



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN
GRANOS DE CAFÉ ARABICA (*COFFEA ARABICA*)
CON DIFERENTES GRADOS DE TOSTADO**

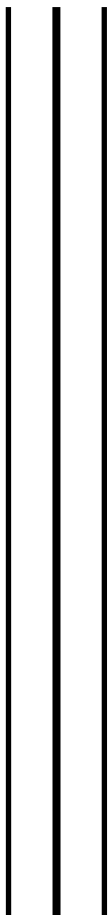
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA :

LORENA CASTRO MORALES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María del Pilar Cañizares Macías

VOCAL: Profesor: Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: Profesor: Iliana Elvira González Hernández

1er. SUPLENTE: Profesor: Harlem Haydee Cruz Bailon

2° SUPLENTE: Profesor: Evangelina Camacho Frias

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

SUPERVISOR TÉCNICO

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

Castro Morales Lorena

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
Hipótesis:	5
OBJETIVOS.....	5
Objetivo general:.....	5
Objetivos específicos:	5
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1 Generalidades del café	6
1.2 Anatomía del fruto.....	7
1.3. Desarrollo de la planta de café.	8
1.4. Producción de café	8
1.4.1. Producción mundial de café.....	8
1.4.2. Producción nacional de café	9
1.5. Café verde o crudo.	10
1.5.1. Composición del café verde.....	11
1.6. Procesamiento del café.	12
1.7. Café tostado.....	14
1.7.1. Café honey	15
1.7.2. Cambios en el tostado	15
1.7.3. Principales reacciones durante el tueste de café.....	16
1.7.4. Composición del café tostado.....	17
1.8. Ácidos clorogénicos en el café.....	18
1.8.1. Ácidos clorogénicos en el café verde.....	19
1.8.2. Ácidos clorogénicos en el café tostado.....	20
1.9. Polifenoles	21
1.9.1. Clasificación de polifenoles.....	22
1.9.2. Polifenoles en los granos de café	23
1.10. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	23
1.10.1. Extracción por métodos tradicionales	24

1.10.2. Extracción por métodos no tradicionales.	24
1.10.2.1. Ultrasonidos	24
1.11. Determinación de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu	26
1.11.1. Espectroscopía	27
1.12. Estrés oxidativo, radicales libres y antioxidantes	28
1.12.1. Capacidad antioxidante de polifenoles	29
1.12.2. Actividad antioxidante de los CGAs (ácidos clorogénicos)	30
1.13. Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....	30
1.13.1. Método ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno).....	31
1.14. Análisis por inyección en flujo (FIA)	32
1.14.1. Instrumentación del sistema FIA.....	33
2. METODOLOGÍA	37
2.1 Materiales, instrumentos y reactivos.....	37
2.2 . Preparación de disoluciones:	38
2.3. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	40
2.4. MUESTRAS ANALIZADAS.....	41
2.4.1. Café en grano verde, tostado y bourbon.....	41
2.4.2. Preparación de las muestras	41
2.5.MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	42
2.5.1. Maceración utilizando cafetera de prensa francesa.....	42
2.5.3. Ultrasonido y calentamiento.....	42
2.5.3.1. Optimización de la extracción por ultrasonido. Diseño de experimentos.	42
2.6. Determinación de polifenoles totales en granos de café verde, tostado y bourbon.	45
2.6.1. Configuración del sistema Folin-Ciocalteu- FIA	45
2.6.2 Curva de calibración de ácido clorogénico y ácido cafeico para la determinación de polifenoles totales.....	46
2.7. Determinación de la capacidad antioxidante en granos de café verde, tostado y bourbon lavado y honey	46
2.7.1. Configuración del sistema ORAC-FIA.....	46

2.7.2. Optimización del método ORAC-FIA.	47
2.7.3. Elaboración de la curva de calibración de trolox para la determinación de la capacidad antioxidante	50
2.8. Determinación de ácido clorogénico en los extractos de café por HPLC-DAD.....	50
3. Resultados y discusión de resultados 3.1. Curvas de calibración de ácido clorogénico y ácido cafeico por Folin-Ciocalteu.....	53
3.2. Optimización del método ORAC-FIA.	55
3.2.2. Optimización del sistema ORAC-FIA.	56
3.2.3. Curva de calibración de trolox por ORAC.	60
3.3. Evaluación de los métodos de extracción.....	61
3.4. Extracción por maceración en cafetera de prensa francesa.	62
3.4.2. Extracción por maceración con agitación magnética.	65
3.4.3. Diseño de experimentos para optimizar las condiciones de extracción por ultrasonido.	68
3.4.4 Extracción de muestras de café por ultrasonido.	69
3.4.5 Comparación de las extracciones por ultrasonido	70
3.6. Contenido de ácido clorogénico obtenida por HPLC-DAD en las distintas variedades de café tostado.....	74
3.7. Composición de los extractos de café verde y tostado por HPLC-DAD.....	79
3.8. Efecto de tiempo de tostado en la concentración de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico en la muestra.....	80
4. Conclusiones	82
5. BIBLIOGRAFÍA:.....	83

ABREVIATURAS

- FIA: Análisis por inyección en flujo /Flow Injection Analysis
- ORAC: Capacidad de absorción de radicales oxígenos
- Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
- °C: grados centígrados
- FC: reactivo de Folin-Ciocalteu
- AAPH: 2,2'-Azobis(2amidino-propano) dihidrocloruro
- ACQ: ácido clorogénico
- RL: radicales libres
- UV: ultravioleta
- UV/VIS: ultravioleta/visible
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry/Unión Internacional de Química Pura y aplicada.
- FIRA: Fideicomisos instituidos en relación a la agricultura.
- nm: nanometros
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.
- NOM: Norma Oficial Mexicana
- SAGARPA: Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en la república mexicana.
- TAH: Transferencia de un átomo de hidrógeno

INTRODUCCIÓN

El café es una bebida obtenida a partir de las plantas de café o cafetos *Coffea spp* perteneciente a la familia de las rubiáceas, en la que se incluye más de 500 géneros y alrededor de 800 especies (Astiaran et al., 2000). Dentro de las principales especies se tiene el café arábico (*Coffea arabica*) y café robusto (*Coffea canephora*). Por su parte, se designa como café verde a las semillas obtenidas a partir de los frutos maduros de la planta de café, que al ser sometido a diversos procesos como tostado, torrefacción, etc. da como resultado café tostado.

El café contiene un número de sustancias bioquímicamente activas, como compuestos fenólicos; además, contienen una inmensa variedad de compuestos químicos responsables de sus características sensoriales y de sus efectos fisiológicos. Los polifenoles son moléculas naturales presentes en las frutas y plantas como resultado de su metabolismo. Son compuestos que llevan a cabo distintas funciones en las plantas como lo es la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, y la defensa ante factores adversos como insectos o patógenos (Valencia E, 2016).

Así mismo, los polifenoles están relacionados con la capacidad antioxidante, siendo considerados como un producto alimenticio con características fisiológicamente funcionales, ya que han presentado un efecto en la reducción de enfermedades crónicas como el Alzheimer y el Parkinson (Fonseca et al., 2014). Las características antioxidantes del café dependen de la variedad, el grado de tostado, el tipo de fermentación y la molienda (Naidu et al., 2008) y se debe principalmente a la presencia de ácidos clorogénicos.

Los ácidos clorogénicos comprenden varios ácidos hidroxicinámicos (ácidos cafeico, sináptico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) esterificados con el ácido quínico. Se encuentran en las paredes celulares, siendo las principales fuentes el

café, las frutas como frambuesas, uvas, fresas, arándanos, etc., té y algunas verduras como la remolacha, así mismo se han hecho estudios sobre la presencia de quercetina en cebolla y ajos. (Marín C, 2008).

La importancia de estudiar la cantidad de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del café radica en su alto consumo, clasificándolo como una de las bebidas más populares del mundo por sus características sensoriales, particularmente en el caso de nuestro país, donde no se consumen de forma regular otras bebidas como el té, también abundante en compuestos de esta naturaleza. Además, algunas cadenas importantes de café están introduciendo un formato de café frío embotellado y enlatado listo para consumir lo cual ha amentado aún más su consumo.

De acuerdo a la PROFECO, el 85% de los mexicanos toman de una a tres tazas al día y son los hombres los que consumen más: 3 tazas frente a dos tazas que toman las mujeres. Según FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura) en México el consumo de café aumenta 2% cada año.

Es por ello que en este trabajo se determinó la cantidad de polifenoles totales y capacidad antioxidante en granos de café verde, tostado de la variedad arábica, relacionando con el contenido de ácido clorogénico en las muestras. Para lo anterior se evaluaron distintos métodos de extracción: maceración, agitación magnética y ultrasonido, empleando como extractantes agua y una disolución de metanol: agua (70:30% v/v).

Para la determinación de polifenoles totales y la capacidad antioxidante se utilizó un Sistema de análisis por Inyección en Flujo (FIA); los sistemas FIA permiten llevar a cabo medidas continuas de reacciones, disoluciones acuosas, mezclas de reactivos sin la necesidad de intervención humana, por lo que ha sido ampliamente utilizada en diversos campos. La determinación de polifenoles totales se realizó mediante la reacción de Folin-Ciocalteu basada en la reducción del reactivo FC al reaccionar

con los compuestos fenólicos a pH básico, dando un complejo azul medido a una longitud de onda de 730 nm.

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó utilizando un sistema ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno) acoplado a FIA. El método ORAC mide la emisión fluorescente derivada de la capacidad de un compuesto para inhibir la formación de radicales peroxilo formados al reaccionar la fluoresceína con el reactivo AAPH. La cuantificación de ácido clorogénico se llevó a cabo mediante un análisis por HPLC.

Hipótesis:

Si se aumenta el tiempo de tostado en las muestras de café, las concentraciones de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico, disminuyen.

OBJETIVOS**Objetivo general:**

Determinar la concentración de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en granos de café con diferentes tostados y relacionar los resultados con la concentración de ácido clorogénico.

Objetivos específicos:

- Evaluar distintas metodologías de extracción tanto de polifenoles totales como de capacidad antioxidante (maceración, agitación magnética y ultrasonido) en café para determinar con cuál de ellas se tiene una mejor eficiencia en la extracción.
- Determinar los parámetros óptimos de extracción por ultrasonido de las muestras de café: tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y número de ciclos mediante un diseño de experimentos.
- Determinar la concentración de polifenoles en café utilizando la reacción de Folin-Ciocalteu acoplada a un sistema de inyección en flujo.
- Optimizar los parámetros del método ORAC para la determinación de la capacidad antioxidante por análisis por inyección en flujo mediante un diseño de experimentos.
- Identificar el efecto del tiempo de tostado en la concentración de ácido clorogénico en las distintas muestras de café mediante HPLC.
- Evaluar el efecto que tiene el proceso del café (café lavado, honey y secado normal) en el contenido de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y el ácido clorogénico.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del café

De acuerdo con Belitz, se designa como café (granos de café) a las semillas de frutas de carmesí enteras de la planta de cafeto, molidas o tostadas de las que se elimina completamente el pericarpio y la piel (endospermo), mientras que la bebida preparada a partir de la mezcla de café tostado y molido, con agua a punto de ebullición es conocida como infusión de café (Belitz, 2014).

El origen del café se sitúa en el altiplano de Abisinia (Etiopía- África), donde se comenzó a cultivar en el siglo X; fue introducido a Europa en el siglo XVI y posteriormente a América durante la conquista española.

El árbol de café (cafeto) es un arbusto tropical de hojas perennes verdes pertenecientes a la familia *Rubiaceae* y género *Coffea spp*, se desarrolla principalmente en territorios tropicales (temperatura entre 15 y 25°C). El café puede cultivarse a distintas altitudes; sin embargo, entre mayor sea, se tiene una mayor riqueza de sabores (Astiarán et al., 2000).

En la figura 1 se muestra un ejemplo de una planta de café; el tallo de cafeto es delgado y recto, con flores blancas en forma de racimos axilares. En los tallos crece el fruto de café conocido como cereza o baya de café en forma de drupas con dos semillas en cada baya.



Figura 1. Planta de café

Se conocen distintas clases de café, pero las más estudiadas y conocidas son

Arabica, Liberia, Cenephora y Robusta. Una de las diferencias principales entre los cafés Arabica y Robusta, es que el café Arabica es de granos finos y aromáticos, mientras que el Robusta produce una bebida rica en cafeína, fuerte, ácida y generalmente es utilizada para la fabricación de café soluble o instantáneo (Lopez J, et al., 2005). Otra de las variedades más estudiadas de café es la variedad Bourbon, que es una mutación de la variedad Typica. Presenta ramificaciones secundarias y bandolas verticales, hojas anchas y onduladas y el grano es más pequeño y redondo.

1.2 Anatomía del fruto

El fruto tiene forma de drupa de aproximadamente 1.5 cm de diámetro. Las principales capas del fruto se muestran en la figura 2.

La capa externa del fruto es el exocarpio o epicarpio, representa aproximadamente el 43.2% del fruto en base húmeda, el color depende de la variedad y grado de madurez, recubre al mesocarpio que está constituido por una capa gruesa rica en azúcares y mucílagos que recubre los granos, representa el 11.8% del fruto. Los granos de café están revestidos por una doble membrana, la primera capa es de color amarillo pálido, duro y frágil, conocida como pergamino o endocarpio, representa el 6.1% del fruto; la segunda capa se encuentra adherida al grano conocida como película plateada que representa el 0.2% del fruto. Finalmente, se tiene el endospermo, mejor conocido como grano de café verde, representa el 38.9% del fruto en base húmeda (Arcilla J, 2007).

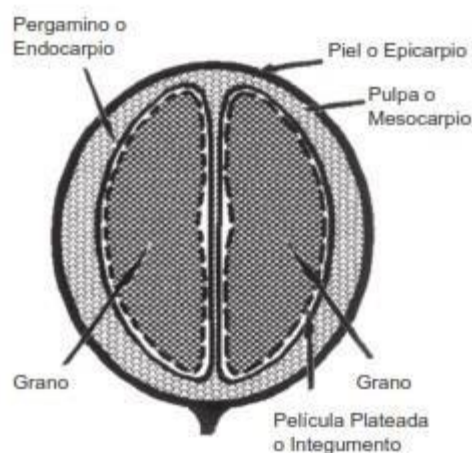


Figura 2. Corte de un fruto de café (Según Belitz, 2014)

1.3. Desarrollo de la planta de café.

Se conocen cuatro fases en el desarrollo tanto vegetativo como reproductivo de la planta de *Coffea arabica* que se lleva a cabo durante 3 años, aproximadamente (Arcilla et al., 2007).

- a) La primera es la fase de desarrollo vegetativo: se considera desde la germinación hasta la primera floración; cabe mencionar que, en caso del cafeto, la formación de nuevos nudos y hojas, así como la regeneración de raíces ocurre durante toda la vida de la planta, por ello para poder identificar esta etapa se subdivide a su vez en tres etapas: germinación a transplante, almácigo y siembra definitiva a primera floración.
- b) Fase de desarrollo reproductivo del cafeto: comienza con la aparición de las primeras flores en el 50% de las plantas, la duración depende de la época, fotoperíodo y temperatura.
- c) Fase de desarrollo vegetativo y reproductivo: se comienzan a dar simultáneamente las fases de desarrollo vegetativo y reproductivo durante el resto de vida de la planta. La fase reproductiva se da con el desarrollo del fruto y la maduración.
- d) Fase de senescencia del cafeto: después de los 6 y 8 años, la planta se deteriora paulatinamente por lo cual disminuye su productividad.

1.4. Producción de café

1.4.1. Producción mundial de café

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, son:

- a) Suaves colombianos, granos de arábica lavados, producidos principalmente en Colombia.
- b) Suaves, granos de arábica, cuyos principales productores son México y Centroamérica.

c) Brasileños naturales, granos de arábica sin lavar, provenientes de Brasil y otros países sudamericanos.

d) Robustas, producidos en África, Asia y algunos países sudamericanos.

En el año 2017 México ocupó el 11° lugar en producción de café cereza con 218,927 toneladas por lo que la producción de los cafetos mexicanos representó el 2.4 % de la producción mundial.

De acuerdo con SAGARPA, se tuvo un incremento de 3.0% en la producción y 2.5% en el consumo nacional de café durante el periodo 2007-2016; por su parte, la producción mundial de café, durante el ciclo 2016/2017 se estimó en 156.6 millones de sacos de 60 kg, con un consumo mundial de 153.3 millones de sacos.

En la figura 3 se presenta la distribución de la producción mundial de café durante el periodo 2016/2017. Se observa que Brasil fue el mayor productor con 2,804,070 toneladas que representó el 35.8% de la producción mundial, seguido de Vietnam con 17.0%, Colombia con 9.3%, Indonesia 6.4%, Etiopia 4.1% y el resto de los países productores representaron solo el 27.3% de la producción mundial.

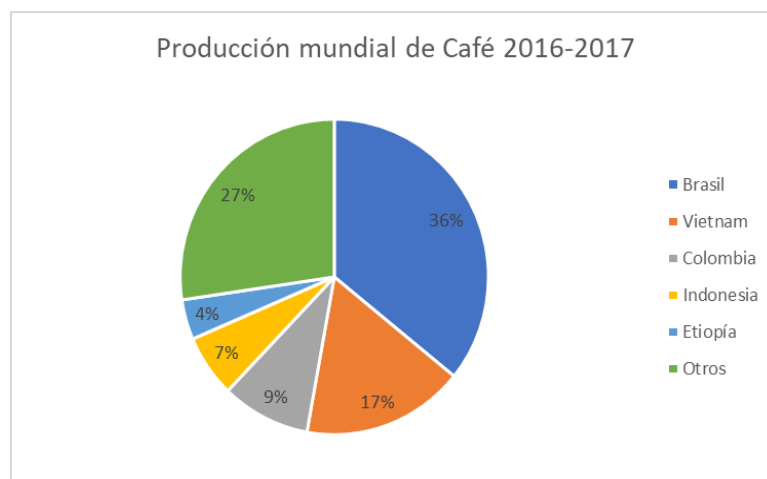


Figura 3. Producción mundial de Café (SAGARPA 2017).

1.4.2. Producción nacional de café

México se encuentra en el onceavo lugar con una producción de 218,927 toneladas. La mayor parte de la producción se da en el sur del país, debido a las condiciones

ambientales que requiere la planta para crecer. En la figura 4 se presenta la distribución de la producción a nivel nacional, donde los primeros 5 lugares son Chiapas 43%, Veracruz 23%, Puebla 14%, Oaxaca 8% y Guerrero 5%.

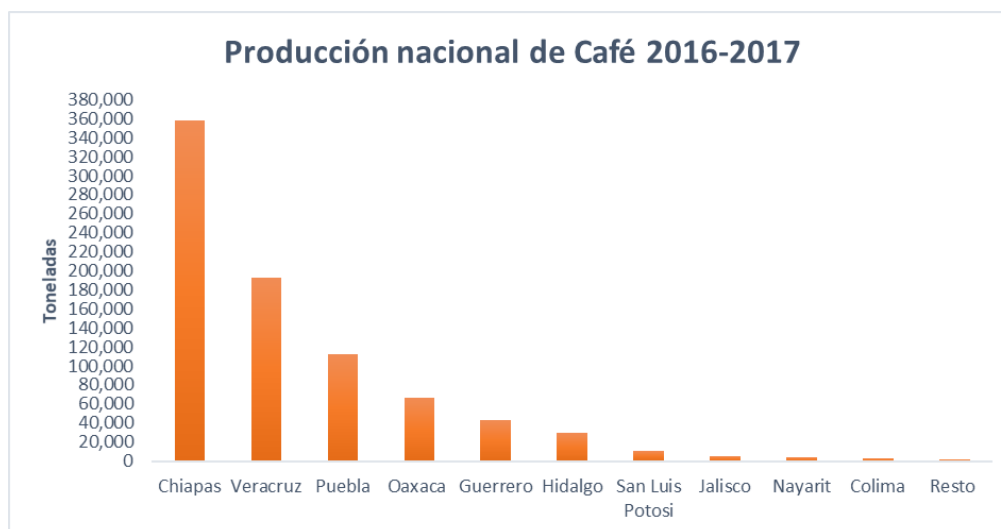


Figura 4. Producción nacional de Café (SAGARPA 2017)

De acuerdo a SAGARPA, en Chiapas se cosechó una superficie de 207 mil 52 hectáreas con una producción obtenida de un millón 317 mil 11 sacos de 60 kilos de café verde con un rendimiento por hectárea de 2.032 toneladas de café cereza. En Veracruz se cosecharon 115 mil 630 hectáreas y se obtuvieron un millón 29 mil 219 sacos de 60 kilos de café oro, con un rendimiento promedio por hectárea de 2.844 toneladas de café cereza, mientras que en Oaxaca se produjeron 438 mil 130 sacos de 60 kilos de café verde en una superficie de 111 mil 754 hectáreas, con un rendimiento promedio de 1.252 toneladas de café.

1.5. Café verde o crudo.

La NOM-169-SCFI-2007 así como NOM-149-SCFI-2001 designan como café verde a la materia prima constituida por semillas o almendras de los frutos maduros de cafeto de la especie *Coffea arabica L.* a los que se les han quitado las capas que lo cubren con el fin de estar listo para su industrialización.

El café verde no posee características aromáticas, sino que se adquieren durante el tostado. Se obtiene a partir del procesamiento de bayas maduras del árbol de café, con el cual se consigue el aislamiento de la semilla, mediante una eliminación de

las diversas capas y la pulpa para su posterior secado hasta tener una humedad menor al 12%.

1.5.1. Composición del café verde

En la tabla 1 se presenta la composición del café verde, aunque se debe tomar en cuenta que esta varía dependiendo de la clase y el origen.

Tabla 1. Composición del café crudo (cifras en % de extracto seco) Belitz 2014.

