta Quintero & Echeverry Molina José Gustavo, 2015), son factores que impactan el contenido de sustancias antioxidantes en el grano de café.

Por el método honey se conserva mayor cantidad de ácido clorogénico, pues de alguna manera la capa de mucílago en el grano lo protege de la degradación durante el tostado.

Efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de las muestras

Para evaluar el efecto del tostado se tomaron muestras de Bourbon honey, y Bourbon Lavado; tostados en tres diferentes grados: 14%, 20% y 26%. Se realizaron dos análisis, el primero para las muestras Bourbon honey y el segundo con las muestras Bourbon lavado, a los distintos grados de tostado.

En la figura 26 se muestra la representación gráfica de las muestras analizadas para evaluar el efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico de café bourbon honey.

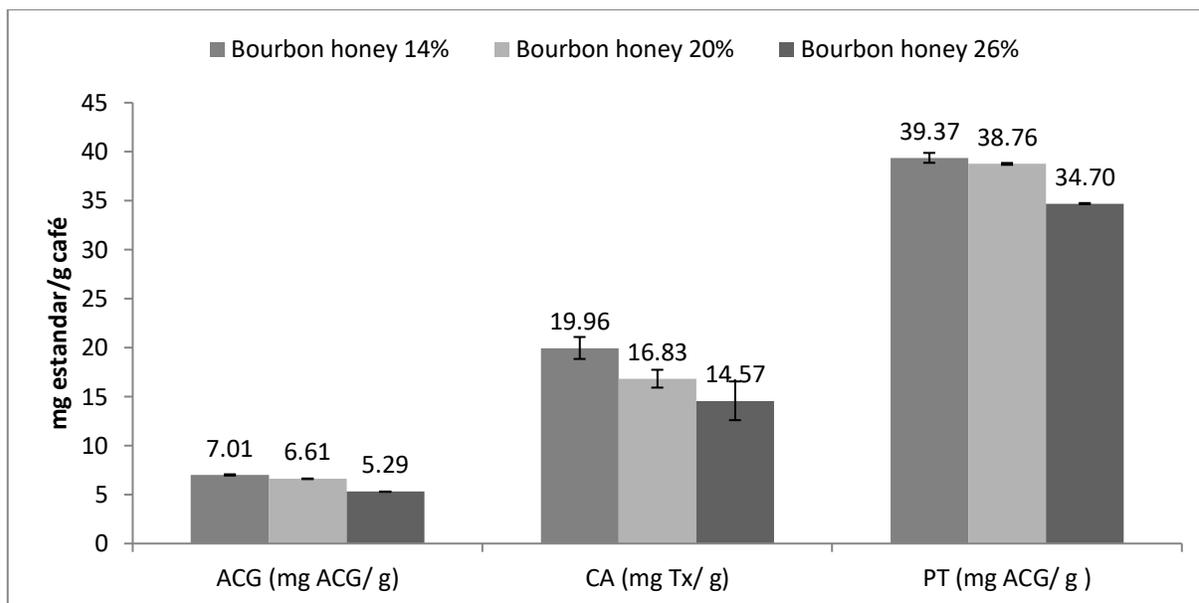


Figura 26. Efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles (PT) totales, ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café bourbon honey; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.

En la figura 26 se observa que el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y ácido clorogénico, disminuyen al incrementar el grado de tostado, lo que significa que los polifenoles y demás compuestos que contribuyen a la capacidad antioxidante se degradan por acción de la temperatura.

En la tablas 26, 27 y 28 se muestran los resultados de las ANOVA realizadas para determinar el efecto del grado de tostado en la variedad Bourbon Honey.

Tabla 26. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de polifenoles totales en Bourbon Honey

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Entre grupos	64.37465	2	32.18733	360.40150	3.88529
Dentro de grupos	1.07172	12	0.08931		
Total	65.44637	14			

Tabla 27. Análisis de varianza del efecto del tostado en la capacidad antioxidante en Bourbon Honey

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Entre grupos	43.98792	2	21.9939614	11.03251	5.14325
Dentro de grupos	11.96135	6	1.99355865		
Total	55.94927	8			

Tabla 28. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de ácido clorogénico en Bourbon Honey

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Entre grupos	4.82490	2	2.41245	1342.43799	5.14325
Dentro de grupos	0.01078	6	0.00179		
Total	4.83568	8			

De la ANOVA realizada para evaluar el efecto del tostado en la Bourbon Honey, podemos observar para el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y ácido clorogénico que, dado que el valor F calculado es mayor al valor crítico, existe una diferencia significativa para al menos dos muestras, por lo tanto el grado de tostado si afecta en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante.