Componente	(%)
Agua	5.0-12.1
Proteína bruta	8.7-12.2
Grasa	8.3-17.0
Azúcares reductores (expresados como glucosa)	0.0-0.5
Sacarosa	6.0-7.0
Fibra bruta	10.0-11.7
Ácido cítrico	0.5-1.15
Ácido málico	0.0-0.5
Ácido oxálico	<0.2
Ácido clorogénico	4.5-11.1
Cafeína	0.9-2.6
Triglonelina	0.24-1.2
Minerales	3.0-5.4

1.6. Procesamiento del café.

El café se divide a su vez en café húmedo y lavado, los cuales difieren en el tipo de secado que se lleve a cabo. A continuación, se describen las principales etapas realizadas en el procesamiento del café lavado o húmedo.

a) Despulpado

Consiste en remover parte del epicarpio y del mesocarpio (pulpa) del fruto, para acelerar la descomposición del mucílago evitando el manchado de café por dispersión de las antocianinas presentes en el epicarpio del fruto, debe hacerse durante las primeras 8 horas después de la cosecha (Salinas M, 2011).

b) Fermentación

El café despulpado es colocado en pilas de fermentación con el objetivo de descomponer el mucílago (sustancias pépticas, azúcares, reductores y no reductores, ácidos orgánicos) (Salinas M, 2011).

c) Lavado

Inmersión de los granos por una corriente de agua con el fin de eliminar los productos de la degradación del mucilago formados durante la fermentación (Salinas M, 2011).

d) Secado

El secado de café se puede llevar a cabo por dos vías que a continuación se describen:

Vía húmeda: es utilizada en el café Arábica de América Central, Colombia y África. El café es conocido como lavado o suave y se aplica generalmente a café Arábica, dando un café de mayor calidad (Antiasarán et al., 2000). En este caso, el despulpado se lleva a cabo utilizando un sistema de discos y rodillos, las semillas obtenidas se dejan fermentar de 12 a 48 horas bajo la acción de enzimas pectinolíticas presentes en el café lo cual facilita la eliminación de la pulpa residual, las semillas se tamizan y secan al sol, para finalmente pasar al descascarillador (Belitz, 2014).

Uno de los productos del proceso húmedo es el café lavado, una de las principales características es el sabor y aroma con mucho cuerpo. En México, alrededor del 90% del café es procesado por esta vía (AMECAFÉ, 2012).

Vía seca: es utilizado para todo el café Arábica de Brasil, es más económico que la vía húmeda, pero se tiene una menor calidad de café. Así mismo difiere en las etapas de procesamiento antes mencionadas, donde las principales etapas son: clasificación, secado y descascarillado (figura 5) (Antiasarán et al., 2000). Uno de los beneficios de la vía seca es el ahorro de las etapas de despulpado y lavado. Los frutos se dejan secar al sol hasta que la semilla desprenda de la cáscara, después pasa al descascarillado donde se elimina la pulpa, el endocarpio y el tegumento (Belitz, 2014).

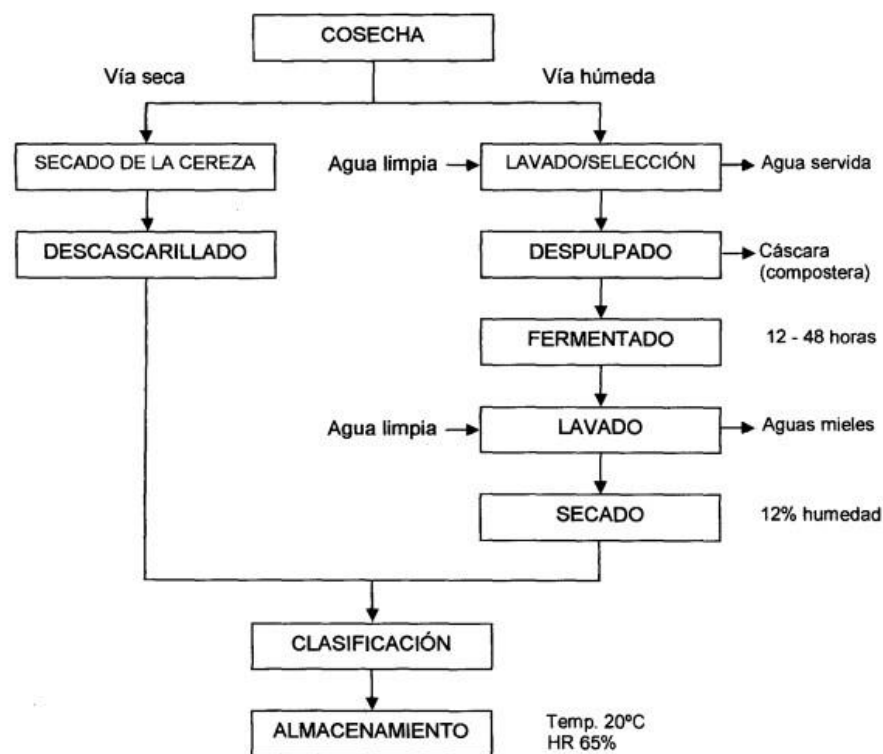


Figura 5. Procesamiento de café por vía seca y húmeda (Fonseca, 2014).

En México entre el 10 y 15 % del café se procesa mediante vía seca de acuerdo a SAGARPA, si bien los cafés lavados se consideran de una mayor calidad y son más comercializados en el país, mediante la vía seca se tienen otros atributos que son

empleados en la elaboración de expresos, solubles y cafés mezclados con azúcar (AMECAFÉ, 2012).

e) Almacenamiento

Una vez seco el grano (10-12% de humedad), éste es almacenado en sacos, a granel o en silos (Salinas M, 2011).

1.7. Café tostado.

De acuerdo con la NOM-169-SCFI-2007 y la NOM-149-SCFI-2001, el café tostado es el producto obtenido de la torrefacción del café verde.

El tostado del café se lleva a cabo a una temperatura entre 200 y 250 °C y el tiempo está determinado por el término del café. La transmisión de calor en los granos se hace por convección mediante el contacto de los granos con las paredes del tostador, generalmente se utilizan tostadoras centrífugas tardando aproximadamente de 6 a 15 minutos para el tostado medio, mientras que en el tostado por contacto se requiere un tiempo de 20 a 40 minutos. Existen nuevos métodos de tostado rápido que disminuyen el tiempo a 2-5 minutos, sin embargo, éste tiene una desventaja, al tener una repentina evaporación del agua la densidad el café molido es menor (Belitz, 2014).

En el proceso de tostado se distinguen 4 etapas principales: desecación, crecimiento, disgregación y tostado completo. Los primeros cambios se presentan a 50 °C en las capas tisulares; a continuación, coagula la proteína y se evapora el agua. Por encima de los 100 °C pardean los granos a causa de la descomposición térmica y pirólisis de compuestos orgánicos, a 150 °C comienza el aumento de volumen debido a la producción de algunos gases como vapor de agua, CO y CO₂, a 180°C-200°C se da la ruptura del grano produciendo humo azulado y aparece el aroma, iniciando la etapa de descomposición; finalmente al alcanzar la óptima caramelización se tiene una humedad entre 1.5-3.5% (Belitz, 2014).

1.7.1. Café honey

En el procesamiento del café, una de las etapas importantes es el secado del grano, la cual determina el sabor y la calidad final del producto, por lo cual otra de las variedades conocidas son las siguientes: lavado, natural y honey o semi-lavado.

Anteriormente se ha mencionado que la principal diferencia entre el fermentado natural y lavado es el despulpado que se lleva a cabo en el café lavado para después fermentarse durante un tiempo dado hasta la desaparición del mucilago, lo anterior otorga notas ácidas y cuerpo ligero al café, mientras que el natural posee más cuerpo y sabor afrutado.

Por su parte el café honey se deja secar aún con el mucilago, lo cual confiere una textura distinta (figura 6)



Figura 6. Café fermentado honey, natural y lavado.

1.7.2. Cambios en el tostado

Durante el tostado aumenta un 50-80% el volumen del grano, hay una disminución del peso del 13-20%, cambios de color y especialmente ocurre la formación de un aroma típico, disminuye el peso específico desde 1.126-1.272 a 0.570-0.694 por lo que el café tostado flota a diferencia del verde que se hunde.

Como se ha mencionado anteriormente, el café, al ser tostado presenta cambios de color y la aparición de aromas, sin embargo, también se presentan cambios en su composición química. Tal es el caso de los carbohidratos, que son degradados entre

15% y 20% de los contenidos en los granos de café, principalmente la sacarosa, que se degrada casi totalmente (Belitz, 2014). Más del 99% de los azúcares reductores reaccionan con los aminoácidos en la conocida reacción de Maillard (Pastoriza de la Cueva, 2013), de esta manera, se forman las melanoidinas que dan el pigmento marrón a los granos de café y otorgan sabor y color a la bebida.

En cuanto al contenido total de aminoácidos, este disminuye alrededor de un 30%. La arginina, el ácido aspártico, la cisteína, la histidina, la lisina, la serina, la treonina y metionina son los principalmente afectados, mientras que aminoácidos estables como la alanina, el ácido glutámico y la leucina aumentan. Sin embargo, la degradación y disminución del contenido de proteínas depende del grado de tueste (Pastoriza de la Cueva, 2013).

Por su parte, el contenido de lípidos presenta ligeros cambios. Algunos de los diterpenos que son degradados en el tostado son el cafestol y el kahweol.

1.7.3. Principales reacciones durante el tueste de café

Algunos de los cambios que se dan en el tostado se deben a diversas reacciones que ocurren durante el tueste, entre las cuales se encuentran la reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático que se da entre sustancias nitrogenadas como aminoácidos y proteínas, trigonelina, serotonina y carbohidratos reductores.

También se lleva a cabo la degradación de Strecker de aminoácidos (vía reacción de Maillard) a aldehídos, amoníaco y CO₂, así mismo se da la formación de compuestos de azufrados de bajo peso molecular que contribuyen al aroma del café. Por su parte, la trigonelina se degrada bajo condiciones de acidez que prevalecen durante el tostado a ácido nicotínico, aumentando en un 30% respecto a la concentración inicial; se puede dar también la degradación de proteínas y aminoácidos individuales, como arginina, cisteína, lisina.

Los glúcidos o hidratos de carbono no volátiles como pentosas y hexosas son degradados por el calentamiento, produciendo compuestos con aroma a caramelo y color oscuro, mientras que la degradación de los lípidos se da mediante la

autooxidación de ácidos grasos insaturados (C_{18}), produciendo aldehídos insaturados.

1.7.4. Composición del café tostado

Tabla 2. Composición del café verde (cifras en % de extracto seco).

Componente	Cantidad (%)
Agua	2.5
Proteína ^a	9
Polisacáridos insolubles en agua	24
Polisacáridos solubles en agua	6
Sacarosa	0.20
Glucosa, fructosa, arabinosa	0.10
Lípidos	13
Ácido fórmico	0.10
Ácido acético	0.25
Ácido clorogénico	3.7
Cafeína	1.2
Trigonelina	0.4
Sustancias aromáticas volátiles	0.1
Minerales (cenizas)	4 ^b
Componentes sin identificar	35 ^c

^a Expresado como la suma de aminoácidos tras hidrólisis ácida; el 1.5% son hidrosolubles.

^b Son hidrosolubles el 3.5%.

^c Son hidrosolubles el 7.5%. **Belitz 2014.**

El café está compuesto por más de 1000 sustancias químicas distintas incluyendo aminoácidos, compuestos nitrogenados, polisacáridos, glúcidos, triglicéridos, ácido linoleico, diterpenos (cafestol y kahweol), ácidos volátiles (fórmico y acético) y no volátiles (láctico, tártrico, pirúvico, cítrico), compuestos fenólicos (ácido clorogénico), cafeína y sustancias volátiles. (López J, et al., 2005). En la tabla 2, se presenta la composición del café tostado, tomando en cuenta que la composición varía considerablemente dependiendo del grado de tostado, especie, variedad de café y condiciones de crecimiento.

1.8. Ácidos clorogénicos en el café

Los ácidos clorogénicos son ésteres que derivan de la unión entre el ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico o sináptico y el ácido quínico (figura 7). Su nombre proviene del pigmento verde formado por la reacción entre el ácido cafeico y el cloruro férrico (Marín G, 2008).

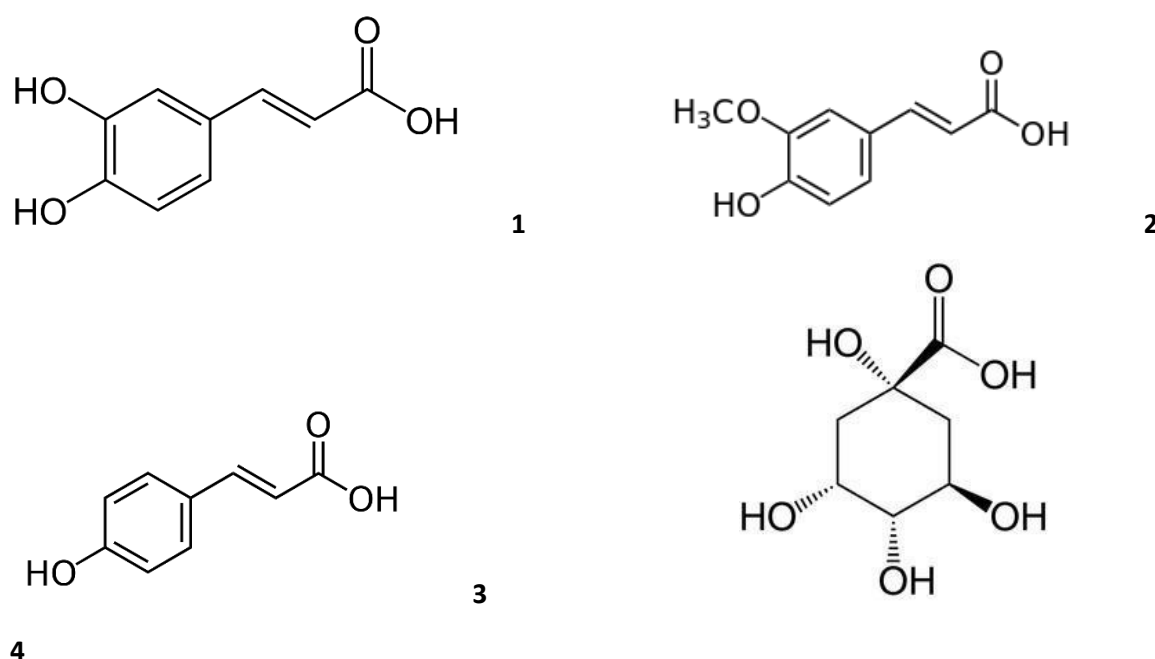


Figura 7. Estructuras químicas del ácido cafeico (1), ácido ferúlico (2), ácido p-cumárico (3) y ácido quínico (4).

Los ácidos clorogénicos se encuentran en las plantas como metabolitos secundarios y se asocian frecuentemente con la protección ante el ataque de insectos y microorganismos (Astiasarán et al., 2003).

La bebida de café es una de las principales fuentes de ácido clorogénico, su composición varía dependiendo de la especie, pero el que se encuentra en mayor cantidad en los granos de café es el 5-CQA (ácido 5-cafeoilquinico) (figura 8) (Trigo 2009). Los ácidos clorogénicos se encuentran como mono y di-ésteres, y conforman más de 40 ácidos, en grupos de isómeros con sustituciones en las posiciones 1,3-, 4- ó 5- del ácido quínico (Marín G, 2008).

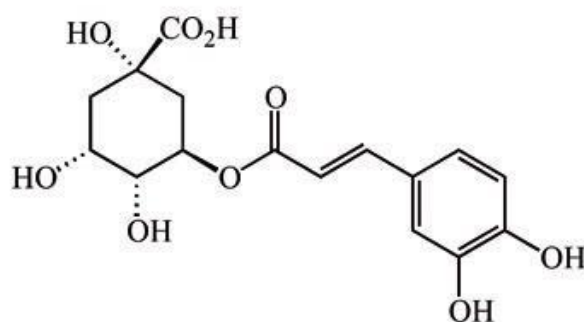


Figura 8. Estructura química del ácido clorogénico: ácido 5-cafeoilquinico.

1.8.1. Ácidos clorogénicos en el café verde

En el grano de café verde, los ácidos clorogénicos se encuentran en forma de sales de potasio; su contenido varía entre el 6 y 7% en los cafés Arábica, aunque su contenido varía con la especie y las condiciones de crecimiento del árbol de café. Los ácidos clorogénicos se encuentran en la superficie del grano de café, y se les ha asociado con el sabor amargo del café (Farah y Marino, 2006), eso se debe a que en el tostado sufren hidrólisis, liberando ácido quínico y algunos compuestos fenólicos responsables del amargor.

De acuerdo a la IUPAC, se pueden clasificar según el ácido hidroxicinámico al que se encuentren unidos en: 4 ácidos cafeoil-quinicos (CQA), 6 ácidos di-cafeoilquinicos (di-CQA), 3 ácidos feruloil-quinicos (FQA), 3-ácidos di-feruloil-

quínicos (diFQA), 3 ácidos p-cumaroíl-quínicos (p-CoQA), 6 ácidos cafeoíl-feruloíl-quínicos (CFQA), 6 ácidos p-cumaroíl-feruloíl-quínicos (p-CoQFA), 3 ácidos dimetoxicinámico-quínico y 3 ácidos cafeoíl-dimetoxicinámico-quínicos (Marín G, 2008).

Se ha encontrado un mayor contenido de ácido clorogénico en frutos inmaduros de café que en los maduros, así mismo, se ha encontrado que su contenido disminuye según el tostado (Marín G, 2008). Por ello, la relación entre el contenido de los ácidos 3, 4 y 5 cafeoilquínicos (que aumenta con la maduración) y los ácidos 5feruloilquínicos 3, 4, 3,5 y 4,5-dicafeolquínicos (que permanecen constantes), se ha propuesto como un indicador del estado de maduración del grano (Salinas, 2011).

1.8.2. Ácidos clorogénicos en el café tostado

Los ácidos clorogénicos determinan la calidad y el sabor del café tostado ya que confieren astringencia, amargor y acidez a la bebida. Sin embargo, en concentraciones elevadas, pueden producir sabores indeseables.

Se ha reportado que en la torrefacción del grano de café, estos presentan diferentes reacciones en el tostado como isomerizaciones, disminuyendo el 5-CQA; otra parte de los ácidos clorogénicos se une a las melanoidinas en la reacción de Maillard hidrolizándose entre el 5 y el 8% de los ácidos clorogénicos; al tener un tostado intenso se transforman en catecol, guayacol y pirogalol, por lo que los ácidos se reducen aproximadamente en un 90% durante el tostado (Marín G, 2008). Aunque los ácidos clorogénicos se degradan durante el tostado, la bebida de café es abundante en estos compuestos.

Los ácidos clorogénicos son degradados en un 30% durante el tostado normal, y un 70% en el tostado intenso (Belitz 2014). En la tabla 3 se presenta la cantidad en % en la cual están presentes los distintos isómeros en el café tostado normal.

Tabla 3. Ácidos clorogénicos del café tostado

Compuesto	Cantidad (%)
Ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico)	2.0
Ácido 4-cafeoilquínico (ácido criptoclorogénico)	0.2
Ácido 3-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico)	1.0
Ácido 3,4-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico a)	0.01
Ácido 3,5-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico b)	0.09
Ácido 4,5-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico c)	0.01

De acuerdo con diversos estudios, el ácido clorogénico del café verde 5- CQA protege a las células del hígado humano contra el estrés oxidativo. Así mismo se les han atribuido efectos antioxidantes y anticancerígenos (Luceri 2017).

1.9. Polifenoles

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras (López, 2018). En las plantas son utilizados como sistema de defensa ante patógenos y como protección contra la radiación UV.

Químicamente, los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales de ésteres, ésteres de metilo, glicósidos, etc., algunos presentan actividad antioxidante, la cual depende del número y la posición de los grupos OH y el pH (Belitz, 2014).

Así mismo, a los polifenoles se les atribuyen algunas propiedades sensoriales, como color a las antocianinas, sabor amargo por las flavononas de los cítricos, astringencia por los taninos condensados y aroma, como el eugenol en plátano, por ejemplo, (Escutia 2011).

1.9.1. Clasificación de polifenoles

Existen diversas clasificaciones de los polifenoles debido a la diversidad estructural. De manera general, se clasifican en fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides (Porrás et al., 2009).

Los ácidos fenólicos son derivados del ácido hidroxicinámico como el cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico ya que generalmente se encuentra presente en forma de derivados (figura 9).

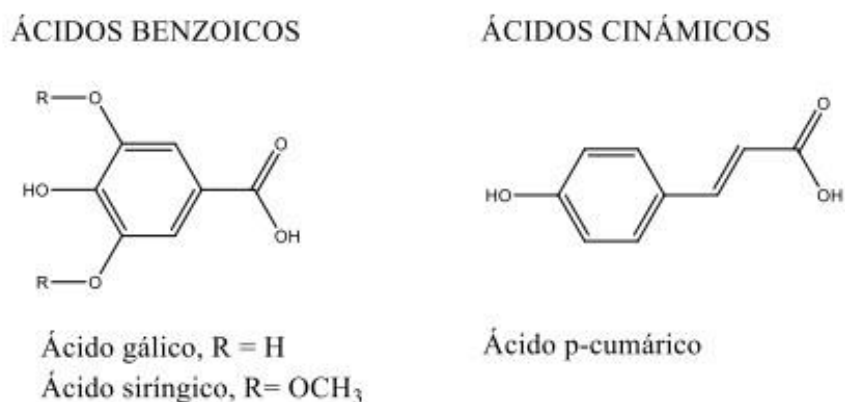


Figura 9. Estructura general de ácidos fenólicos.

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de los polifenoles, ya que se encuentran en mayor concentración en las planta;, con bajo peso molecular, comparten el esqueleto mostrado en la figura 10, en la cual se presenta su estructura general que consta de 3 anillos, dos aromáticos (anillo A y B) y uno heterociclo oxigenado (anillo C) así como dos anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 átomos de carbono (C6C3C6) (Mercado G, 2013).

Debido a la variedad de sustituciones, se clasifican a su vez en: flavonoles, flavonas, flavononas, flavonololes, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalconas, antocianinas, leucoantocianidinas o flavandioly proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de ellos, los más abundantes en los vegetales son las flavonas y los flavonoles, generalmente se encuentras en las capas superficiales para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores (Zavaleta J, 2005).

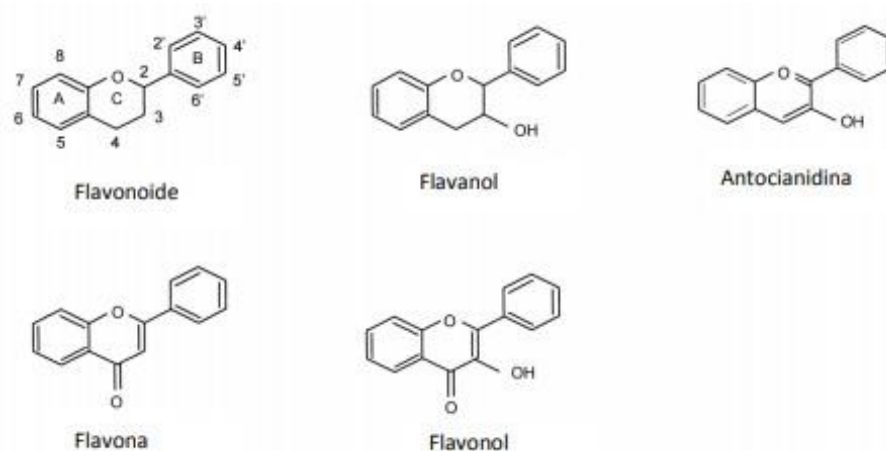


Figura 10. Estructura básica y tipos de flavonoides (Chávez, 2007).

1.9.2. Polifenoles en los granos de café

En los granos de café, los compuestos fenólicos se encuentran predominantemente como ácidos clorogénicos, sin embargo, también se encuentran presentes otros, aunque en menor proporción como compuestos fenólicos no flavonoides, tal es el caso del ácido gálico, el ácido p-hidroxibenzoico, los ácidos hidroxicinámicos como el ácido cumárico y el ácido cafeico.

El ácido p-cumárico es un metabolito presente en las plantas, al cual se le atribuyen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, sugiriendo la posible prevención de enfermedades vasculares (Luceri et al., 2017).

Otros compuestos bioactivos encontrados en el café son las metilxantinas, la cafeína y la teobromina, siendo la cafeína el principal alcaloide en el café y su concentración depende de la variedad, proceso de tostado y preparación de la bebida (Vega A., et al., 2018).

1.10. Métodos de extracción de compuestos fenólicos

El método de extracción es considerado uno de los pasos más importantes para el tratamiento de la muestra, ya que influye directamente en la determinación cuantitativa del extracto; consiste en la separación del analito (compuesto fenólico) en un disolvente adecuado y bajo condiciones analíticas ideales de temperatura y

pH, con la final de reducir o eliminar posibles interferencias (Chávez, 2007). Las técnicas de extracción se pueden clasificar y no tradicionales.

d

1.10.1. Extracción por métodos tradicionales

Se basa principalmente en la selección de disolventes y condiciones de temperatura o agitación con la finalidad de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa.

a) Maceración: es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el extractante, por lo que de él depende la naturaleza de los compuestos extraídos. Se puede llevar a cabo en frío o en caliente y puede ser simple o fraccionada.

La maceración en frío consiste en colocar el producto con una cantidad suficiente de disolvente por un lapso de tiempo determinado; presenta algunas ventajas como el mínimo uso de equipos y de energía, pero requiere períodos de tiempo más largos, mientras que en la maceración en caliente se requiere el uso de calor, por lo cual el proceso se acelera, aunque una desventaja podría ser la degradación de los compuestos termolábiles

b) Agitación magnética: se basa en la rotación de un campo magnético externo que induce a girar un imán introducido en la solución de reacción, el campo magnético puede ser variado por el operador.

1.10.2. Extracción por métodos no tradicionales.

1.10.2.1. Ultrasonidos

Estos métodos mejoran la eficiencia de extracción por acción física en el medio respecto a los métodos tradicionales (Gao y Liu, 2005). Entre ellos se encuentra la extracción asistida por microondas, la extracción por fluidos supercríticos, la extracción turbo, la extracción eléctrica, extracción asistida por ultrasonido, etc.

La extracción asistida por ultrasonido se basa en el fenómeno de la cavitación (figura 11) dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido. El tiempo de vida de las

burbujas es de microsegundos, por lo que al llevarse a cabo su implosión genera elevadas temperaturas (500°C) en el interior de la burbuja a presiones de 100 MPa, formando a su vez especies muy reactivas como radicales hidroxilos, hidroxiperoxilo y peróxido de hidrogeno.

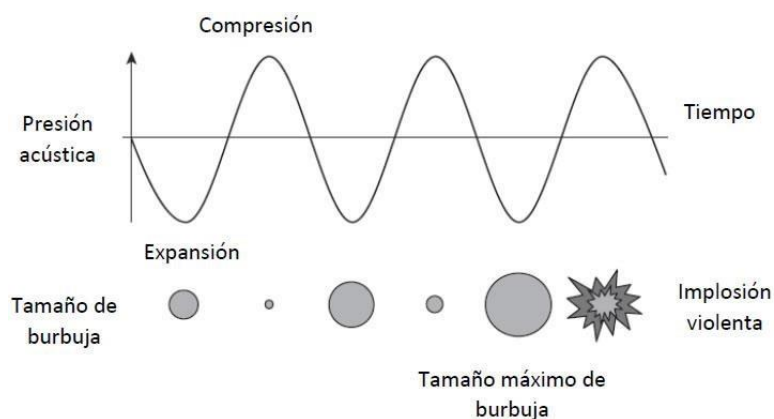


Figura 11. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad (adaptado de Salazar et al., 2010).

En la extracción asistida por ultrasonido se usan ondas de una frecuencia determinada causando que las partículas sólidas y líquidas vibren y se aceleren ante la acción ultrasónica; como resultado el soluto, pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. Una de las ventajas de este método es el aumento de la eficacia de la extracción debido a que las burbujas colapsan de forma asimétrica durante la expansión lo que genera turbulencias y aumenta la circulación de la corriente líquida, tales efectos mecánicos generados provocan la ruptura de la pared celular y la reducción del tamaño de las partículas aumentando el área de contacto entre la fase sólida y el disolvente facilitando la transferencia de masa por difusión y procesos osmóticos (Rodríguez Z, 2014).

En el proceso de extracción mediante ultrasonido interfieren varios factores como el volumen de la muestra, el tamaño de partículas de la muestra, el disolvente de extracción (polaridad y solubilidad), el pH de la solución extractante, el volumen del disolvente de extracción, la frecuencia del sonicado que influye en la formación de burbujas (a frecuencias más altas, la producción de burbujas de cavitación es más

difícil), el tiempo y la temperatura de extracción (a temperaturas altas hay mayor eficiencia respecto a la extracción en frío, tomando en cuenta que hay analitos que se pueden degradar a altas temperaturas) (Fernandez M, 2011).

1.11. Determinación de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu

El método más utilizado para la determinación del contenido de polifenoles totales es el de Folin-Ciocalteu (F-C). Se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. La adición de polifenoles a pH básico (aproximadamente 10) proporciona la presencia de iones fenolato que, al entrar en contacto con el reactivo de F-C el cual consiste en una disolución de iones complejos provenientes de los heteropoliácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), inician una secuencia de reacciones de transferencia de electrones llevando a la reducción del mismo a un estado de oxidación de 5+ (figura 12), y generando especies de color azul posiblemente de la forma $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$, que son detectables a una longitud de onda de 730 nm (Sánchez Rangel, et al 2013; Escutia, 2011).

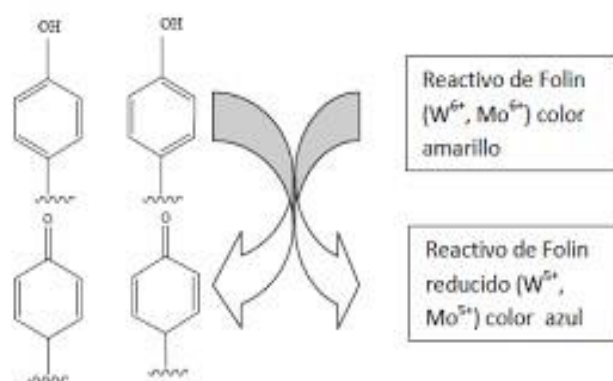


Figura 12. Mecanismo de reacción de F-C.

Se debe tomar en cuenta que el método de Folin-Ciocalteu carece de especificidad, ya que el reactivo F-C es susceptible a ser reducido no sólo a por todos los polifenoles, sino también por otros reductores como son el ácido ascórbico, glúcidos (glucosa y fructosa), aminas aromáticas, sales de hierro (II), ciertos aminoácidos,

dióxido de azufre, entre otros, por lo que se debe tener presente los posibles interferentes no-polifenólicos que pudiera contener la muestra (Chávez K, 2007).

La absorbancia del producto de reacción es detectable a una longitud de onda de 730 nm y mediante el uso de la ley de Lambert-Beer (ecuación 1) tal absorbancia se relaciona directamente con la concentración del analito en cuestión.

1.11.1. Espectroscopía

La espectroscopía es una técnica de análisis que se basa en la absorción de radiación por las moléculas. Las más utilizadas son la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), la espectroscopía de infrarrojo, la espectroscopía ultravioleta y la espectroscopía de masas.

En la radiación UV se encuentra entre la luz visible y los rayos X del espectro electromagnético. De esta manera, la ultravioleta visible (UV/VIS) se fundamenta en la cantidad de energía que puede absorber (UV cercano a $\lambda=200-400$ nm y Vis $\lambda=400-800$ nm) o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente (González M, 2015).

Mediante la ecuación de Lambert-Beer (ecuación 1), se puede relacionar la fracción de radiación absorbida con la concentración del analito y el espesor del medio.

$$A = lC\varepsilon \quad (1)$$

$A =$ Absorbancia

$l =$ longitud de paso óptico (cm)

$C =$ Concentración de la disolución ($\frac{L}{mol}$)

$\varepsilon =$ Coeficiente de absortividad molar ($cm \frac{L}{mol}$)

También existe la espectroscopía de fluorescencia, la cual se fundamenta en la fluorescencia de una muestra que es previamente excitada por un haz de luz (generalmente luz ultravioleta). Las moléculas son excitadas mediante la absorción

de una onda electromagnética, desde su estado electrónico fundamental a uno de los diversos estados electrónicos excitados, lo que provoca la emisión del fotón (González M, 2015).

1.12. Estrés oxidativo, radicales libres y antioxidantes

En los últimos años se ha despertado un gran interés en el campo de la investigación sobre el estrés oxidativo debido a la relación que tiene con algunas enfermedades neurodegenerativas.

El estrés oxidativo se puede definir como una perturbación del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los prooxidantes dando lugar a cambios en las biomoléculas por los radicales de oxígeno formados y las modificaciones funcionales.

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en el orbital más externo, lo que produce una gran reactividad de dicha estructura, un ejemplo es la intervención de estas especies reactivas en procesos bioquímicos a nivel celular. La producción de estos metabolitos fisiológicos es normal en el cuerpo humano, sin embargo, se puede incrementar en algunas condiciones rompiendo el equilibrio entre ellos y los antioxidantes. Se producen principalmente en la mitocondria, al llevarse a cabo la respiración celular; también son producidos por los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos o macrófagos) que producen superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como mecanismo protector frente a agentes u organismos extraños y este a su vez se transforma en el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) aún más reactivo que el anterior, por autooxidación de compuestos como aminoácidos, o activación catalítica de diversas enzimas (Bonilla L, 2005). Otras de las especies reactivas son el radical alcoxilo (RO^{\cdot}), peroxilo (ROO^{\cdot}) y óxido de nitrógeno (NO^{\cdot}), también se conocen oxidantes no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete (1O_2) y peroxinitrito (ONOO).

Se conocen algunas fuentes exógenas que ocasionan la formación de radicales libres de diferente origen, tanto ambientales como el tabaco, la radiación

electromagnética, o la luz solar; farmacológicas y nutricionales como contaminantes o aditivos.

Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles a radicales libres y por lo tanto pueden prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos. Existen diversos sistemas de defensa naturales tanto enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa) como no enzimáticos como la vitamina C, los carotenos entre los cuales destacan los β -carotenos (precursores de vitamina A), ferritina, selenio, flavonoides y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles, que constituyen antioxidante más utilizado en la fase lipídica), los segundos pueden ser ingeridos en la dieta.

Las especies reactivas de oxígeno pueden dañar macromoléculas celulares, un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como arterosclerosis, Alzheimer, Parkinson, cáncer, diabetes, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias (López, 2015).

1.12.1. Capacidad antioxidante de polifenoles

Desde el punto de vista de su actividad biológica, muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Barberán, 2003).

Se cree que la función antioxidante de los polifenoles radica en la amplia gama de actividades biológicas, como secuestradores de radicales libres, quelación metálica y su capacidad para la modulación de enzimas (lipooxigenasas, ciclooxigenasa, xantina oxidasa), así como sus efectos sobre las vías de señalización celular y en la expresión de genes.

La estructura química de los compuestos fenólicos es la que le confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres. El tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante. En general, los polifenoles

se encuentran en aceites, frutas, así como en determinadas bebidas obtenidas por fermentación a partir cereales y uvas como la cerveza y el vino, respectivamente.

1.12.2. Actividad antioxidante de los CGAs (ácidos clorogénicos)

La actividad antioxidante de los CGAs está relacionada con el grupo fenol presente en su estructura, por lo que se ha sugerido su utilidad en la prevención de enfermedades oxidativas.

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo, siendo una de las principales fuentes de antioxidantes al ser consumido en cantidades moderadas, por lo que se ha asociado con la reducción de riesgo de enfermedades vasculares, Alzheimer y Parkinson, así como actividad antiinflamatoria y antibacteriana.

El ácido clorogénico es el compuesto fenólico más abundante en el café (una taza puede contener entre 70 y 350 mg de ácido clorogénico) y es el compuesto que más contribuye a su capacidad antioxidante.

1.13. Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Dado que hoy en día existe un marcado interés en el estudio de antioxidantes de fuentes naturales, se han desarrollado distintos métodos analíticos tomando en cuenta la muestra a analizar para poder obtener el mejor rendimiento en la extracción.

Una de las estrategias más utilizadas es determinar la capacidad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. Los métodos cromógenos más utilizados son ABTS (ácido 2,2'-asino-bis-3-etilbenzoatiazolin-6-sulfónico), DPPH (1,2-difenil-2picril-hidrazilo), DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina), DMPO, FRAP (poder de reducción antioxidante del hierro), CUPRAC (capacidad de reducción antioxidante de cobre), TRAP (parámetro antioxidante de captura de radicales), LDL (inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad) y ORAC (López, 2015).

De acuerdo a las reacciones químicas involucradas, los métodos se pueden dividir en dos categorías: a) transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH) en el que el antioxidante atrapa un radical peroxilo por donación de átomos de hidrógeno, generando un hidroperóxido y un radical antioxidante más estable químicamente.

b) Transferencia de electrones (ET) que involucra una reacción redox, en la que el antioxidante puede donar un electrón al radical peroxilo, formando entre los productos un anión peroxilo y un catión radical del antioxidante. Los mecanismos se describen en la figura 13 (Jiménez W, 2019):

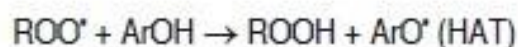


Figura 13. Mecanismo de reacción de transferencia de un átomo de hidrogeno y transferencia de electrones.

1.13.1. Método ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno)

Uno de los métodos más empleados para medir la capacidad antioxidante en alimentos es el método ORAC. Esta técnica determina la capacidad antioxidante mediante un método fluorimétrico. Consiste en evaluar la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína), se utiliza como un radical iniciador AAPH2,2',-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro), que por descomposición térmica a 37°C genera radicales peroxilo que causan daño a las moléculas fluorescentes (López P, 2015). Las especies antioxidantes son capaces de bloquear estos radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno (figura 14).

Los radicales libres pueden oxidar a la fluoresceína y por el contrario el antioxidante evita esta oxidación, es decir, los radicales peroxilo oxidan a la fluoresceína de forma que esta pierde su fluorescencia. En presencia de un antioxidante los RL captan un átomo de hidrogeno del antioxidante, por lo que disminuye la pérdida de fluorescencia. De esta manera, el método ORAC mide el retraso, en presencia de antioxidantes, de la disminución de la fluorescencia debido a la acción de radicales peroxilo (López P, 2015).

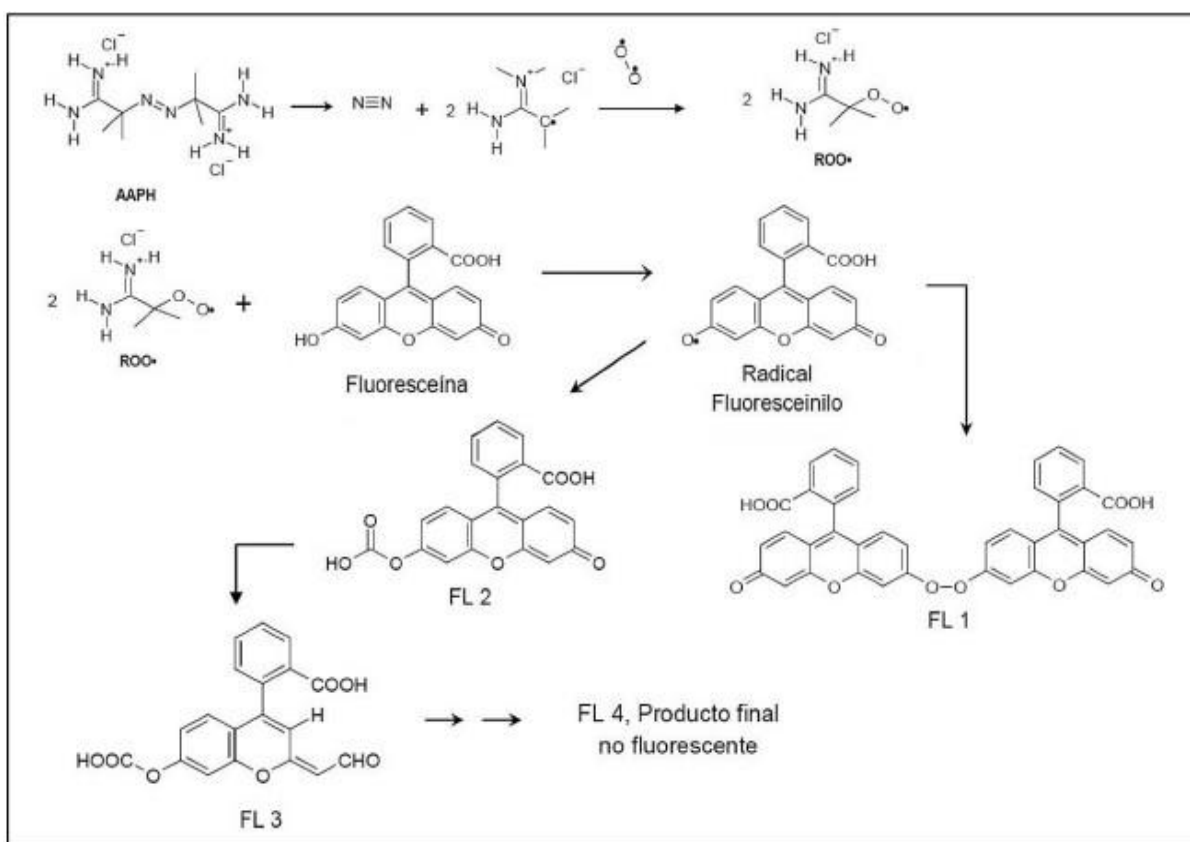


Figura 15. Mecanismo de reacción del método ORAC.

1.14. Análisis por inyección en flujo (FIA)

El análisis por inyección en flujo (FIA, por sus siglas en inglés: Flow Injection Analysis) se ha convertido en una de las formas más avanzadas de la química analítica para manipular disoluciones acuosas o mezclar reactivos sin la necesidad de intervención humana. Este tipo de análisis presenta una gran variedad de ventajas, como ahorro de tiempo en el análisis y uso de reactivos gracias a la automatización, velocidad de análisis y la realización de análisis reproducibles durante tiempo prolongado.

El FIA es una metodología basada en la inyección no segmentada de muestras en una corriente portadora que fluye de manera unidireccional a la que se agregan los reactivos en puntos de confluencia y que al momento de la detección no se alcanza

ni el equilibrio físico ni químico, por lo que la muestra inyectada es diluida en la disolución portadora o en el reactivo (figura 15) (Cañizares M, 2002).

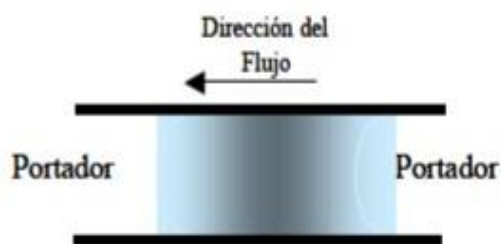


Figura 15. Dispersión que sufre el bolo de muestra al pasar a lo largo de la configuración (Cañizares M, 2002).

Al ser un sistema continuo se obtiene una señal trascendente cuyo máximo corresponde a la parte del bolo menos diluida. Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión del bolo de muestra inyectado: el transporte por convección que origina un perfil parabólico donde la velocidad lineal de las moléculas es cero en las paredes del tubo y media en el centro; y el transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración tanto horizontales como verticales (Cañizares M, 2002).

Por lo tanto, la forma de una señal FIA (pico) dependerá del tiempo en el que el bolo de muestra se encuentra dentro del sistema, así como de las características hidrodinámicas del sistema FIA (Ruzicka y Hasen, 1988). A tiempos cortos no se genera gradiente de concentración, mientras que a tiempos largos se originan picos anchos a causa de una alta dispersión.

1.14.1. Instrumentación del sistema FIA.

- a) **Sistema de propulsión:** tiene como función establecer un flujo de caudal constante, ausente de impulsos y reproducible, para ello se utiliza una bomba peristáltica, las cuales consiste en un tambor con una serie de rodillos, los cuales comprimen un tubo por el cual pasa el reactivo proporcionando un flujo pulsante.