Posteriormente derivado de los resultados de la ANOVA y de encontrar una diferencia significativa para el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante, se procedió a realizar una prueba de Bonferroni para determinar cuáles muestras son estadísticamente diferentes. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Resultados de las pruebas de Bonferroni del efecto del tostado en Bourbon Honey. Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.

Parámetro	Bourbon honey 26%	Bourbon honey 20%	Bourbon honey 14%
Polifenoles totales	A	B	C
Capacidad antioxidante	A	A	B
Ácido clorogénico	A	B	C

De acuerdo con la tabla 29, el contenido de polifenoles y ácido clorogénico es significativamente diferente, es decir, que el nivel de tostado si afecta de manera importante en la composición del grano, esto debido a las diferentes condiciones de tiempo y temperatura que requiere cada grado de tostado; en cuanto a capacidad antioxidante no se nota una diferencia entre el tostado al 26% y el tostado al 20 %, pero estos si son diferentes al tostado al 14%.

El segundo análisis para evaluar el efecto del grado de tostado, se realizó en bourbon lavado, En la figura 27 se muestra la representación gráfica de las muestras analizadas para evaluar el efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico de café bourbon lavado.

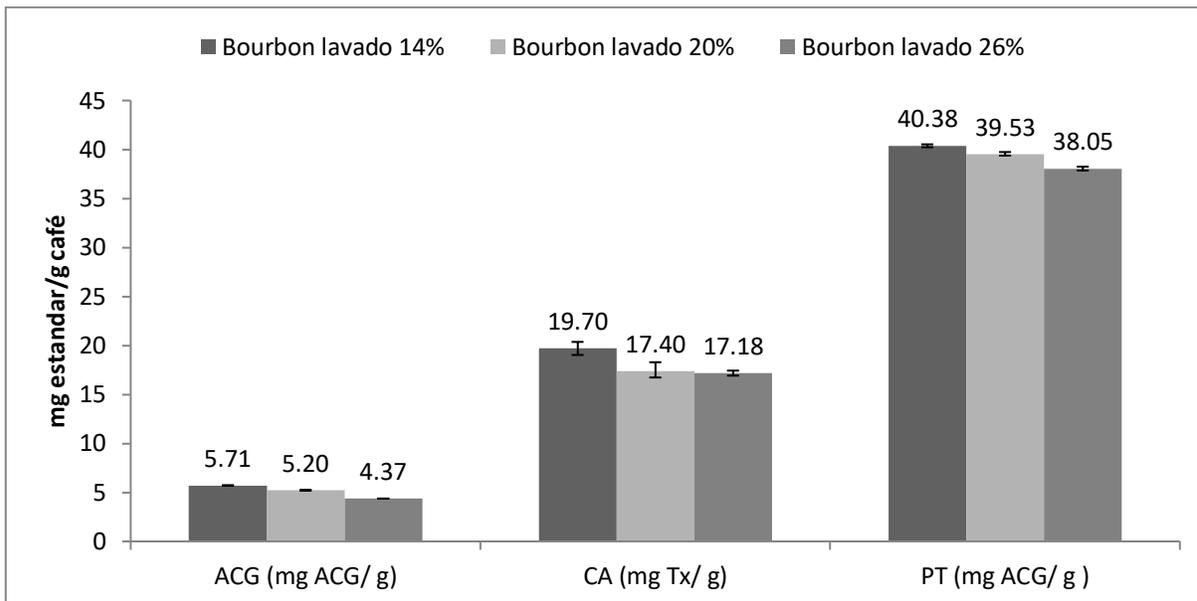


Figura 27. Efecto del grado de tostado en el contenido de polifenoles totales (PT), ácido clorogénico (ACG) y capacidad antioxidante (CA) en café bourbon lavado; usando estándar de ácido clorogénico para PT Y ACG y estándar Trolox para CA.