En la figura 16, se muestra un ejemplo de un canal de una bomba peristáltica, donde el caudal es controlado mediante el diámetro interno del tubo y la velocidad del rotor.

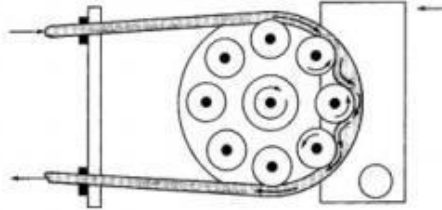


Figura 16. Representación de un canal de una bomba peristáltica (Salinas M, 2011).

- b) Sistema de inyección:** permite introducir en el flujo un volumen definido, exacto y reproducible. Actualmente se utilizan válvulas rotatorias, en las que la muestra se introduce en la corriente del fluido portador, generalmente se utilizan válvulas hexagonales, con seis orificios, tres de entrada y tres de salida que pueden estar en dos posiciones: de carga o llenado e inyección. El volumen de inyección en flujo abarca desde los 5 a 200 μL .
- c) Reactor o zona de reacción:** es en donde tiene lugar el transporte y se lleva a cabo la reacción, la longitud del reactor es definida por la cinética de la reacción, pueden ser de distintos tipos (figura 17).
- I. Tubo recto abierto: son reactores constituidos por un tubo recto de diámetro y longitud variable.
 - II. Tubo enrollado: se encuentran enrollados helicoidalmente en torno a un cilindro rígido (varilla de vidrio o plástico).
 - III. Reactor SBSR: es mejor conocido como un reactor de bolitas en cadena simple, consiste en un tubo relleno de un polímero en forma de bolitas, cuyo diámetro corresponde de un 60 a 80% del diámetro del tubo, es poco utilizado debido a las desventajas, principalmente al aumento del tiempo de residencia que interfiere en la señal obtenida.
 - IV. Cámara de mezclado: es utilizada cuando se requiere un mayor grado de mezclado (punto de confluencia) o total homogeneización de la muestra.

Esto generalmente se presenta cuando se tienen distintas características de la muestra y el reactivo como viscosidad, es utilizada principalmente en valoraciones FIA.

- V. Reactor entretreído: promueve una dispersión radial.

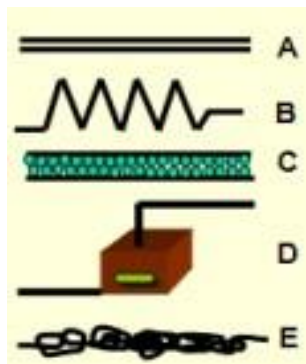


Figura 17. Tipos de reactores empleados en el sistema FIA. A) Tubo recto abierto, B) Tubo enrollado, C) Reactor Single-Bead String Reactor, D) Cámara de mezclado y E) Reactor entretreído (Salinas M, 2011).

- d) Sistema de detección:** el sistema de detección se elige de acuerdo a lo que va a ser medido, pueden ser detectores electroquímicos, amperométricos, ópticos, fluorimétricos. Debe presentar un bajo nivel de ruido, una respuesta rápida y lineal, así como alta sensibilidad.
- e) Señal del sistema:** como se ha mencionado anteriormente, en el sistema FIA la señal obtenida presenta forma de pico, mejor conocido como fiagrama. En la figura 18 se presenta un ejemplo de la señal obtenida en el análisis, donde, h corresponde a la altura del pico y está relacionada con la concentración del analito, t es el tiempo de residencia dado por el tiempo transcurrido desde la inyección hasta alcanzar una señal máxima, Δt corresponde al periodo en el cual la señal sale y se vuelve de nuevo a la línea base.

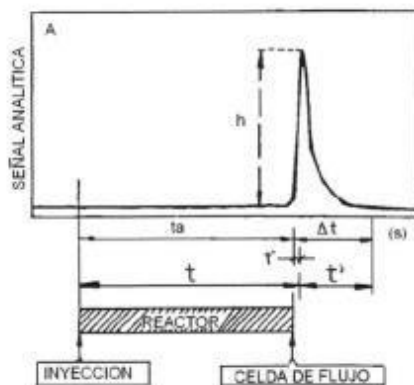


Figura 18. Señal obtenida en una configuración FIA.

Para la determinación del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en las distintas variedades de café se utilizó el sistema Folin-Ciocalteu acoplado a FIA y ORAC acoplado a FIA, respectivamente.

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales, instrumentos y reactivos.

De manera práctica, los equipos e instrumentos utilizados se dividieron de acuerdo con cada una de las metodologías implementadas.

En la tabla 4 se presentan los reactivos utilizados, tanto para el tratamiento de muestra (uso de reactivos de Carrez), así como para la determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante utilizando el sistema ORAC.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante por ORAC-FIA.

Reactivo	Marca	Pureza
Agua destilada	Merck	-
Etanol	J.T Baker	-
Metanol	J.T Baker	-
Preparación de reactivos de Carrez		
Acetado de zinc dihidratado	J.T Baker	99%
Ácido acético glacial	J.T Baker	-
Hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado	Sigma Aldrich	99%
Determinación de polifenoles totales Folin-Ciocalteu		
Reactivo de Folin	Merck	2N
NaOH	Fermont	98%
Ácido clorogénico	Sigma Aldrich	95%
Ácido cafeico	Sigma Aldrich	100%

Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FIA		
Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2carboxílico)	Sigma Aldrich	97%
Ácido cafeico	Sigma Aldrich	100%
Fluoresceína	Fluka analitical	-
AAPH 2,2'-azobis-(2-amidino-propano)	Acros organics	98%
Fosfato de potasio monobásico	Sigma Aldrich	99%
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	Sigma Aldrich	98%

2.2 . Preparación de disoluciones:

- a) Disolución metanol-agua (70:30 v/v): se midieron 70 mL de metanol con una probeta de 100 mL, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, y se llevó a la marca del aforo del matraz con agua destilada.
- b) Reactivos de Carrez:

Carrez I: Se pesaron aproximadamente 24 g de acetato de zinc, se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 3 mL de ácido acético y se llevó al aforo con agua destilada.

Carrez II: Se pesaron aproximadamente 15 g de hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado, se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se llevaron a un aforo de 10 mL en un matraz volumétrico (Flores R, 2018).

- c) Hidróxido de sodio 0.5 M: se pesaron 2.04 g de NaOH, se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL, se llevó a la marca de aforo con agua destilada.
- d) Hidróxido de sodio 2N: se pesaron 2.04 g de NaOH, se disolvieron en agua destilada y se llevaron a un aforo de 25 mL.

- e) Dilución Folin-Ciocalteu: se midieron 10 mL del reactivo de FC utilizando una pipeta volumétrica de 10 mL, se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo con agua destilada.
- f) Disolución amortiguadora de fosfatos 0.5 M a pH=7: se pesaron 2.06 g de fosfato de potasio monobásico y 2.6 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado, se mezclaron y disolvieron en 400 mL de agua destilada, se introdujo el potenciómetro en la disolución y se ajustó el pH a 7 agregando gota a gota NaOH 2N y se llevó a un aforo de 500 mL.
- g) Disolución de fluoresceína: se utilizó una disolución stock de 6×10^{-4} M, a partir de ella se preparó una disolución de 6×10^{-5} M y a partir de ella se elaboraron las siguientes disoluciones: 1.5×10^{-7} M, 2.2×10^{-7} M, 3×10^{-7} M las cuales fueron necesarias para llevar a cabo el diseño de experimentos.
- h) Disolución metanol:agua (70:30 v/v): se midieron 70 mL con una pipeta graduada de 100 mL, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada.

En la tabla 5 se presentan los instrumentos y equipo utilizado a lo largo del proceso experimental.

Tabla 5. Equipos, instrumentos utilizados para la determinación de polifenoles totales, y capacidad antioxidante.

Equipo	Marca	Modelo
Trituradora	Pro-Prep	WCG75
Ultrasonido	Branson	250
Baño con ultrasonido	Branson	2510
Centrifugadora	Hettich-Zentrifugen	EBA-20
Balanza analítica	Ohaus	E12140
Potenciómetro	OAKTON	105762
Parrilla con agitación	CIMAREC	SP46925

Determinación de polifenoles totales Folin-Ciocalteu		
Detector UV-Vis	Ocean Optics	USB4000
Bomba	Smatec	RS232
Fibras ópticas 400 μ M	Ocean Optics	-
Válvula de inyección	Rheodyne	-
Tuberías de teflón		
Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FIA		
Fluorímetro fotomultiplicador de tubo con detección en flujo	Fialab	RS232
Baño María	Thermo Scientific Unitylab	2825
Celda de flujo	Hellma	
2 Bombas peristálticas	Ismatec	15M4408 RS232
Tuberías de teflón	-	-
Válvula de inyección	Rheodyne	-
Celda de extracción en flujo con filtro de membrana de polipropileno	Whatman	-
Membrana de polipropileno tamaño de poro 0.45 μ m, 47 mm de diámetro)	Whatman	H714700204478

2.3. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los programas computacionales empleados durante y después del desarrollo experimental fueron: Ocean View, para la cuantificación de polifenoles totales; el programa FIALab para el control de medición y registro de intensidades fluorescentes, que en este caso fueron utilizados para la determinación de la

capacidad antioxidante; Statgraphics Centurion XVI.I para llevar a cabo los diseños de experimentos utilizados y el análisis estadístico junto con Microsoft Excel 2016.

2.4. MUESTRAS ANALIZADAS

2.4.1. Café en grano verde, tostado y bourbon.

Todas las muestras de café fueron de la variedad arábica, el café verde y tostado marca Villarías fueron adquiridos en el expendio López No.68 esquina Ayuntamiento, Colonia Centro. Los tipos de café que se analizaron fueron: verde, claro, mediano, italiano y cubano.

Por otro lado, se trabajó con tres tipos de café marca Finca Las Nieves (Oaxaca) tipo “Single Estate Organic Cofee”: bourbon lavado, bourbon honey y café Single.

Todos los cafés se obtuvieron en forma de grano.



Figura 19. Granos de café Arabica analizados, de izquierda a derecha se muestra el café verde, claro, mediano, italiano y cubano.

2.4.2. Preparación de las muestras

Las muestras de café fueron almacenadas a temperatura ambiente. Cada muestra se molió en una trituradora en un tiempo de 5 minutos por cada 30 g de café, en el caso del café verde fue necesario repetir la operación tres veces hasta obtener una mayor homogeneidad en la muestra. Una vez molido el café fue almacenado en bolsas cerradas ziploc hasta su posterior análisis.

Del café molido se utilizó aproximadamente 0.9 g para cada una de las extracciones, de acuerdo con lo reportado por Salinas 2011.

2.5. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En este trabajo se compararon 3 métodos de extracción con dos extractantes distintos. Cada una de las extracciones se llevó a cabo por triplicado para las distintas muestras de café molido.

2.5.1. Maceración utilizando cafetera de prensa francesa.

Se calentó agua destilada hasta alcanzar 87°C en una parrilla de calentamiento, se pesaron 0.90 g de café (verde, tostado o bourbon) y se añadieron 20 mL de extractante (agua destilada 87°C), se introdujeron en la cafetera y se dejó reposar por 2 minutos.

2.5.2. Agitación magnética y calentamiento.

En este caso se analizaron dos extractantes:

- a) Se calentó agua destilada hasta 87°C, se pesó 0.90 g de cada muestra (café tostados, bourbon lavado/ honey y single); se añadieron 20 mL del extractante, se agitó durante 5 minutos, manteniendo el control de la temperatura.
- b) Se preparó una disolución de metanol: agua (70:30 v/v), se calentó hasta alcanzar una temperatura de 70°C. Se pesó 0.9 g de cada una de las muestras de café, se añadieron 20 mL del extractante y se agitó durante 10 minutos.

2.5.3. Ultrasonido y calentamiento

Para optimizar la extracción por ultrasonido se llevó a cabo un diseño de experimentos.

2.5.3.1. Optimización de la extracción por ultrasonido. Diseño de experimentos.

La extracción con ultrasonido se realizó de forma directa con una sonda de ultrasonido Branson 250 con punta cilíndrica de titanio de 13 mm de diámetro, 20 kHz y 400W de potencia total.

Se realizó un diseño de experimentos para la extracción con ultrasonido, para lo cual se pesó aprox. 0.9 g de café claro utilizando como extractante agua destilada a 87°C, posteriormente se seleccionaron los factores que influyen en

la extracción, véase tabla 6. Se utilizó agua destilada a 87 °C debido a que fue el extractante utilizado en la extracción con cafetera que es el método que se asimila más a las condiciones en las cuales es preparado por los consumidores.

Tabla 6. Factores evaluados del diseño para ultrasonido utilizando una potencia de 45%.

Factores	nivel	
	Inferior (I)	Superior (S)
Tiempo de irradiación (s)	5	10
Tiempo de no irradiación (s)	5	10
Número de ciclos	2	8

Tabla 7. Matriz de diseño de experimentos factorial completo 2^3 con 3 puntos centrales a una potencia de 45%.

No. Experimento	Tiempo de irradiación (s)	Tiempo de no irradiación (s)	Número de ciclos
1	10.0	10.0	8.0
2	5.0	10.0	2.0
3	7.5	7.5	5.0
4	5.0	5.0	2.0
5	7.5	7.5	5.0
6	10.0	5.0	2.0
7	10.0	5.0	8.0
8	10.0	10.0	2.0
9	7.5	7.5	5.0
10	5.0	10.0	8.0
11	5.0	5.0	8.0

Con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion, se construyó la matriz del diseño, con un total de 11 experimentos, la matriz del diseño de experimentos se muestra en la tabla 7.

Con las condiciones óptimas en agua (10 segundos de irradiación, 8 ciclos con 10 segundos de no irradiación a una potencia de 45 %), se evaluaron dos temperaturas de extracción con agua y con metanol:agua.

En este caso se utilizaron 3 extractantes:

- a)** Agua destilada a 25°C: Se pesó aproximadamente 0.90 g de cada muestra de café molida, y se adicionó 20 mL de cada extractante y se introdujo la punta de la sonda en el extractante con la muestra para obtener el extracto.
- b)** Agua a 87°C: Se calentó agua destilada hasta los 87°C en una parrilla de agitación, una vez alcanzada la temperatura se pesó 0.90 g de café y se adicionaron 20 mL de extractante y se introdujo la punta de la sonda.
- c)** Metanol-agua 70:30 v/v a 70°C: Se preparó una disolución de metanol: agua 70:30 v/v, se calentó en una parrilla de agitación a 87°C, se pesó 0.9 g de muestra y se adicionó 20 mL de extractante.

Una vez hechas las extracciones, los extractos fueron filtrados, utilizando papel filtro de filtración lenta para eliminar los residuos de café. El filtrado se llevó a un aforo de 25 mL con el extractante en un matraz volumétrico.

De la solución anterior se tomó una alícuota de 10 mL y se vertió en un tubo de centrifuga, se le añadió 1 mL del reactivo de Carrez I y 1 mL del reactivo de Carrez II. Se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente filtró nuevamente y el extracto obtenido se llevó a un aforo de 10 mL.

A partir de esta solución se llevaron a cabo las diluciones necesarias para la determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu-FIA y capacidad antioxidante por ORAC-FIA.

2.6. Determinación de polifenoles totales en granos de café verde, tostado y bourbon.

2.6.1. Configuración del sistema Folin-Ciocalteu- FIA

Para la determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu mediante FIA, se ocupó la configuración de la figura 20. Se utilizó una bomba peristáltica donde se hace pasar NaOH 0.5 M, y el reactivo de F.C al 10% a un caudal de 1ml/min y agua como portador a 0.8 ml/min. En el primer punto de confluencia se tiene el portador (agua destilada), el reactivo de F.C al 10% y la muestra; esta mezcla confluye en un segundo punto con NaOH 0.5 M que brinda el medio básico necesario para que se lleve a cabo la reacción.

La reacción se llevó a cabo en un reactor de 100 cm de largo y 0.5 mm de diámetro interno para finalmente pasar por el sistema de detección espectrofotométrico. La señal fue medida a una longitud de onda de 730 nm y el registro se llevó a cabo utilizando el programa Ocean Optics.

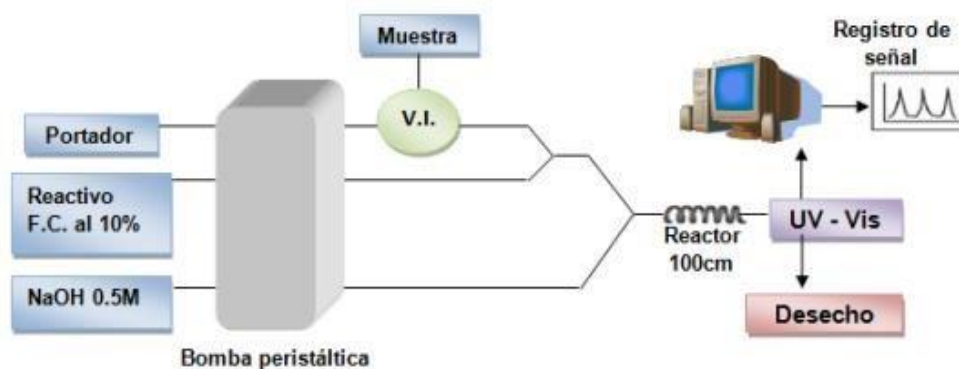


Figura 20. Configuración de diagrama FIA para Folin-Ciocalteu. Donde VI= válvula de inyección y F.C= Folin-Ciocalteu (Escutia, L 2011).

Previo al análisis, cada uno de los reactivos se sonicó en un baño de ultrasonido por aproximadamente 15 minutos para evitar la presencia de burbujas al momento del análisis. La determinación de cada muestra se hizo por triplicado.

Se elaboraron dos curvas de calibración, una de ácido clorogénico de 15 mg/L a 200 mg/L y una de ácido cafeico de 12.5 mg/L a 150 mg/L.

2.6.2 Curva de calibración de ácido clorogénico y ácido cafeico para la determinación de polifenoles totales

De acuerdo a la referencia utilizada, para la elaboración de las curvas de calibración se utilizó una disolución madre de ácido clorogénico de 500 ppm y de 625 ppm de ácido cafeico, empleando matraces volumétricos de 25 mL, se prepararon disoluciones estándar en un intervalo lineal de 15 mg/L a 200 mg/L para ácido clorogénico y 12.5 mg/L a 150 mg/L para ácido cafeico, en ambos casos fueron preparadas de la solución más diluida a la más concentrada. Cada una de las curvas se realizó por triplicado haciendo 3 inyecciones para cada uno de los estándares.

2.7. Determinación de la capacidad antioxidante en granos de café verde, tostado y bourbon lavado y honey

2.7.1. Configuración del sistema ORAC-FIA

Para la evaluación de la capacidad antioxidante, se implementó la configuración ORAC-FIA mostrada en la figura 21.

Mediante una bomba peristáltica y tuberías de teflón se impulsaron los reactivos SAF (solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M a pH 7), AAPH, fluoresceína y la muestra. En el primer punto de confluencia se mezcló SAF 0.5 M con el antioxidante utilizado (muestra), en un segundo punto de confluencia, B, confluyen la muestra anterior y fluoresceína 1.5×10^{-7} M con el reactivo inyectado, en este caso AAPH 0.05M.

La reacción se llevó a cabo en un reactor de 340 cm a 37°C, cuya temperatura fue controlada durante el análisis con un baño de agua. La reacción pasó a una celda de extracción conectada a una bomba peristáltica (la cual tenía aire recirculando) para evitar la introducción de microburbujas a la configuración FIA, con una membrana de polipropileno que evita el paso de soluciones acuosas, pero permite el paso de N₂ producido. El producto de reacción fue medido en un detector de fluorescencia PMT-FL-FIAlab.

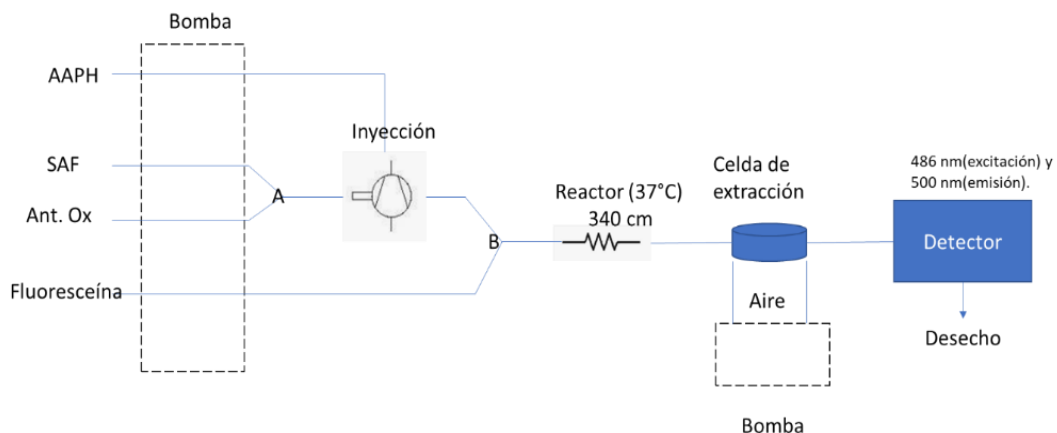


Figura 21. Configuración de diagrama FIA para ORAC. Donde A es el primer punto de confluencia, B es el segundo punto de confluencia.

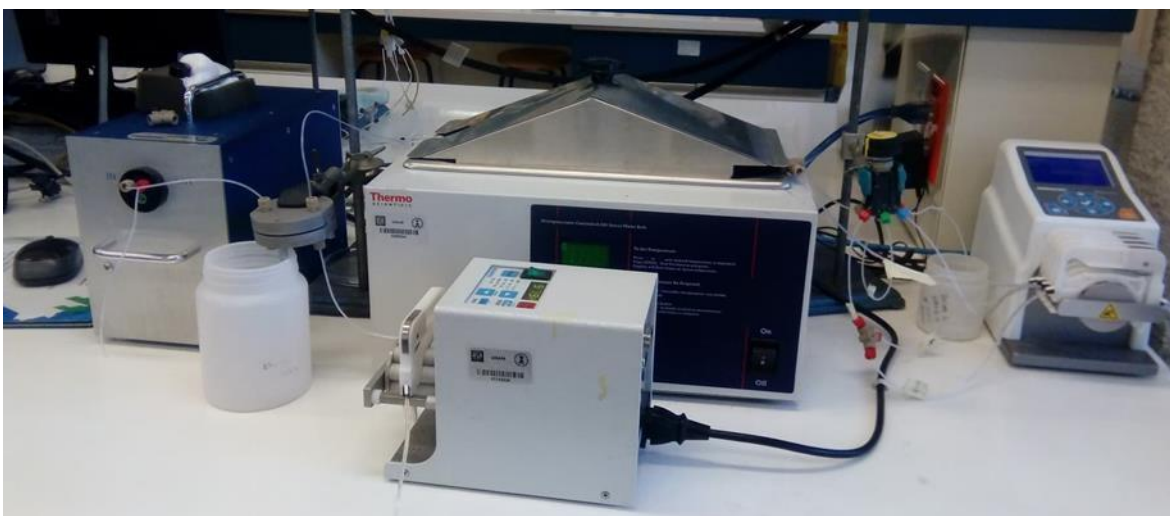


Figura 22. Configuración utilizada ORAC-FIA.

2.7.2. Optimización del método ORAC-FIA.

Jiménez (2019), estableció las condiciones de reacción (concentración de los reactivos utilizados, temperatura y caudal) para este tipo de análisis; sin embargo, al cambiar la configuración del sistema fue necesario llevar a cabo una re-optimización de las condiciones antes mencionadas.

Por ello, fue necesario asegurar que se estaba llevando a cabo la reacción, para lo cual se inyectó AAPH y posteriormente se utilizaron distintas concentraciones de ácido

cafeico para asegurar que el antioxidante utilizado estaba protegiendo de la oxidación a la fluoresceína.

Las condiciones de reacción fueron optimizadas mediante dos diseños de experimentos, en cada uno de ellos se evaluaron dos factores de respuesta: señal obtenida al inyectar AAPH (mayor área) y una mejor protección al utilizar un estándar de ácido cafeico 50 μM (menor área).

En el primer diseño de experimentos se evaluaron los factores enlistados en la tabla 8.

Tabla 8. Factores evaluados del diseño.

Factores	ivel	
	Inferior	Superior
Volumen de inyección (μL)	50	70
Velocidad del caudal mL/min	0.5	0.8
Temperatura de reactor $^{\circ}\text{C}$	40	55
[AAPH] (mol/L)	0.03	0.05
[Fluoresceína](nmol/L)	150	300

Se realizó un diseño de experimentos factorial, fraccionado $(1/4) 2^5$ con 3 puntos centrales utilizando el software STATGRAPHICS Centurion y se construyó la matriz del diseño (tabla 9).

Tabla 9. Matriz de diseño de experimentos factorial fraccionado $(1/4) 2^5$ con 3 puntos centrales.

No. Experimento	Volumen de inyección μL	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Caudal μL	[AAPH] (mol/L)	[Fluoresceína] (mol/L)
1	100	40.0	0.80	0.03	3.00×10^{-7}
2	50	55.0	0.50	0.03	3.00×10^{-7}
3	75	47.5	0.65	0.04	2.25×10^{-7}
4	50	55.0	0.80	0.03	1.50×10^{-7}
5	100	55.0	0.50	0.05	1.50×10^{-7}
6	50	40.0	0.80	0.05	1.50×10^{-7}
7	50	40.0	0.50	0.05	3.00×10^{-7}
8	75	47.5	0.65	0.04	2.25×10^{-7}
9	100	40.0	0.50	0.03	1.50×10^{-7}
10	75	47.5	0.65	0.04	2.25×10^{-7}
11	100	55.0	0.80	0.05	3.00×10^{-7}

Después de realizar el análisis estadístico, se obtuvieron como factores óptimos, una concentración de fluoresceína (150 nmol/L) y la velocidad de caudal (0.05 mL/min). Para evaluar el efecto de los factores restantes se realizó un segundo diseño de experimentos manteniendo constantes tanto la concentración de fluoresceína como la velocidad de caudal (tabla 10).

Tabla 10. Factores evaluados del diseño factorial 2^3 con 3 puntos centrales

Factores	Nivel	
	Inferior	Superior
Volumen de inyección (μL)	50	70
Temperatura de reactor $^{\circ}\text{C}$	40	55
[AAPH] (mol/L)	0.03	0.05

En la tabla 11 se muestra la matriz del diseño obtenida con el software STATGRAPHICS para el diseño de experimentos factorial completo 2^3 , con 3 puntos centrales.

Tabla 11. Matriz de diseño de experimentos factorial 2^3 con 3 puntos centrales

No. Experimento	Volumen de inyección μL	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	[AAPH]
1	100	50	0.03
2	50	40	0.03
3	50	50	0.03
4	50	40	0.05
5	50	50	0.05
6	75	45	0.04
7	100	40	0.03
8	100	40	0.05
9	100	50	0.05
10	75	45	0.04
11	75	45	0.04

2.7.3. Elaboración de la curva de calibración de trolox para la determinación de la capacidad antioxidante

Previo a la construcción de la curva de calibración se estimó el intervalo lineal, para lo cual se prepararon estándares de trolox y de ácido cafeico desde $0.5 \mu\text{mol/L}$ a $70 \mu\text{mol/L}$ a partir de una disolución stock de $250 \mu\text{M}$. El intervalo lineal establecido fue de 1 a $7 \mu\text{M}$ para trolox y 5 a $70 \mu\text{M}$ para ácido cafeico. Empleando matraces volumétricos de 25 mL se prepararon los estándares a partir de la disolución stock antes mencionada los cuales se analizaron por triplicado en el sistema ORAC.

2.8. Determinación de ácido clorogénico en los extractos de café por HPLC-DAD

Tabla 12. Gradiente de elución utilizado para analizar las muestras de café.

Tiempo (min)	CH ₃ COOH (0.2%)	Metanol
0	87	13
15	85	15
16	74	26
21	74	26
29	40	60
36	40	60
37	30	70
40	30	70
41	0	100
44	0	100
45	87	13
48	87	13

Para la cuantificación de ácido clorogénico en los distintos extractos de café verde y tostados se empleó una columna Pursuit C18 de 5 µm (150x4,6 mm), con flujo de 1 mL/min y el gradiente indicado en la tabla 12, utilizando un detector de arreglo de diodos.

Se determinó la presencia de los siguientes compuestos a 4 diferentes longitudes de onda (260, 280, 290 y 320 nm) (tabla 12).

Tabla 12. Longitud de onda y tiempo de retención para cada compuesto.

Estándar	TR (min)	λ (nm)
3,4 ácido dihidroxibenzoico	6.25	260
1,2 dihidroxibenceno	7.467	280
ácido 4-hidroxibenzoico	11.07	260
Ácido clorogénico	13.847	320
4 hidroxibenzaldehido	14.06	280
Ácido vanílico	15.787	260
Ácido cafeico	17.793	320
Vainillina	19.307	280
Ácido transferúlico	25.767	320
Ácido sináptico	26.333	320
Naringenina	31.867	290
Bisfenol A	34.72	280

Para la interpretación de los resultados de HPLC, se utilizó el área de cada uno de los picos, y empleando la ecuación de la recta de cada una de las curvas de calibración para cada estándar, se realizó una interpolación, obteniendo así la concentración de cada uno de los polifenoles en el extracto.

3. Resultados y discusión de resultados 3.1. Curvas de calibración de ácido clorogénico y ácido cafeico por Folin-Ciocalteu.

De acuerdo con la literatura el contenido de polifenoles totales en café se expresa en equivalentes de ácido cafeico y ácido clorogénico al utilizar el método de Folin Ciocalteu, por ello se decidió preparar curvas de calibración de estos dos estándares. En la figura 23 se muestra uno de los diagramas obtenidos para la curva de ácido clorogénico.

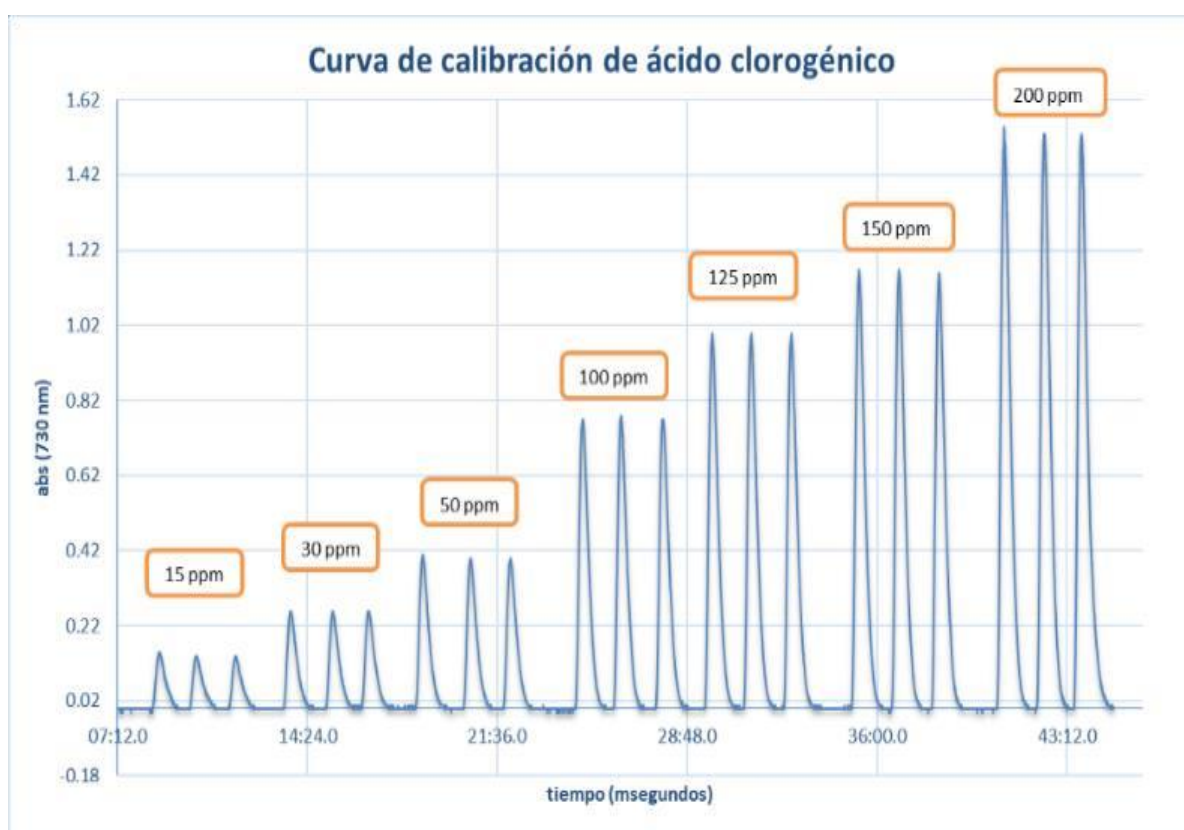


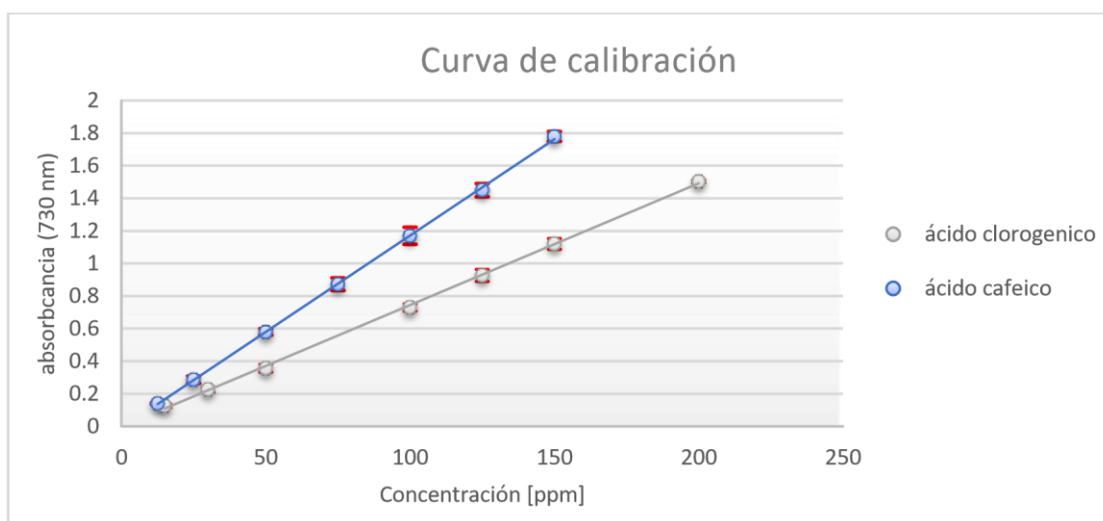
Figura 23. Diagrama de ácido clorogénico.

Para la obtención de la absorbancia de cada una de las concentraciones utilizadas, se tomó en cuenta el valor de absorbancia en el punto máximo de cada pico. Cada una de las curvas de calibración se realizó por triplicado. En la tabla 12 se presentan las concentraciones promedio obtenidas para cada uno de los estándares de las distintas curvas de calibración.

Tabla 12. Absorbancias promedio obtenidas para cada estándar.

	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	125 ppm	150 ppm
Ácido cafeico	0.14±0.005	0.29±0.022	0.58±0.020	0.87±0.039	1.17±0.052	1.45±0.040	1.78±0.030
	15 ppm	30 ppm	50 ppm	100 ppm	125 mgL ⁻¹	150 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Ácido cafeico	0.13±0.012	0.23±0.017	0.36±0.024	0.73±0.023	0.93±0.037	1.12±0.034	1.50±0.009

A las curvas de calibración (figura 24) se les realizó la regresión lineal correspondiente, obteniéndose los parámetros estadísticos de la tabla 13 tanto para el ácido clorogénico como para el ácido cafeico.

**Figura.** Curvas de calibración de ácido cafeico y ácido clorogénico.**Tabla 13.** Parámetros estadísticos de la curva de calibración.

Estándar	Pendiente	Ordenada al origen	R ₂	Límite de detección	Intervalo lineal
Ácido clorogénico	0.0075±0.000077	0.0024±0.0088	0.9994	6.11 ppm	15-200 ppm
Ácido cafeico	0.0118±0.000092	0.0113±0.0083	0.9997	3.23 ppm	12.5-150 ppm

3.2. Optimización del método ORAC-FIA.

3.2.1. Señal obtenida mediante el método ORAC-FIA. Cuantificación por el método del trapecio.

El ensayo ORAC se fundamenta en la capacidad de reacción del AAPH con la fluoresceína, en este caso se tienen picos negativos que disminuyen por debajo de la línea base (Figura 25) al incrementar la concentración de antioxidante utilizado, a causa de que el peroxilo formado capta un átomo de hidrogeno de la fluoresceína ocasionando un decaimiento de la intensidad fluorescente (Jiménez 2019).

En la figura 25, se presenta un ejemplo de cada uno de los picos obtenidos al inyectar tres concentraciones diferentes de trolox. Se observa que entre mayor sea la concentración de antioxidante, el área disminuye.

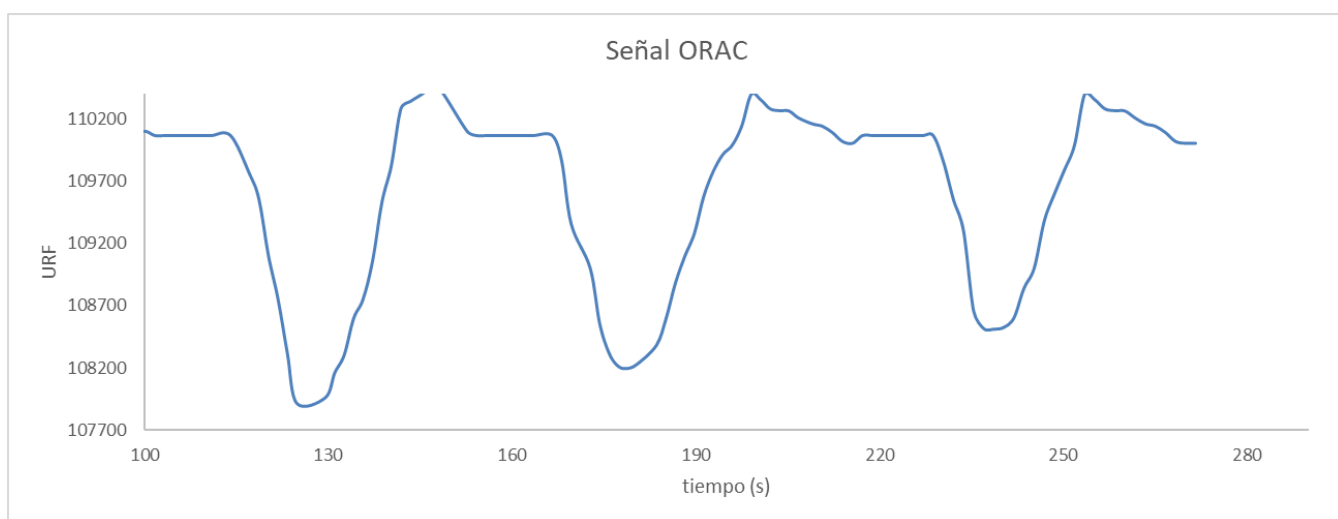


Figura 25. Ejemplo de señal obtenida en ORAC, donde URF indica intensidad de fluorescencia.

Para cuantificar el grado de reacción se utilizó el método del trapecio basado en la interpolación lineal para la obtención de áreas, de acuerdo con la fórmula. $f^{n+1} + f^n$

$$A = (x_{n+1} - x_n) \left(\frac{f^{n+1} + f^n}{2} \right)$$

Ecuación 2.

Donde x corresponde al intervalo de tiempo transcurrido y f al valor de intensidad fluorescente obtenido en cada intervalo de tiempo.

3.2.2. Optimización del sistema ORAC-FIA.

Para la optimización de las condiciones de reacción, se tomaron en cuenta dos factores de respuesta:

- 1) Una mayor área obtenida al inyectar un blanco de [AAPH].
- 2) Una mayor protección obtenida al introducir al sistema un estándar de ácido cafeico de 50 μM .

Para el blanco de AAPH, se realizó un análisis estadístico ANOVA (tabla 14), con el fin de identificar de qué manera repercuten las condiciones de reacción, considerando como mejor respuesta la mayor área para el blanco de AAPH.

La tabla 14 muestra que hay diferencia significativa en los parámetros utilizados; para identificar de qué manera interfiere cada variable se utilizó el diagrama de Pareto el cual permite visualizar cuál de los factores tiene un mayor impacto sobre el resultado, cuando uno de los factores estudiados traspasa la línea vertical que representa el test de 95% de significancia, quiere decir que tienen un efecto considerable en la extracción (Escutia 2011).

De acuerdo con la figura 26, el factor que interfiere de manera positiva es la temperatura, es decir, al aumentar la temperatura se tiene mayor área para el blanco de AAPH.

Tabla 14. Análisis de varianza para determinar los parámetros óptimos en la inyección de un blanco AAPH

Análisis de varianza para área					
Fuente	Suma de cuadrados	G. L	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
A: volumen de inyección	3.46×10^8	1	3.45×10^8	0.08	0.8716
B: temperatura	3.67×10^{10}	1	3.68×10^{10}	0.72	0.5521
C: caudal	4.84×10^9	1	4.84×10^9	0.48	0.6151
D: [AAPH]	5.27×10^8	1	5.27×10^8	0.36	0.6568
E: [fluoresceína]	7.54×10^9	1	7.54×10^9	0.1	0.8084
Error total	2.06×10^{10}	5	4.13×10^9	0.0	0.9648
Total (corr.)	7.07×10^{10}	10			

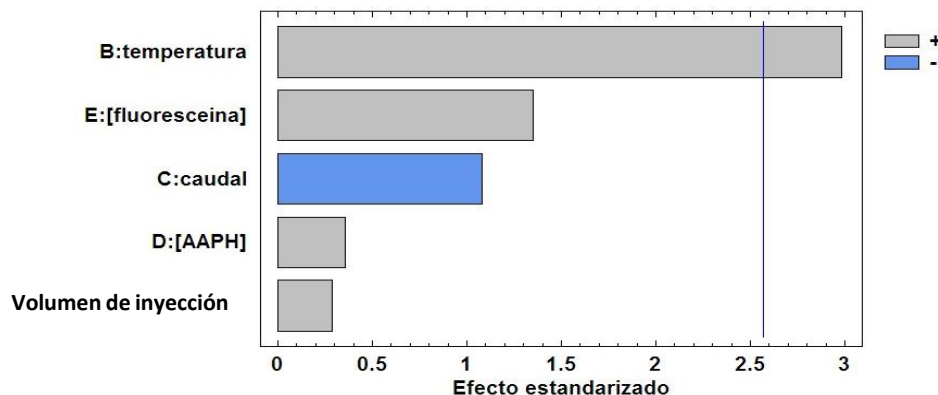


Figura 26. Diagrama de Pareto para el blanco de AAPH por el método ORAC-FIA.

Uno de los estándares más utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante mediante ORAC es el trolox, sin embargo, también pueden ser utilizados otros estándares como el ácido cafeico que presenta un comportamiento similar (Jiménez, W 2019), por lo que para la realización de pruebas se utilizó ácido cafeico.

Se realizó el análisis estadístico ANOVA (tabla 15) y se encontró que para el porcentaje de protección con un estándar de ácido cafeico de 50 μM hay diferencia significativa tanto en la concentración de AAPH como en la concentración de fluoresceína.

Tabla 15. ANOVA para %protección con ácido cafeico 50 μM para el diseño experimental de la Tabla 8, de acuerdo con la matriz presentada en la tabla 9.