En la figura 27 se puede ver que el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante disminuyen al aumentar el grado de tostado, en cuanto a capacidad antioxidante la diferencia notable es entre los tostados al 26% y 14%.

En las tablas 30, 31 y 32 se muestran los resultados de las ANOVA realizadas para determinar el efecto del grado de tostado en la variedad Bourbon Lavado.

Tabla 30. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de polifenoles totales en bourbon Lavado

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	13.90969	2	6.95485	195.32199	3.88529
Dentro de grupos	0.42728	12	0.03561		
Total	14.33698	14			

Tabla 31. Análisis de varianza del efecto del tostado en la capacidad antioxidante en Bourbon lavado

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	11.67063	2	5.83531825	13.41443	5.14325
Dentro de grupos	2.61002	6	0.43500291		
Total	14.28065	8			

Tabla 32. Análisis de varianza del efecto del tostado en el contenido de ácido clorogénico en Bourbon lavado

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre grupos	2.75649	2	1.37825	3571.73108	5.14325
Dentro de grupos	0.00232	6	0.000386		
Total	2.75881	8			

De las ANOVAS realizadas para evaluar el efecto del tostado en Bourbon lavado, podemos observar para todos los parámetros que, dado que el valor F calculado es mayor al valor crítico, existe una diferencia significativa para al menos dos muestras, por lo tanto el grado de tostado afecta en el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante.

Posteriormente derivado de los resultados de la ANOVA y de encontrar una diferencia significativa para el contenido de polifenoles, ácido clorogénico y capacidad antioxidante, se procedió a realizar una prueba de Bonferroni para determinar cuáles muestras son estadísticamente diferentes. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 33.

Tabla 33. Resultados de las pruebas de Bonferroni del efecto del tostado en Bourbon lavado
Las muestras que comparten la misma letra no son diferentes entre sí, las que tienen una letra diferente son significativamente diferentes.

Parámetro	Bourbon	Bourbon	Bourbon
Grado de tostado	lavado 26%	lavado 20%	lavado 14%
Polifenoles totales	A	B	C
Capacidad antioxidante	A	AB	B
Ácido clorogénico	A	B	C

En la tabla 33 se aprecia que el contenido de polifenoles y ácido clorogénico es significativamente diferente, es decir, que el nivel de tostado afecta de manera importante en la composición del grano, esto debido a las diferentes condiciones de tiempo y temperatura que se requieren cada grado de tostado; en cuanto a capacidad antioxidante no se nota una diferencia entre el tostado al 26% y el tostado al 20 %, y entre los tostados al 20% y al 14%, esto es entre niveles de tostado semejantes, la capacidad antioxidante no se ve afectada, pero cuando la diferencia entre las condiciones que sufre el grano es más drástica, se nota esta diferencia como es el caso los tostados al 26% y el 14%.

Al aumentar el grado de tostado el contenido de polifenoles, se ve disminuido y con ello la capacidad antioxidante.

Debido a que el grado de tostado depende del tiempo y la temperatura, al aumentar estos, la degradación de polifenoles incluido el ácido clorogénico es mayor, y se puede observar en las figuras 26 y 27, que su contenido disminuye a medida que aumenta el grado de tostado. Un comportamiento similar se nota en la capacidad antioxidante, pero para los grados de tostado similares no se observa diferencia significativa.

Las múltiples reacciones químicas que ocurren durante el tostado (reacciones de Maillard, caramelización y degradación de Strecker, degradación de polifenoles, polimerización de carbohidratos y pirolisis) que ocurren durante el tostado afectan la composición del grano de café, por lo que, al aumentar el tiempo y temperatura

necesarios para cada nivel de tostado, los polifenoles que tienen una estructura molecular termolábil se descomponen debido a los procesos de alta temperatura. El contenido de polifenoles puede variar con el tostado incrementando o disminuyendo, según diversos autores, estos resultados contradictorios pueden ser atribuidos a los diferentes orígenes, condiciones climáticas y los diferentes contenidos de polifenoles en el grano verde. (Dippong, et al, 2022)

Las melanoidinas de bajo peso molecular que se forman durante el tostado pueden compensar la disminución de la capacidad antioxidante debida a la degradación del ácido clorogénico libre. Sin embargo los componentes no fenólicos de bajo peso molecular tienen poca actividad antioxidante en comparación con los compuestos fenólicos, esto indica que los compuestos fenólicos formados durante el tostado son importantes porque pueden compensar la disminución de la capacidad antioxidante, debida a la degradación progresiva de compuestos fenólicos al aumentar el tostado. (Liao, et al, 2022)

El tostado es un proceso muy complejo, donde lo que se degrada principalmente son los azúcares y los polifenoles destacando el ácido clorogénico; la degradación de polifenoles es mayor mientras mayor sea el tiempo y la temperatura del tostado. (Diviš, et al, 2019).