Análisis de varianza para % de protección con ácido cafeico 50 μM					
Fuente	Suma de cuadrados	G. L	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
A: volumen de inyección	226.793	1	226.739	3.89	0.1057
B: temperatura	357.113	1	357.113	6.12	0.0563
C: caudal	256.172	1	256.172	4.39	0.0903
D: [AAPH]	613.726	1	613.726	10.52	0.0229
E: [fluoresceína]	493.765	1	493.765	8.46	0.0334
Error total	291.716	5	58.3433		
Total (corr.)	2239.23	10			

De acuerdo con el diagrama de Pareto (figura 27), al igual que en el caso anterior, la temperatura interfiere de manera positiva, pero en este caso no es significativo como lo son la concentración de fluoresceína y la concentración de AAPH utilizada ya que, al aumentarla se tiene una mayor protección con el antioxidante empleado.

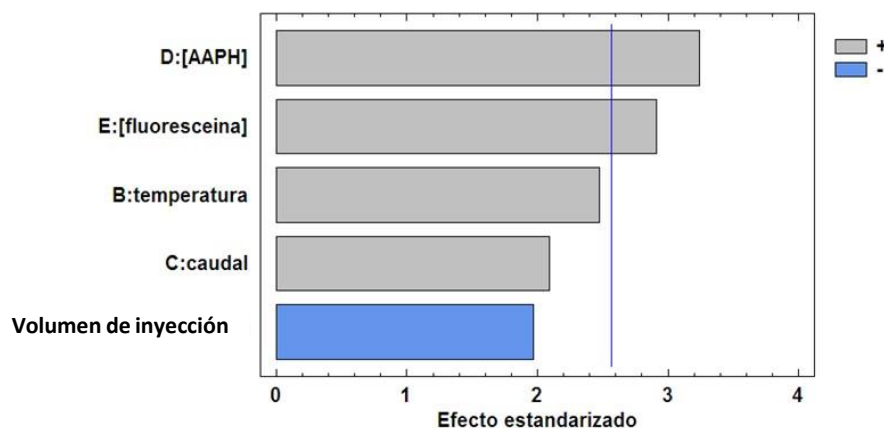


Figura 27. Diagrama de Pareto para el %protección con ácido cafeico 50 μM por el método ORAC-FIA.

Después de comparar los resultados de los dos factores de respuesta obtenidos para el diseño de experimentos (tabla 8 y 9) se obtuvieron los siguientes valores óptimos: temperatura de 55°C, concentración de fluoresceína 150 nmol/L y caudal de 0.05 mL/ min para los portadores (SAF, muestra y fluoresceína).

Al llevar a cabo los análisis a 55°C se presentó una alta producción de burbujas que interfirieron en el análisis, por lo que se optó disminuirla de 37-45°C en un segundo diseño, en el cual los parámetros óptimos anteriormente mencionados se mantuvieron constantes, en la tabla 16 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 16. ANOVA para blanco de AAPH de acuerdo con la matriz de diseño de la tabla 11

Análisis de varianza para AAPH					
Fuente	Suma de cuadrados	G. L	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
A: volumen de inyección	2.34x10 ⁷	1	2.34x10 ⁷	0.45	0.5253
B: temperatura	481867	1	481867	0.01	0.9263
C: [AAPH]	7.32x10 ⁷	1	7.32x10 ⁷	1.40	0.2756
Error total	3.66x10 ⁸	7	5.235x10 ⁷		
Total (corr.)	4.63x10 ⁸	10			

Al igual que el diseño anterior, se analizaron dos factores de respuesta, en la Tabla 17 se indica que tanto para blanco de AAPH como para el % de protección con ácido cafeico a 50 μM no hay diferencia significativa respecto a cada uno de los parámetros utilizados, sin embargo, para corroborar lo anterior e identificar la influencia de cada parámetro se realizó el diagrama de Pareto.

Tabla 17. ANOVA para %protección con ácido cafeico de 50 μM

Análisis de varianza para AAPH					
Fuente	Suma de cuadrados	G. L	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
A: volumen de inyección	0.546	1	0.546	0.01	0.9432
B: temperatura	18.090	1	18.090	0.18	0.6837
C: [AAPH]	32.361	1	32.361	0.32	0.5877
Error total	701.779	7	100.254		
Total (corr.)	752.776	10			

Por su parte, para conocer los factores óptimos de trabajo, se analizaron los diagramas de Pareto tanto para el primer diseño (figura 28) como para el segundo (figura 29); en ellos observa que, si bien no hay diferencia significativa en los parámetros utilizados, se tienen como óptimos temperatura de 37°C, volumen de inyección de 100 μL y concentración de AAPH de 0.05 M. De esta manera tienen como parámetros óptimos finales 37°C, 0.05 M [AAPH], fluoresceína 150 nmol/L,

caudal de 0.03 mL/ min para inyección de AAPH y de 0.05 mL/ min para los portadores.

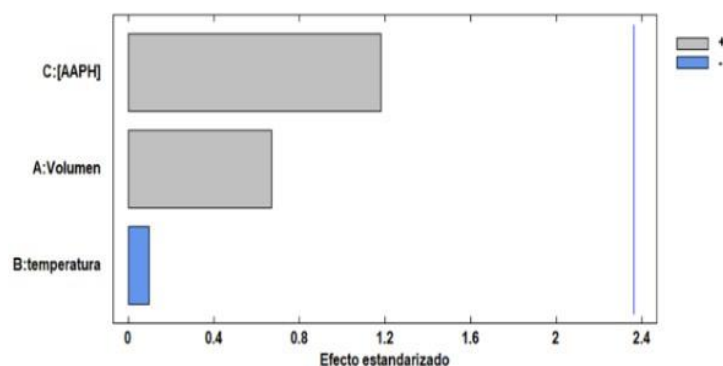


Figura 28. Diagrama de Pareto para blanco de AAPH por el método ORAC-FIA.

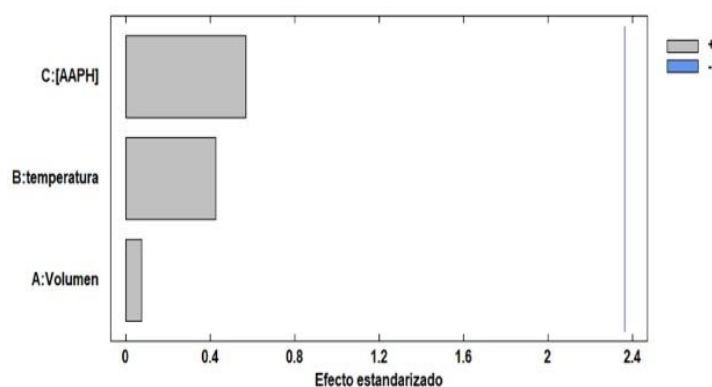


Figura 29. Diagrama de Pareto para % protección con ácido cafeico 50 µM por el método ORAC-FIA.

3.2.3. Curva de calibración de trolox por ORAC.

A pesar de que los parámetros de reacción se determinaron utilizando como estándar el ácido cafeico, se realizó la curva de calibración de trolox porque como se ha mencionado anteriormente, es el estándar más utilizado en la determinación de capacidad antioxidante en alimentos debido a la similitud de este reactivo con la vitamina E (Bresca, 2012) (figura 30).

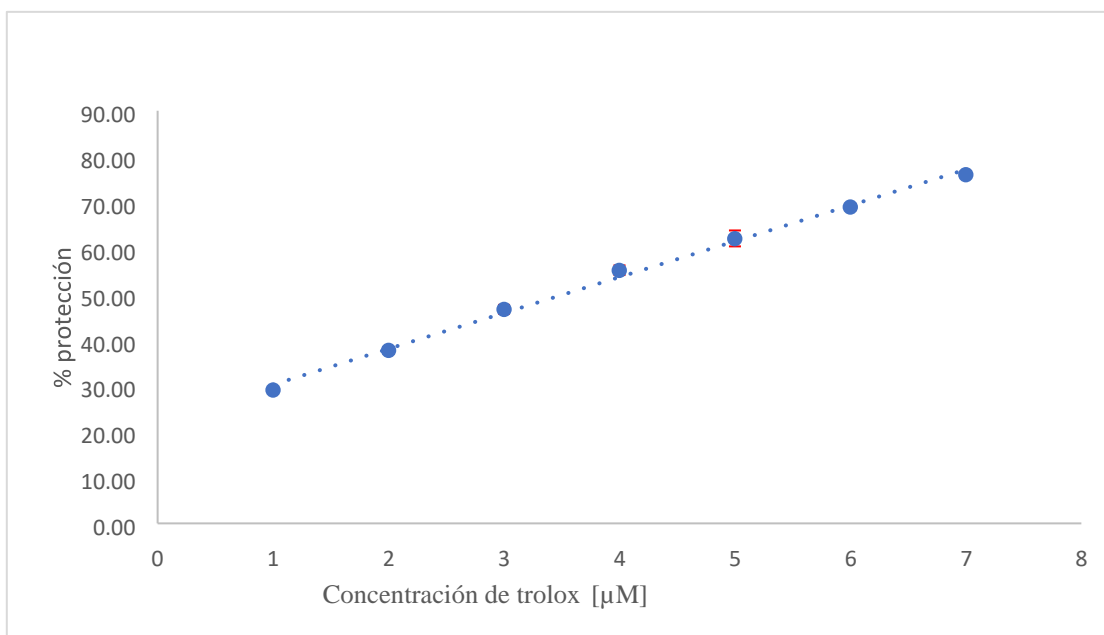


Figura 30. Curva de calibración de trolox por ORAC-FIA a las condiciones óptimas establecidas.

Después de realizar la correlación lineal se obtuvieron los parámetros estadísticos indicados en la tabla 18.

Tabla 18. Parámetros estadísticos de la curva de calibración.

Estándar	Pendiente	Ordenada al origen	R ₂	Límite de detección	Intervalo lineal
Trolox	7.8196±0.209	22.437±0.933	0.99650	0.4661 μM	1-7 μM

3.3. Evaluación de los métodos de extracción

El objetivo de determinar el mejor método de extracción es tener mayor remoción de los compuestos fenólicos, además, no sólo permite separar los compuestos de interés de la matriz, sino que también elimina sustancias que puedan interferir en las lecturas (Escutia, 2011).

Al realizar cada uno de los métodos de extracción se observó la presencia de turbidez después de realizar el último paso en las extracciones, principalmente en

el café verde, por lo que se decidió llevar a cabo una segunda filtración; a pesar de esto siguió presentando el mismo problema. Con el fin de eliminar la turbidez se empleó el reactivo de Carrez.

Los reactivos de Carrez precipitan a los polisacáridos, a las proteínas solubles y a otros compuestos coloidales que se encuentran en el café (Long et al. 1997). Después de utilizar estos reactivos, las muestras analizadas no presentaron turbidez. Para corroborar el efecto de la turbidez en las lecturas, se realizaron las mismas extracciones sin el uso del reactivo de Carrez, obteniendo aproximadamente 20% más en la concentración de polifenoles reportada que cuando no se utilizó, corroborando así la utilidad del reactivo de Carrez en la determinación de interferencias.

Se sabe que el índice de polifenoles totales es una primera aproximación para estimar un índice de antioxidantes totales, por lo que es importante contar con un método que permita hacer una cuantificación de polifenoles totales (Escutia, 2011). La optimización de los métodos de extracción se realizó tanto para la cuantificación de polifenoles totales como para la determinación de capacidad antioxidante y el ácido clorogénico, para así poder identificar el mejor método de extracción.

3.4. Extracción por maceración en cafetera de prensa francesa.

El grano de café contiene diferentes sustancias bioactivas y la cantidad de estas variarán en el extracto de café dependiendo de la técnica de extracción utilizada. Si se desea conocer el contenido real de sustancias bioactivas en una taza de café y así saber lo que el ser humano ingiere, se deben extraer dichas sustancias con agua caliente, que es el método tradicional de preparación del café para consumo (Vega, 2018); debido a ello, se decidió realizar la extracción en cafetera a 87°C, que son las condiciones más similares al método de preparación para consumo humano y de esta manera tener un estimado de lo que se ingiere en una taza.

En el caso del café verde, fue necesario determinar el contenido de humedad del grano, mediante termobalanza y estufa, de acuerdo con la norma. Los resultados se muestran a continuación (tabla 19).

Tabla 19. Contenido de humedad en café verde Arabica

% Humedad		
	Estufa	Termobalanza
Muestra de café molida	13.66±0.12	12.08±0.03
Semilla de café Arabica	11.66±0.48	11.85±0.07

Como se puede observar en la tabla 19, se tiene una humedad promedio de 12.08 % en la muestra de café verde molido, la cual coincide con el valor de 10-12% reportado por (Belitz, 2014).

Los resultados obtenidos para polifenoles utilizando cafetera a 87°C como método de extracción se muestran en la figura 31.

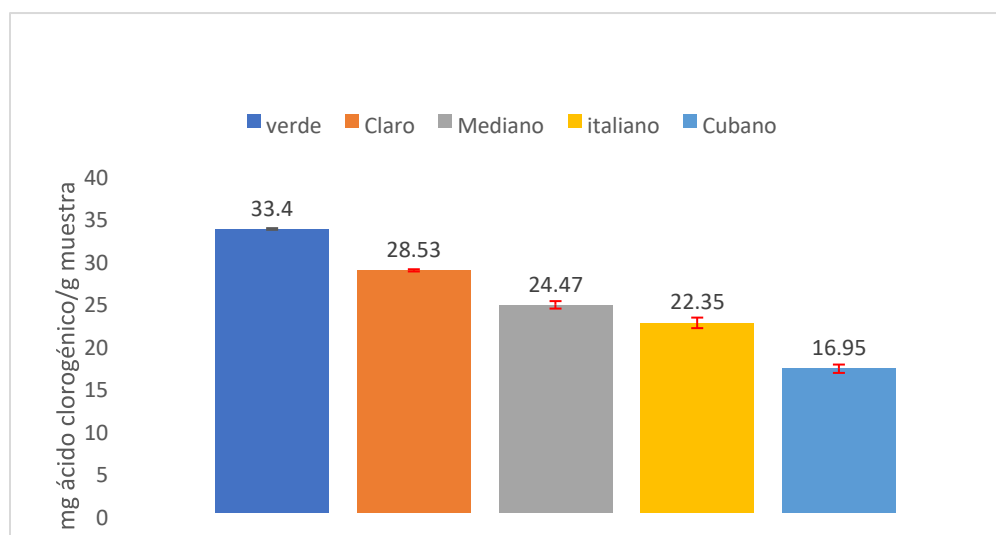


Figura 31. Contenido de polifenoles totales en muestras de café Arábica extraídos por maceración.

En la figura 31 se presenta el contenido de polifenoles totales para café verde y 4 distintos tostados, en los que se observa una disminución del contenido respecto al tiempo de tostado, siendo mayor en el café verde con 33.40 ± 0.10 mg ácido clorogénico/ g muestra y menor en el café cubano con 16.95 ± 0.49 .

De la misma manera, se determinó el contenido de polifenoles totales en tres tipos de café Bourbon. De acuerdo con la figura 32 el café bourbon honey presenta un mayor contenido de polifenoles respecto a las variedades Single y Bourbon lavado. La principal diferencia radica en el proceso de secado y fermentación, en el café lavado es removida la cáscara y posteriormente es sometido a un proceso de lavado por lo que es removido el mucílago y posteriormente secado, a diferencia del café honey, en el cual se retira la cáscara y es secado sin remover el mucílago.

Por su parte, la diferencia principal entre el café bourbon lavado y single radica únicamente en la calidad del café (de acuerdo al proveedor), sin embargo, de acuerdo a la figura 32, esta diferencia influye en el contenido de polifenoles totales debido a que el café bourbon lavado presenta 13.07 mg ácido clorogénico /g de muestra más que el café single.

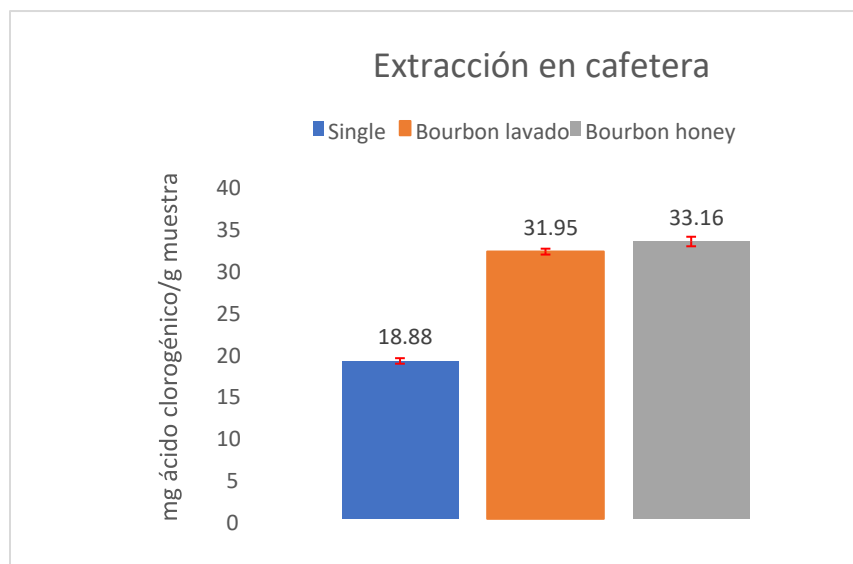


Figura 32. Contenido de polifenoles totales en muestras de café Bourbon.

Así mismo, se determinó la capacidad antioxidante por el método ORAC-FIA; los resultados se muestran en la tabla 20.

De acuerdo a la tabla 20, el contenido de polifenoles totales en café honey es cercano al café verde; por ello, se deduce que el contenido de polifenoles depende del proceso de secado en las muestras de café Arabica tostadas mediante un método general como lo es el secado natural, en el cual no es removida la cáscara hasta después del secado se observó una menor calidad del café obtenido en cuanto al contenido de polifenoles totales.

Por su parte, el contenido de trolox como una medida capacidad antioxidante en las muestras, presentó la misma tendencia que se observó en el contenido de polifenoles totales, es decir, tiende a disminuir al aumentar el tiempo de tostado. Por lo tanto, es posible decir que la temperatura y el tiempo de tostado afectaron la estabilidad de los polifenoles totales y por ello de los que confieren la capacidad antioxidante.

Tabla 20. Contenido de polifenoles totales en muestras de café.

Extracción maceración 87°C en cafetera		
	FOLIN-CIOCALTEU	ORAC
Café	mg clorogénico /g muestra	μmol trolox/g muestra
Verde	33.40±0.10	0.293±0.006
Claro	28.53±0.13	0.244±0.008
Mediano	24.47±0.44	0.237±0.008
Italiano	22.35±0.62	0.218±0.013
Cubano	6.95±0.49	0.110±0.002
Single	18.88±0.33	0.094±0.005
Bourbon lavado	31.95±35	0.252±0.005
Bourbon honey	33.16±0.57	0.237±0.008

3.4.2. Extracción por maceración con agitación magnética.

Se probó la extracción por agitación magnética para identificar si se lograba una mayor extracción de los compuestos polifenólicos, para lo cual se utilizaron 2 diferentes extractante a 87 °C y 70 °C.

No es posible utilizar temperaturas mayores debido a que esto ocasiona una degradación de algunos polifenoles; además, al trabajar a temperaturas mayores a la ebullición, y disminuye la cavitación y se puede producir la degradación de los analitos, por esta razón para la extracción empleando ultrasonido se emplearon las dos temperaturas anteriormente indicadas.

Para determinar el efecto del tipo de extracción, se utilizaron las mismas condiciones que en la extracción con cafetera (agua a 87°C) por un tiempo de 5 minutos. En la tabla 21 se observa que al llevar a cabo la extracción con agua por agitación magnética se tiene un aumento del 5 al 8% respecto al uso de cafetera con el mismo extractante, es decir que al utilizar agitación magnética y utilizar un mayor tiempo de extracción aumentan los polifenoles totales y compuestos responsables de capacidad antioxidante.

Tabla 21. Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en muestras de café Arábica extraídos por agitación magnética.

Agitación magnética				
Metanol: agua (70:30 v/v) 70°C/ 10 minutos			Agua 87°C/ 5 minutos	
	FOLIN -CIOCALTEAU	ORAC	FOLIN -CIOCALTEAU	ORAC
	mg clorogénico /g muestra	μM trolox/g muestra	mg clorogénico /g muestra	μmol trolox/g muestra
Café Verde	37.27±0.70	0.342±0.002	34.87±0.79	0.302±0.012
Claro	31.28±0.60	0.271±0.007	29.99±0.56	0.254±0.006
Mediano	28.27±0.59	0.263±0.002	26.28±0.72	0.247±0.001
Italiano	26.32±0.82	0.233±0.003	23.99±0.15	0.221±0.003
Cubano	19.73±0.23	0.138±0.011	17.44±0.73	0.123±0.002
Single	16.97±0.21	0.165±0.002	20.27±0.34	0.186±0.003
Bourbon lavado	31.49±0.53	0.286±0.006	35.18±0.4	0.301±0.009
Bourbon honey	33.50±0.52	0.302±0.007	37.05±0.55	0.314±0.015

Para identificar el efecto del extractante utilizado se decidió emplear una disolución de metanol:agua (70/30 v/v) a 70°C por 10 minutos, que, al presentar una mayor afinidad a compuestos fenólicos por ser un disolvente orgánico, se espera una mejor

extracción. En la Tabla 21 y figura 33, se observa que, al usar una misma técnica de extracción, pero cambiando el extractante se obtiene una mayor concentración tanto de polifenoles totales de 5 al 8%, como de capacidad antioxidante del 10 al 15%, sin embargo, el análisis estadístico realizado indica que no hay diferencia significativa en cuanto al tipo de extractante utilizado por extracción magnética (tabla 22).

Tabla 24. ANOVA para los tres métodos de extracción por ultrasonido.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	G. L	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0036	1.00	0.0036	7.13x10 ⁻⁵	4.60
Dentro de los Grupos	706.76	14.00			
Total	706.761	15.00	50.48		

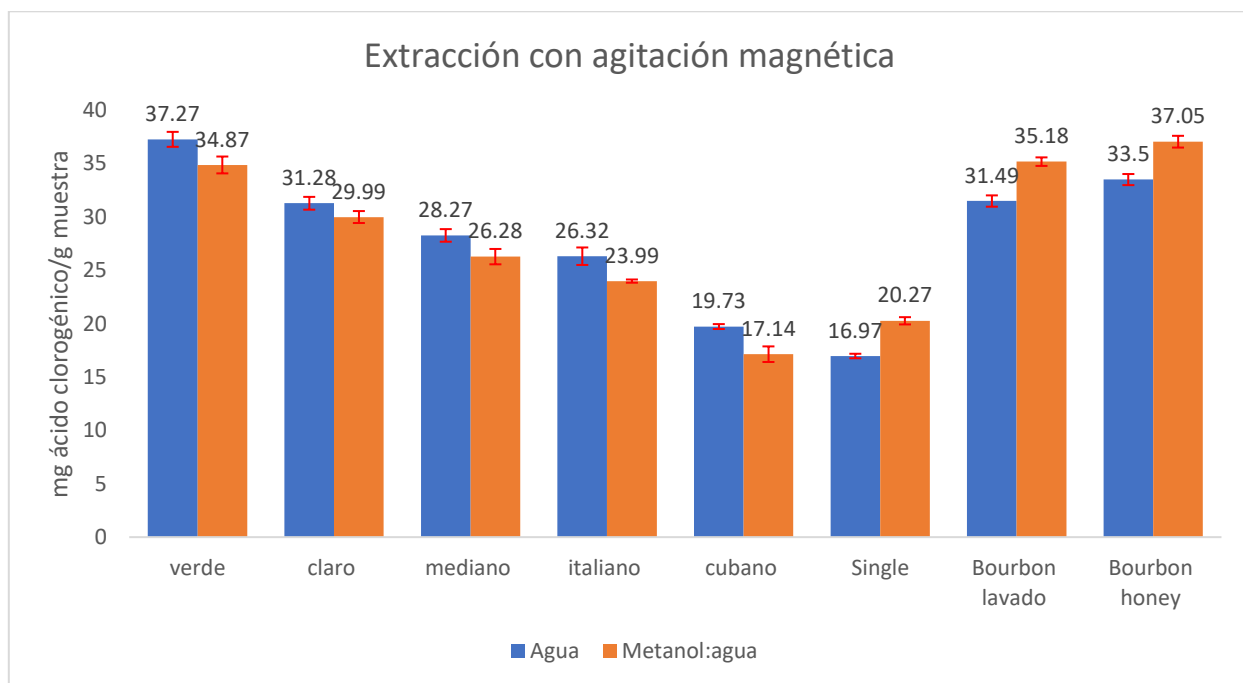


Figura 33. Contenido de polifenoles totales en muestras de café extraídos por agitación magnética con agua 87°C y metanol:agua 70:30 % v/v.

Con respecto a la extracción utilizando como extractante metanol: agua (70:30 v/v) (tabla 21), se observó un aumento del 11-15 % comparado con cafetera (tabla 20, figura 32) en polifenoles totales y del 12 al 15 % en cuanto a capacidad antioxidante.

3.4.3. Diseño de experimentos para optimizar las condiciones de extracción por ultrasonido.

Por otro lado, para mejorar la eficiencia del método de extracción por agitación magnética anteriormente empleada, se realizó la extracción de polifenoles totales y la determinación de la capacidad antioxidante utilizando una sonda de ultrasonido, para lo cual se evaluaron los dos extractantes empleados en la extracción por agitación magnética.

Para optimizar las condiciones de extracción se utilizó agua a 87°C como extractante.

De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA (tabla 23) no hubo diferencia significativa entre los factores evaluados: tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y número de ciclos.

Tabla 23. Análisis de varianza para la optimización de la extracción por ultrasonido

Análisis de varianza para concentración					
Fuente	Suma de cuadrados	G. L	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
A: tiempo de irradiación	8588948	1	858948	0.04	0.8716
B: no irradiación	1.47E+07	1	1.48E+07	0.72	0.5521
C: ciclos	9.81E+06	1	9.81E+06	0.48	0.6151
AB	7.36E+06	1	7.36E+06	0.36	0.6568
AC	2.07E+06	1	2.07E+06	0.1	0.8084
BC	6.31E+04	1	6.31E+04	0	0.9648
Error total	2.05E+07	1	2.05E+07		
Total	5.51E+07	7			

En la tabla 24 se presentan como condiciones óptimas de extracción en cuanto a una mayor concentración de polifenoles totales: 8 ciclos, con 10 segundos de

irradiación y 10 segundos de no irradiación a una potencia de 45% (180 W). Como se ha mencionado anteriormente se requiere una mejor respuesta, es decir una mayor concentración de polifenoles totales al realizar la extracción, por lo que a pesar de no haber una diferencia significativa se eligieron los valores de los factores para los cuales se puede extraer una mayor cantidad de polifenoles totales.

Tabla 23. Optimización de la extracción obtenida del diseño de experimentos

Optimizar respuesta			
Meta: maximizar concentración de polifenoles extraídos			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo de irradiación	5.0	10.0	10.0
No irradiación	5.0	10.0	10.0
Ciclos	2.0	8.0	8.0

3.4.4 Extracción de muestras de café por ultrasonido.

Se realizó la extracción por ultrasonido, empleando dos extractantes en 3 condiciones distintas: agua a 25°C, agua 87°C y metanol:agua (70:30 v/v) a 70°C.

Comparando la extracción con H₂O a 25°C y 87°C (figura 34), se observa el efecto de la temperatura en la extracción: al aumentar la temperatura, se aumenta en un 30% la eficiencia de extracción. Es decir, el aumento de temperatura favorece la extracción de los compuestos fenólicos. Al aumentar la temperatura se tiene mejores extracciones que al trabajar en frío, ya que se aumenta el número de burbujas de cavitación y la superficie de contacto.

De acuerdo a los análisis anteriores el uso de metanol aumenta la eficiencia de la extracción de los polifenoles, por ello, este extractante se probó también con el ultrasonido, para identificar si se presenta el mismo comportamiento que en las extracciones anteriores. En la figura 34 presenta el contenido de polifenoles totales extraídos con cada uno de los disolventes empleados con la técnica de ultrasonido, al igual que en las extracciones anteriores, al utilizar la dilución metanol: agua (70:30 %v/v) aumentó la concentración extraída en cada una de las muestras de café.

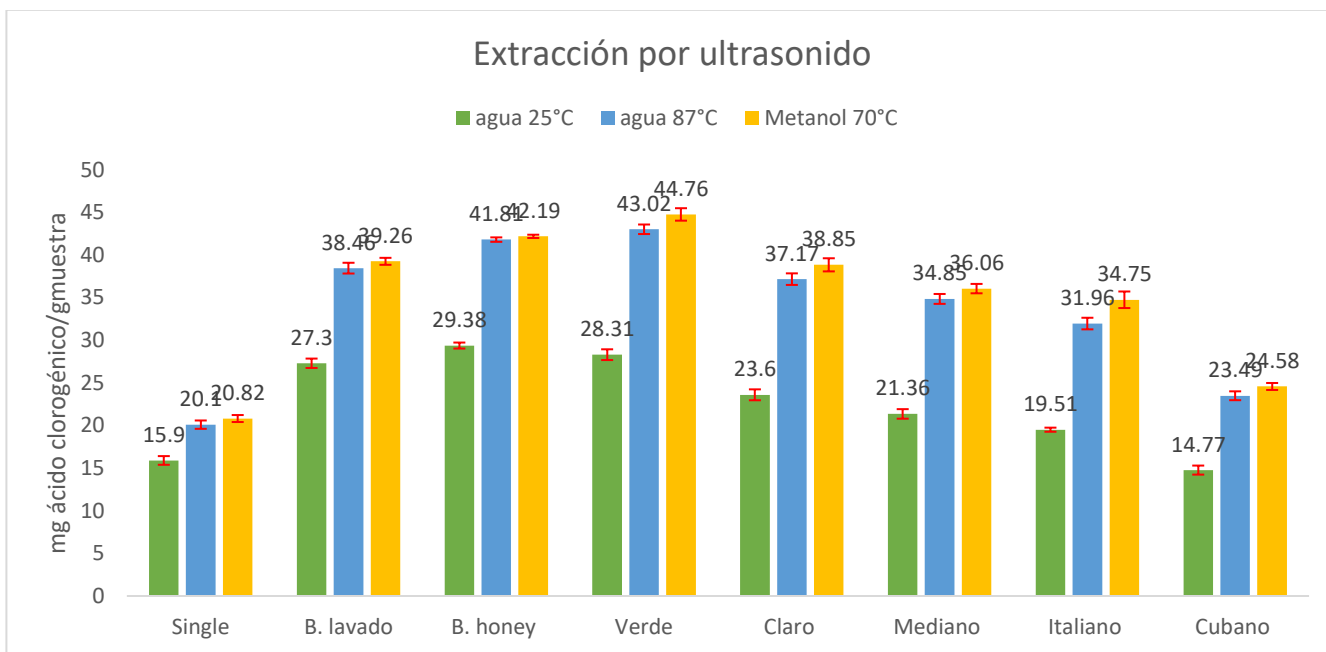


Figura 34. Contenido de polifenoles totales en muestras de café extraídos por ultrasonido con agua a 25 °C y 87°C y con metanol: agua a 70°C.

3.4.5 Comparación de las extracciones por ultrasonido

Para comparar los resultados obtenidos utilizando agua a 25 °C, agua a 87°C y metanol: agua (70:30 % v/v) como extractantes por ultrasonido, se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA.

Tabla 25. ANOVA para la extracción por ultrasonido con agua a 25 °C y 87°C y con metanol: agua a 70°C.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	G. L	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	609.26	2.00	304.63	6.98	3.49
Dentro de los Grupos	523.41	21.00			
Total	1132.67	23.00	43.62		

En la tabla 25 se observa que se obtuvo un valor de f mayor al crítico, por lo tanto, hubo diferencia significativa entre los tres extractantes utilizados ($\alpha=0.05$) al emplear ultrasonido.

Para identificar entre cuál de los extractantes empleados hubo diferencia significativa, se llevó a cabo una prueba Tukey con un valor de HSD de 4.99 con $\alpha=0.05$, la cual indicó que no hay diferencia significativa entre la extracción con agua 87°C y metanol: agua (70:30 v/v) a 70°C, es decir, se obtuvieron concentraciones similares de polifenoles totales, lo cual puede observarse en la figura 34. Sin embargo, sí se presentó diferencia significativa a 87°C con agua a 25°C y entre metanol: agua (70:30 v/v) a 70°C y la extracción con agua a 25°C.

Así mismo, se determinó la capacidad antioxidante en las distintas muestras de café para identificar si se presentaba la misma tendencia respecto a la concentración de polifenoles totales; los resultados se muestran en la tabla 26.

En la tabla 26 se observa la tendencia en cuanto a la concentración de trolox asociada con la capacidad antioxidante por ultrasonido: agua 25°C < agua 87°C < metanol:agua (70:30 v/v) 70°C.

Tabla 26. Concentración de trolox asociada con la capacidad antioxidante en muestras de café Arábica extraídos por ultrasonido.

Extracción por ultrasonido			
	Agua 25 °C	Agua 87°C	Metanol: agua 70°C
	ORAC		
Café	$\mu\text{mol trolox/g muestra}$		
Verde	0.280±0.018	0.352±0.002	0.359±0.004
Claro	0.239±0.010	0.286±0.003	0.294±0.004
Mediano	0.215±0.004	0.276±0.004	0.282±0.009
Italiano	0.189±0.003	0.242±0.002	0.246±0.002
Cubano	0.067±0.003	0.145±0.001	0.162±0.002
Single	0.056±0.001	0.147±0.06	0.159±0.001
B. lavado	0.241±0.004	0.323±0.003	0.327±0.007
B. honey	0.263±0.006	0.345±0.06	0.349±0.007

Sin embargo, al realizar el análisis estadístico (tabla 27), se observa que al tener un valor a F menor al de tablas, no se tiene diferencia significativa en cuanto a la extracción de trolox como una medida de capacidad antioxidante, por lo que los polifenoles que logran extraerse con metanol: agua a 70°C por ultrasonido ya no aportan capacidad antioxidante a la muestra de café analizada.

Tabla 27. ANOVA para la extracción por ultrasonido con agua a 25 °C y 87°C y con metanol: agua a 70°C.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	G. L	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0.029	2.00	0.0149	2.22	3.49
Dentro de los Grupos	0.141	21.00			
Total	0.171	23.00	0.0067		

3.5. Comparación de los métodos de extracción en café verde.

En la figura 35 se muestra una comparación entre los distintos métodos de extracción realizados en el café verde, teniendo en cuenta que se obtuvo la misma tendencia que en los cafés tostados y el bourbon. De acuerdo con la figura 35, se extrajo una mayor concentración de polifenoles totales mediante ultrasonido utilizando como extractante la mezcla metanol agua (70:30 v/v), mientras que la menor concentración que se obtuvo fue mediante ultrasonido con agua a 25°C. Lo anterior indica que la temperatura juega un papel importante en la extracción de compuestos polifenólicos.

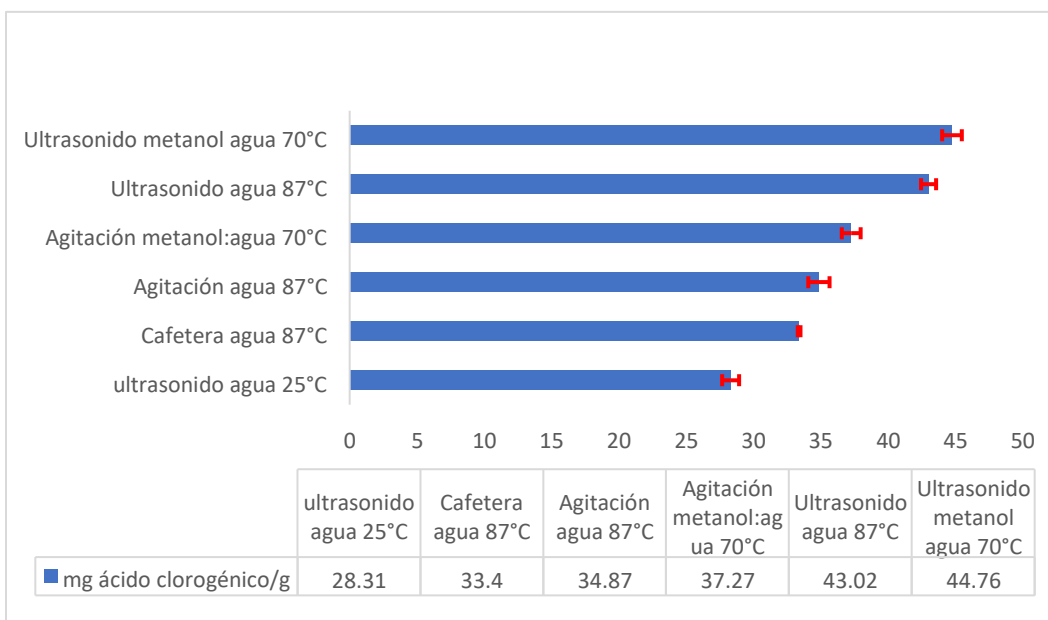


Figura 35. Comparación del contenido de polifenoles totales entre los métodos de extracción realizados.

De acuerdo con la figura 36, lo mismo ocurre con el contenido de trolox como una medida de capacidad antioxidante en las muestras de café verde.

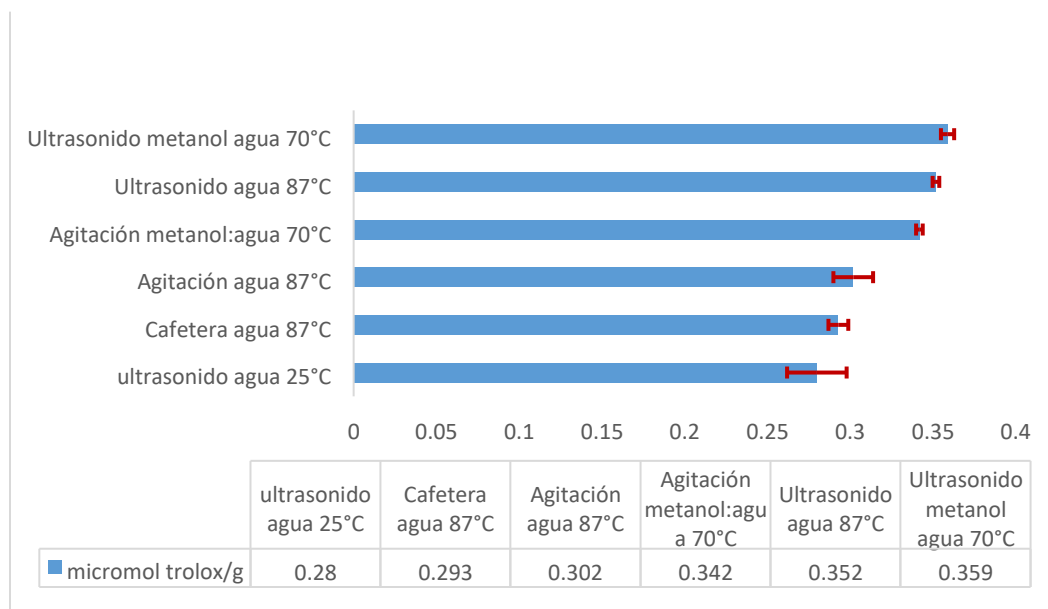


Figura 36. Comparación del contenido de trolox como una medida de capacidad antioxidante entre los métodos de extracción realizados en café verde.

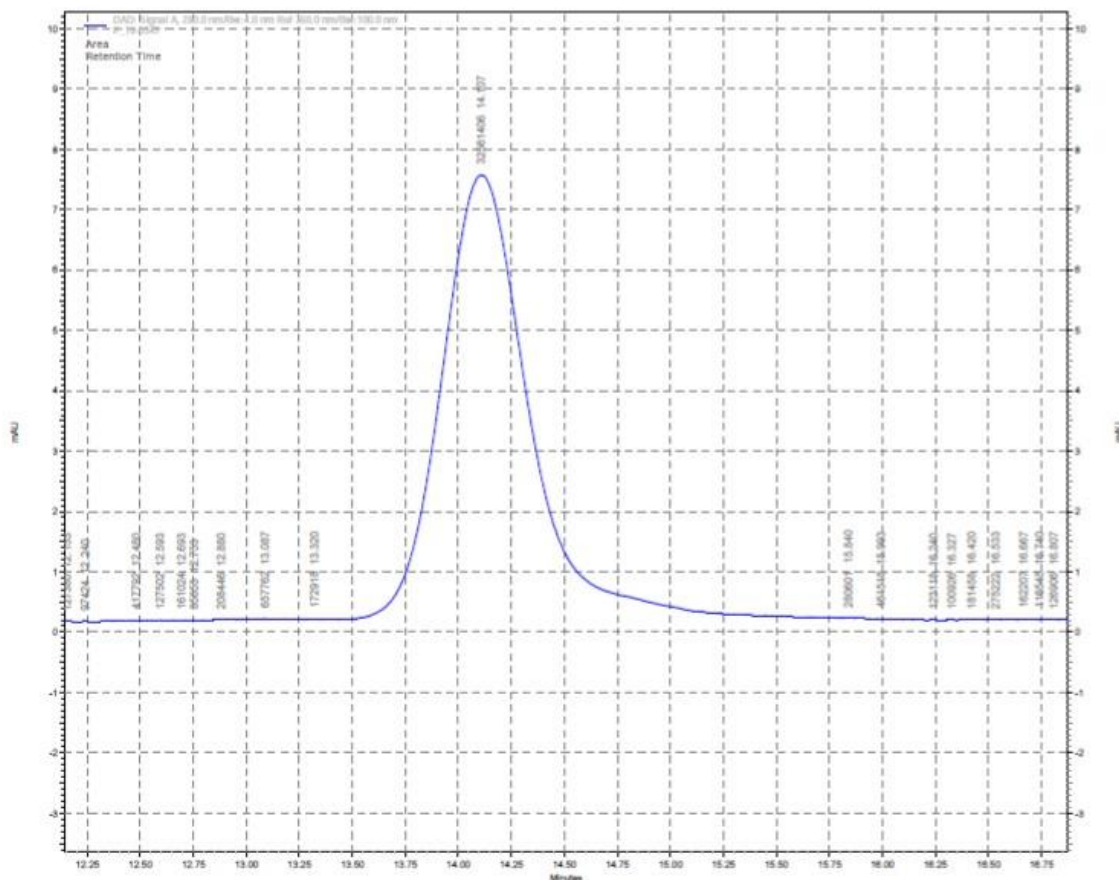
Se extrajo una mayor cantidad de polifenoles totales, así como una mayor capacidad antioxidante empleando la técnica de ultrasonido, lo cual podría estar relacionado con el fundamento del método.

Con ultrasonido se logra una aceleración del proceso de extracción de los principales componentes de las muestras, como podría haber sucedido con los compuestos que proporcionan capacidad antioxidante al café debido a la ruptura de la pared celular dada por la vibración de partículas y la formación de burbujas lo que facilita la transferencia de masa de la fase sólida al disolvente gracias al fenómeno de cavitación que se presenta a lo largo del proceso.

Por su parte, los efectos de sonocapilaridad y de sonoporación permiten la mejora de la penetración del disolvente a través de los canales producidos por la implosión de burbujas, ocasionando alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares, (Chemat et al. 2017). Al optimizar los parámetros de extracción como la intensidad, el tiempo de irradiación y de no irradiación mejora el rendimiento de la extracción.

3.6. Contenido de ácido clorogénico obtenida por HPLC-DAD en las distintas variedades de café tostado.

De acuerdo con investigaciones previas, el principal compuesto polifenólico presente en el café es el ácido clorogénico, por lo que se llevó a cabo la cuantificación mediante HPLC de este y otros compuestos polifenólicos presentes en el café. En la Figura 37, se muestra un ejemplo de uno de los cromatogramas obtenidos a 260 nm para café verde, en el cual se pudo observar el 4-hidroxibelzaldehído.