Tabla 34. Resumen de resultados, los tipos de café se presentan de un mayor a menor contenido en polifenoles totales, ácido clorogénico y capacidad antioxidante, y se especifica aquellos que no mostraron una diferencia estadísticamente significativa.

Variable Parámetro evaluado		Polifenoles totales	Ácido clorogénico	Capacidad antioxidante
Variedad		Marsellesa>bourbon > geisha	Marsellesa>bourbon > geisha	Marsellesa>geisha; bourbon es idéntica a las dos anteriores.
Beneficiado	Bourbon	Lavado>honey>natural	Honey>natural>lavado	Todos idénticos.
	Geisha	Honey>lavado>natural	Honey>natural>lavado.	Lavado>honey; natural es idéntico a honey.
Tostado	Bourbon Honey	14%> 20%>26%.	14%>20%>26%.	14%>20%; el tostado al 26% es idéntico al tostado al 20%.
	Bourbon Lavado	14%>20%>26%.	14%>20%>26%.	14%>26%; el tostado al 20 % es idéntico a los tostados al 14% y 26%

CONCLUSIONES

Se cuantificó con éxito el contenido de polifenoles totales, ácido clorogénico y capacidad antioxidante de *Coffea arabica*, de variedades Bourbon Geisha y Marsellesa que pasaron por distinto proceso de beneficiado y en varios grados de tostado

El contenido de compuestos antioxidantes, en particular los polifenoles totales y el ácido clorogénico, están estrechamente relacionados con la capacidad antioxidante que puede ofrecer un grano de café, y esto a su vez se ve afectado en primera instancia por la variedad de café. En este estudio el café que mayor efecto antioxidante demostró es la variedad Marsellesa; sin embargo, es decisión del consumidor el tipo de café que desee consumir, pues no solo la variedad, sino que también el tipo de beneficiado que recibe la cereza del café y el grado de tostado, influyen en las características del producto final

El método honey es el que permite conservar una mayor cantidad de ácido clorogénico, aunque no hay el mismo comportamiento para polifenoles totales.

En los métodos de producción tradicionales entre mayor sea el contenido de polifenoles, mayor será la capacidad antioxidante, sin embargo, cuando el método no es tradicional, ejemplo el café de especialidad en el que se modifica alguna etapa de proceso para otorgar características específicas a la taza de café, se pueden generar una variedad compuestos no necesariamente fenólicos con una capacidad antioxidante mayor.

Bibliografía

Álvarez Parrilla, E., de la Rosa, L. A., González Aguilar, G. A., & Ayala Zavala, J. F. (2012). *Antioxidantes en alimentos y salud*. México: Clave.

Árvay, J., Šnirc, M., Hauptvogel, M., Bilčíková, J., Bobková, A., Demková, L., y otros. (2018). Concentration of Micro- and Macro-Elements in Green and Roasted Coffee: Influence of Roasting Degree and Risk Assessment for the Consumers. *Biological Trace Element Research* , 226–233.

Astiasarán, I., & Martínez, A. (2003). *Alimentos. Composición y propiedades*. Madrid: Mc Graw Hill.

Awwad, S., Issa, R., Alnsour, L., Albals, D., & Al-Momani, I. (2021). Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and. *molecules* , 26 (7502).

Ayelnig, A., & Sabally, K. (2013). Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans using HPLC. *American Journal of Research Communication* , 1(2): 78-91.

Badui, S. D. (2013). *Química de los alimentos*. México: Pearson.

Bartosz, G. (2014). *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological, and Functional Properties*. Nueva York: CRC press.

Bautista, M. K. (2016). Perspectiva actual de los polifenoles en México. *Entre textos* , 21.

Belguidoum, K., Amira Guebailia, H., Boulmouk, Y., & Houache, O. (2014). HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* , 1314–1320.

Belitz. (2009). *Food chemistry*. Alemania: Springer.

Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Coffee, tea, cocoa. In H. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle, *Food chemistry* (pp. 938-950). Berlín: Springer.

Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* , 1-9.

- Breciani, L., Calani, L., Bruni, R., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2014). Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, 61 , 196-201.
- Cañizares Macías, M. P. (2002). Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Sociedad Química de México*, 46(2) , 167-174.
- Carnoma, A. (mayo de 2020). *Altosanto café*. Recuperado el 15 de octubre de 2022, de ¿Que es un honey?: <https://www.altosanto.mx/que-es-un-honey/>
- Cases, V., & de Castro, L. (1984). *Análisis por inyección en flujo*. Cordoba: San Pablo.
- Castillo Morales, A. (2013). *Estadística aplicada*. México: Trillas.
- CEDRSSA. (Marzo de 2018). *El café en México Diagnóstico y perspectivas*. Recuperado el 3 de Octubre de 2022, de <http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/30El%20caf%C3%A9%20en%20M%C3%A9xico:%20diagn%C3%B3stico%20y%20perspectiva.pdf>
- Cho, A. R., Park, K. w., Kim, K. M., Kim, S. Y., & Han, j. (2014). Influence of the roasting conditions on the antioxidant characteristics of colombian coffe (Coffea arabica L.) beans. *Journal of food biochemistry*, 38 , 271-280.
- Córdoba Castro, N. M., & Guerrero Fajardo, J. E. (2016). Caracterizacion de los procesos tradicionales de fermentacion de café en el departamento de Nariño. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* , 75-83.
- Craig, A. P., Fields, C., Liang, N., Kitts, D., & Erickson, A. (2016). Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of clorogenics acids in green coffee bean extracts. *Talanta* , 481-485.
- Dippong, T., Dan, M., Haydee Kovacs, M., Dalma Kovacs, E., Andrea Levei, E., & Cadar, O. (2022). Analysis of Volatile Compounds, Composition, and Thermal Behavior of Coffee Beans According to Variety and Roasting Intensity. *Foods* , 11 (3146).
- Diviš, P., Pořízka, J., & Jakub Kříkala, J. (2019). THE EFFECT OF COFFEE BEANS ROASTING ON ITS CHEMICAL COMPOSITION. *Food Sciences* , 344-350.
- Duarte, S., Abreu, C., Menezes, H., Santos, M., & Gouvea, C. (2005). Effect of processing and roasting onthe antioxidant activity of coffee brews. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 25(2) , 387-393.

- E Freund, J. (2000). *Estadística matemática con aplicaciones*. México: Pearson.
- Escutia, L. (2011). *Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles en uva*. Tesis de licenciatura: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. España : Acribia.
- Folch Cano, C., Jullian, C., Speisky, H., & Olea Azar, C. (2010). Antioxidant activity of inclusion complex of tea catechin with B-cyclodextrins by ORAC assay. *Food Research International*, 43 , 2039-2044.
- Galanakis, C. M. (2017). *Handbook of Coffee Processing By-Products: sustainable applications*. London: Academic Press.
- García, F. J., Escamilla, E., Zamarripa Colmenero, A., & Cruz Castillo, G. (2016). Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) en Veracruz, México. *Fitotec*, 39(3) , 297-304.
- Geremu, M., Bekele Tola, Y., & Sualeh, A. (2016). Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and biological technologies in agriculture*, 3 (25) .
- Hecimovic, I., Belcak-Cvitanovic, A., Horzic, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food chemistry*, 129 , 991-1000.
- ICO. (2022). *ICO*. Recuperado el 10 de Octubre de 2022, de Historia del café: https://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp#:~:text=El%20caf%C3%A9%20leg%C3%B3%20primero%20a,mundo%2C%20en%20las%20Blue%20Mountains.)
- Internacional Centro de Comercio. (2022). *La Guía del Café, Cuarta edición*. Ginebra: ITC.
- Jeon, J.-S., Kim, H.-T., Jeong, I.-H., Hong, S.-R., Oh, M.-S., Park, K.-H., y otros. (2017). Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee. *Journal of Chromatography B* , 115-123.
- Jiménez Morales, W. A. (2022). *Desarrollo de metodologías analíticas de flujo continuo para determinación de capacidad antioxidante*. México.
- Kwak, H., Jeong, Y., & Kim, M. (2018). Effect of yeast fermentation of green coffee beans on antioxidant activity and consumer acceptability. *Journal of food quality* .

- Liao, Y.-C., Kim, T., Silva, J. L., Hu, W.-Y., & Chen, B.-Y. (2022). Effects of roasting degrees on phenolic compounds and antioxidant activity in coffee beans from different geographic origins. *LWT* (168).
- Macrae, R. C. (1989). *Coffee Vol.1 Chemistry*. New York: Elsevier.
- Marín García, C., & Puerta Quintero, G. I. (2008). Contenido de ácidos clorogénicos en granos de *Coffea arabica* y *C. canephora*, según el desarrollo de fruto. *Cenicafe* , 7-28.
- Marques de Cantú, M. J. (1998). *Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas*. México: Mc Graw Hill.
- Martín, R., Anaya, M., Marante, O., & Duarte, C. (2015). Comportamiento de la actividad antioxidante de las infusiones de café de consumo para la población cubana. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 25(2) , 28-33.
- Mercado Mercado, G., de la Rosa Carrillo, L., Wall Medrano, A., López Díaz, J. A., & Álvarez Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria* , 36-46.
- Morales, L. C. (2020). *Evaluación de antioxidantes en granos de café arabica (Coffea arabica) con diferentes grados de tostado*. Tesis de licenciatura: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Niseteo, T., Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Horzic, D., & Budec, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food chemistry*, 134 , 1870-1877.
- Ou, B., Hampsch Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 , 4619-4626.
- Petrozzi, S., Wieland, F., Gloess, A., D'Ambrosio, L., & Yeretzyan, C. (2011). Flow Injection Analysis for the direct quantification of the total polyphenol content in coffee brews. *Journal of Flow Injection Analysis*, 28(1) , 23-28.
- Puerta Quintero, G. I., & Echeverry Molina, J. G. (2015). Fermentación controlada del café, tecnología para agregar valor a la calidad. *cenicafe* , 1-12.
- Quintero Rizzuto, M. L., & Rosales, M. (2014). El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad. *Visión gerencial* , 291-307.

Quintero, G. I. (2012). *Factores, procesos y controles en la fermentación del café*. Caldas: Cenicafe.

Rizzuto, Q., & Rosales, M. L. (2014). El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad. *Visión gerencial*, 2 , 291-307.

Rojano, B., Zapata, I. C., & Cortes, F. B. (2012). Estabilidad de antocianinas y valores de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) de extractos acuosos de corozo (*Bactris guineensis*). *Revista cubana de plantas medicinales*, 17(3) , 244-255.

Ross Watson, R. (2014). *Polyphenols in plants. Isolation, purification and extract preparation*. Arizona: Academic Press- Elsevier.

Ruzicka, J. (2019). *FLOW INJECTION ANALYSIS*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2022, de Theory:
<https://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.0.html>

Ruzicka, J. (2019). *FLOW INJECTION ANALYSIS*. Recuperado el 10 de noviembre de 2022, de Methods:
<https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods.html>

SAGARPA. (2017). *Café mexicano. Planeación agrícola nacional 2017-2030* .

Santos, C., & Silva, A. (2020). The Antioxidant Activity of Prenylflavonoids. *Molecules* , 696-729.

Smrke, S., E.W. Opitz, S., Vovk, I., & Yeretian, C. (2013). How does roasting affect the antioxidants of a coffee brew? exploring the antioxidant capacity of coffee via on-line antioxidant assay coupled with size exclusion chromatography. *Food&Function*, 4 , 1082-1092.

Vega, A., De León, J., & Reyes, S. (2017). Determinación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de 34 cafés comerciales de Panamá. *Información tecnológica*. 28(4) , 29-38.

Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Oxidative Stress. *CCM* , 171-186.

Vitzhum, R. C. (2001). *Coffee. Recent Developments*. Iowa: Blackwell Science.

Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food frontiers* , 60-69.

Zapata, s., Piedrahita, A. M., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*, 16 , 25-36.