Figuras 37. Señal cromatográfica obtenida del 4- hidroxibelzaldehído en un extracto de café verde por ultrasonido a 260 nm.

De acuerdo a la tabla 12, se corrieron estándares, sin embargo, se encuentran presentes otros compuestos en la muestra (tomando en cuenta que se tiene un comportamiento similar en cada una de las muestras de café analizadas).

En la figura 38, se muestra un ejemplo de la señal obtenida a 320 nm para ácido clorogénico presente en café verde, mientras que en la figura 39 se presenta un ejemplo de la señal obtenida para café cubano.

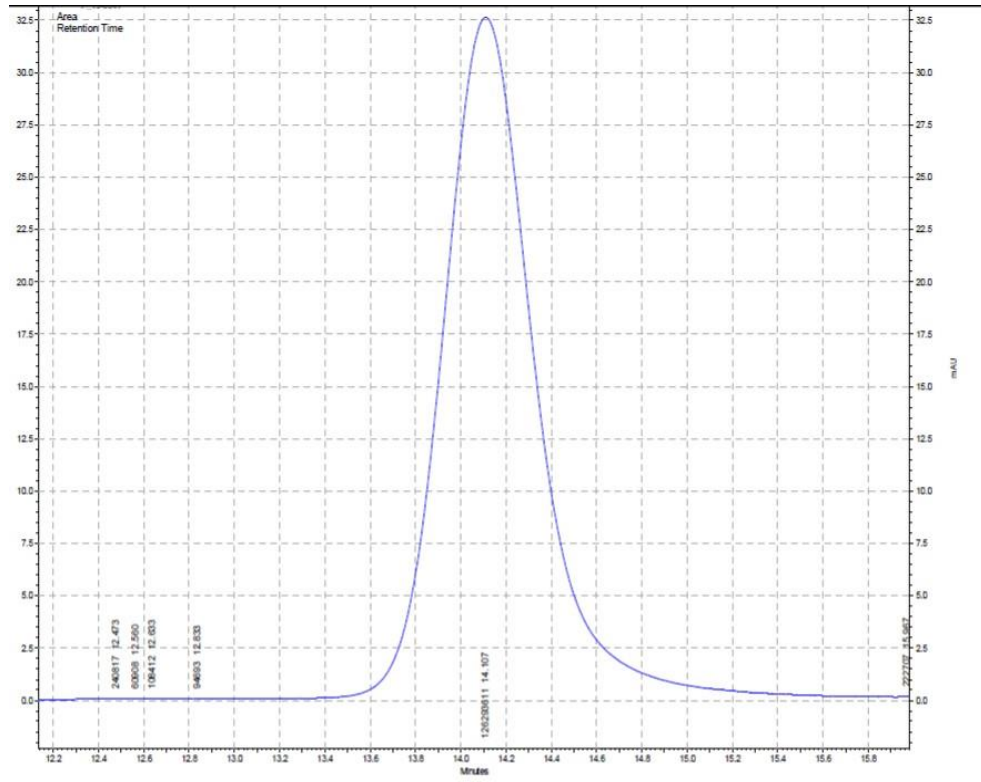


Figura 38. Señal cromatográfica obtenida del ácido clorogénico en un extracto de café verde por ultrasonido a 320 nm.

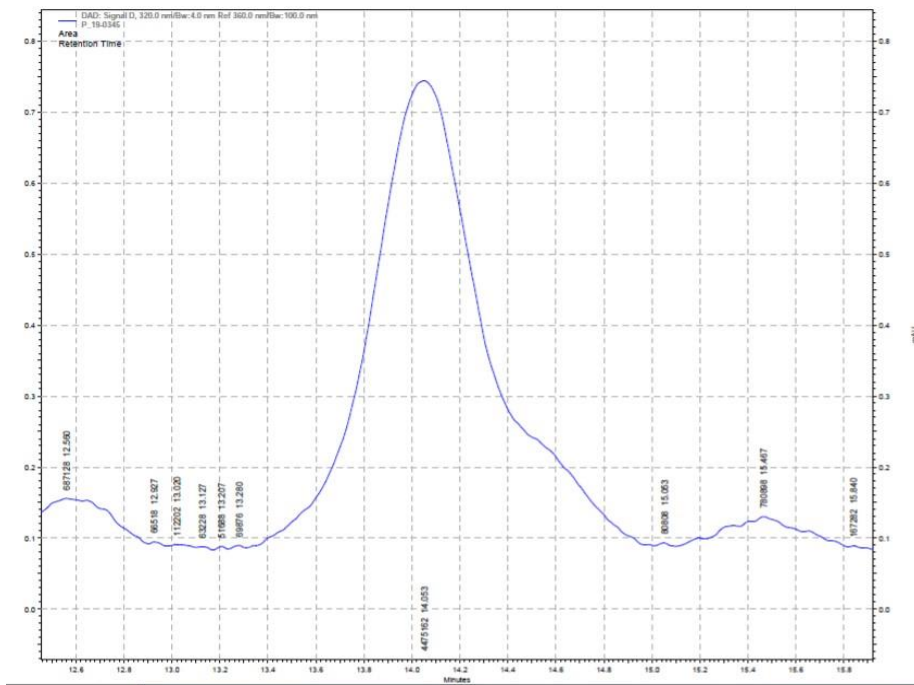


Figura 39. Señal cromatográfica obtenida del ácido clorogénico en un extracto de café cubano por ultrasonido a 320 nm.

La determinación de la concentración del ácido clorogénico se llevó a cabo el para cada uno de los métodos de extracción empleados: agua a 87°C con cafetera, ultrasonido y agitación magnética, en estos últimos utilizando como extractante metanol: agua (70:30 v/v).

En la tabla 28, se presenta la concentración ácido clorogénico obtenido con cada uno de los métodos de extracción empleados, en la cual se observa la misma tendencia que en las figuras 35 y 36 para polifenoles totales y capacidad antioxidante, es decir, se obtuvo una mayor concentración de ácido clorogénico al emplear ultrasonido a 70°C (metanol: agua 70:30 v/v), sin embargo la tabla 29 indica que no hay diferencia significativa entre cada uno de los métodos.

Tabla 28. Contenido de ácido clorogénico en muestras de café Arábica extraídos con agua en cafetera a 87°C, por agitación magnética y ultrasonido a 70°C (metanol:agua 70:30 v/v) cuantificado por HPLC-DAD.

Café	mmol ácido clorogénico /g muestra		
	Agua 87°C en cafetera	Agitación magnética 70°C (metanol: agua 70:30 v/v)	Ultrasonido 70°C (metanol: agua 70:30 v/v)
Verde	0.185	0.186	0.187
Claro	0.083	0.086	0.087
Mediano	0.048	0.050	0.052
Italiano	0.038	0.040	0.041
Cubano	0.005	0.007	0.009
Single	0.013	0.014	0.016
B. lavado	0.134	0.136	0.123
B honey	0.138	0.140	0.141

Tabla 29. ANOVA para la extracción por ultrasonido con agua a 25 °C y 87°C y con metanol: agua a 70°C.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	G. L	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	1.57x10 ⁻⁵	2.00	7.87x10 ⁻⁶	0.0018	3.49
Dentro de los Grupos	0.089	21.00			
Total	0.089	23.00	0.0042		

En la tabla 28 se observa que la concentración de ácido clorogénico fue mayor en el café verde mientras que en el café cubano se obtuvo la menor concentración (97% menor a la del café verde). Lo anterior concuerda con lo reportado por Marin G, 2008, quién menciona que el ácido clorogénico disminuye durante el tostado a causa del aumento de la temperatura y las reacciones que en ella intervienen en el proceso.

Así mismo, se observa una disminución del ácido clorogénico al aumentar el tiempo de tostado, lo cual coincide con lo reportado en la literatura, la cual indica que en el tostado normal hay una degradación en un 30% aproximadamente, mientras que en el tostado intenso la reducción de un 70% (Belitz et al., 2004).

Los ácidos clorogénicos sufren diversos cambios en el tueste como son isomerización, unión a melanoidinas, hidrolisis, formando quinolactonas y transformándose en catecol, guayacol y pirogalol que además le confieren al café características sensoriales como son olores a humo y quemado. Sin embargo, el contenido de ácidos clorogénicos en una taza de café depende de la especie, la madurez, el procesamiento y el grado de tostado. Existe una menor concentración de estos compuestos en café descafeinado (Long, 1997).

De acuerdo a la tabla 28 el café claro es el que tuvo una mayor concentración de ácido clorogénico comparado con los otros 3 tipos de tostado (sin tomar en cuenta

el café verde), por su parte, en los cafés bourbon lavado y honey se obtuvo una mayor concentración comparando con el café claro.

3.7. Composición de los extractos de café verde y tostado por HPLC-DAD.

La degradación de los ácidos clorogénicos contribuye a la formación de productos complejos y es un indicativo del grado de tueste (Astiasarán et al., 2000), por ello, en la tabla 27 se indican los distintos polifenoles encontrados en cada uno de los extractos.

Tabla 27. Concentración de polifenoles (mmol / g muestra) presentes en el café determinados por HPLC.

mmol/g muestra de polifenoles en café					
	Verde	Claro	Mediano	Italiano	Cubano
1,2 dihidroxibenceno	ND	0.004	0.004	0.007	0.010
ácido 4-hidroxibenzoico	ND	ND	ND	ND	0.002
Ácido clorogénico	0.185	0.083	0.048	0.038	0.006
Ácido vinílico	ND	ND	0.010	ND	ND
Ácido cafeico	ND	0.002	ND	0.003	ND
Vainillina	ND	ND	0.002	ND	0.003
Ácido transferulico	ND	0.002	0.001	0.002	
Ácido sináptico	1.17E-04	2.56E-04	ND	0.001	0.001
Naringenina	ND	2.54E-04	1.36E-04	6.27E-05	0.001
Total	0.185	0.088	0.062	0.043	0.012

Se observa que al disminuir la concentración de ácido clorogénico se producen otros polifenoles, que, si bien se presentan en cantidades bajas, no están presentes en el café verde, por lo cual, estos se forman durante el tostado. A pesar de ello, el café verde es el que presentó una mayor concentración total de compuestos reportados, con una diferencia de 0.095 (50%) con respecto al café claro.

En cuanto al ácido cafeico, Lazcano et al. (2015) evaluaron su contenido durante el tostado, encontrando que no hay ninguna tendencia respecto al nivel de tostado; sin embargo, al tener una alta concentración de ácido clorogénico, se tiene una baja concentración de ácido cafeico al comparar granos con el mismo tostado. Lo

anterior se observa en la tabla 27, donde el café claro (tostado moderado) presenta una concentración de 0.08346 mmol/g muestra de ácido clorogénico y 0.002 mmol/g muestra de ácido cafeico, mientras que el café italiano (tostado intenso) presentó 0.0379 mmol/g muestra y de ácido clorogénico 0.0028 mmol/g muestra y de cafeico, respectivamente. Si bien no se tiene una gran variación entre el ácido cafeico en cada café, se observa un aumento del 13% al disminuir el ácido clorogénico, la misma tendencia se observó con el 1,2 dihidroxibenzoico (antioxidante capaz de unir metales, formando complejos).

3.8. Efecto de tiempo de tostado en la concentración de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico en la muestra.

En la figura 40 se observa una disminución en la cantidad de polifenoles totales debido al proceso de tostado, con la siguiente tendencia: verde>claro>mediano>italiano>cubano, de acuerdo a la tabla 20, 21 y figura 34 lo mismo se presenta en cada uno de los métodos empleados.

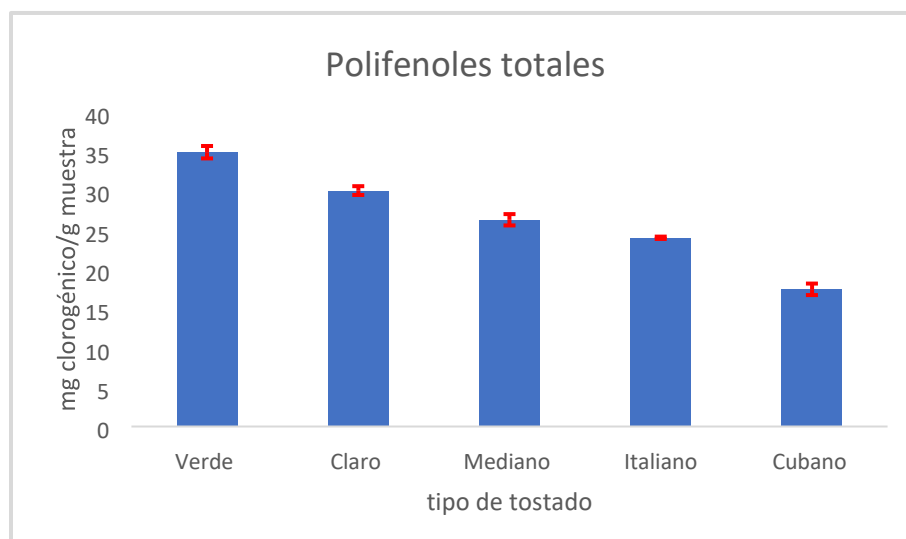


Figura 40. Concentración de polifenoles totales en café verde y tostado extraídos por agitación magnética 87°C/5 minutos.

El mismo comportamiento se tiene en la capacidad antioxidante de cada muestra (figura 41), por lo cual se confirma la relación entre el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante.

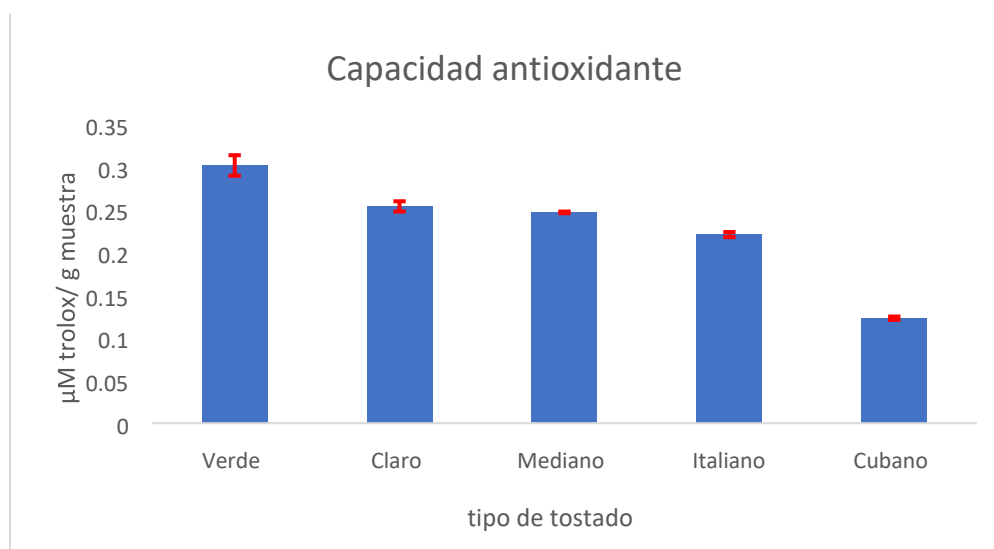


Figura 41. Concentración de trolox (capacidad antioxidante) en café verde y tostado extraídos por agitación magnética 87°C/5 minutos.

Al comparar con el contenido de ácido clorogénico cuantificado por HPLC (Tabla 27) se presentó la misma tendencia, por lo que a pesar de que en los cafés tostados se presentaron otros compuestos que no fueron identificados en el café verde (tabla 29) el ácido clorogénico es el que aporta una mayor capacidad antioxidante al café, si bien esta fue medida utilizando como estándar trolox por ser el mayormente empleado en la técnica ORAC, la capacidad antioxidante no se atribuye a la presencia de este compuesto el café. De acuerdo con la literatura, el ácido clorogénico tiene un efecto directo sobre el contenido de fenoles en las muestras de café, observándose una disminución del ácido clorogénico conforme aumenta el grado de tostado y, por ende, la actividad antioxidante de los granos de café tiende a disminuir conforme aumenta el nivel de tostado (Lazcano, 2015).

4. Conclusiones

El método de extracción más eficiente de polifenoles totales, capacidad antioxidante y ácido clorogénico es la extracción por ultrasonido empleando como extractante metanol-agua (70:30 %v/v) a 70°C, sin embargo, no hay diferencia significativa respecto a ultrasonido utilizando agua a 87°C como extractante.

La temperatura juega un papel importante en la extracción, por lo que al aumentarla se obtuvo una mejor extracción de polifenoles totales y compuestos responsables de la capacidad antioxidante.

En cada uno de los métodos de extracción fue visible que, al aumentar la extracción de polifenoles totales, también se tuvo una mejor extracción de compuestos responsables de la actividad antioxidante, por lo cual fue posible identificar una relación positiva entre ambos.

La cantidad de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y el contenido de ácido clorogénico en café disminuyen al aumentar el tiempo de tostado; aunque al aumentar el tiempo y temperatura de tostado disminuyó la concentración de ácido clorogénico se observó la formación de otro tipo de compuestos, aunque en bajas concentraciones.

De acuerdo con el análisis por HPLC, cada uno de los cafés presentó una composición distinta de polifenoles, por lo cual el tostado influye en su formación.

Se encontró una relación directa entre el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante con el ácido clorogénico en los cafés verde y tostados analizados, ya que, al disminuir el ácido clorogénico, el contenido de polifenoles totales y por tanto capacidad antioxidante también tendió a disminuir.

El ácido clorogénico es uno de los compuestos polifenólicos presentes en el café que aporta la mayor parte de la actividad antioxidante contribuye en mayor parte respecto a los otros polifenoles encontrados a la capacidad antioxidante tanto en el café verde como tostado.

5. BIBLIOGRAFÍA:

- Astiarán, A., Martínez I., Hernández J. (2000). Alimentos. Composición y propiedades. Madrid, España. McGraw-Hill Interamericana. 239-249.
- Arcilla et al. (2007). Sistemas de producción de café en Colombia. editorial Cenicafe. Colombia, 22-57.
- Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café, A.C. (AMECAFÉ). 2012. Plan integral de promoción del café de México 2012.
- Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, Nutrición y Salud. 10(2), 42.
- Belitz, H. (2014). Food chemistry. México. Editorial Springer
- Bonilla, L., Hernandez, L. (2005). Estrés oxidativo y antioxidantes: actualidad sobre los antioxidantes en los alimentos. Investigación, Universidad de la Habana, Cuba.
- Brescia, P. (2012). Bio Tek. Determination of Antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay with Synergy H4. Recuperado el 20 de septiembre del 2019 de : <http://www.biotek.com/resources/articles/antioxidant-potential-usingorac.html>.
- Cañizares, M.P. (2002). Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. Revista de la Sociedad Química de México, 46(2), 167-174.
- Chávez, K. (2017). Evaluación de microdispositivos para la extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos en aceite de oliva. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chemat, F. et al. (2017). Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound assisted extraction of food and natural products, Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. Ultrasonics sonochemistry. 34 (2), pp. 540-560.
- Escutia, L. (2011). Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles en uva.

-
- Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Farah, A. Marino, D. (2006). Phenolic compounds in coffee. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Braz. J. Plant Physiol. 18 (1). 23-26.
 - Fernández, M. (2011). Determinación de hidrocarburos en muestras de agua por extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido. Universidad de Alicante.
 - Flores, R. (2018). Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles en semillas de Chía. Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
 - Fonseca, L., Calderón, L., Rivera, M. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia), Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 3 (21); 228-236.
 - Gao, M y Liu, C. (2005). *Comparison techniques for extraction of flavonoides from cultures cells of Saussurea medusa Maxim.* World Journal of Microbiology y Biotechnology. 21: 1461-1463.
 - Goncalves J, Silva C, y Castillo P. (2013). *An attractive sensitive and high-throughput strategy base on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA análisis for quantification of hidroxybenzoic and hidroxcinnamic acids in wines.* Microchem Journal. Vol 106.
 - González, M., Montaña, Z. (2015). *La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XXI.* Latin american journal of physics education. 9 (4). Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5514757> el 12 de septiembre del 2019.
 - Jiménez, W. (2019). Evaluación de capacidad antioxidante por el método orac utilizando un sistema de análisis por inyección en flujo. Trabajo de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Lazcano, E. Trejo M, Vargas M. (2015). Contenido de fenoles, cafeína y capacidad antioxidante de granos de café verdes y tostados de diferentes estados de México. Revista Iberoamericana de tecnología. 16 (2).
-

-
- López J, Góngora, E Rosa. (2005). *La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson*. Revista Biomed 16, 99-11.
 - Long, K., Noiro M y Hamon, S. (1997). *Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (Coffea sp.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45 (3): 786-790.
 - López P. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de Sambucus ebulus L. utilizando el método ORAC*. Universidad complutense. Facultad de farmacia.
 - Lopez,J. (2008). *Los alimentos Funcionales: importancia y aplicaciones*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Chile.
 - Luceri, C.,L. Giannini, M. Lodovici, E. Antonucci, R.Abbate, E. Masisi y P. Dolara. (2017)., *pCoumaric acid, a common dietary, phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo*. British Journal of Nutrition 97, 458-463.
 - Marín C., Puerta Q. (2008). *Contenido de ácidos clorogénicos en granos de Coffea arabica L. y canephora, según el desarrollo del fruto*. Cenicafé. 59(1):7-28.
 - Mercado, G. Carrillo L, et al (2013). *Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México*. Nutrición Hospitalaria 28 (1).
 - Naidu MM, Sulochamma G, Sampathu SR, Srinivas P. (2008). *Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee*. Food Chemistry; 107:377-84.
 - NORMA Oficial Mexicana NOM-169-scfi-2007, Café Chiapas- Especificaciones y métodos de prueba.
 - NORMA Oficial Mexicana NOM-149-SCFI-2001, Café Veracruz- Especificaciones y métodos de prueba.
 - Porras, A., López, A. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 3, 121, 134.
-

-
- Rodríguez, Z., Robaina, M., Jáuregui, U. (2014). *Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas*. Revista CENIC. (45), 139-147.
 - Ruzicka, J., & Hansen, E.H. (1988). *Flow injection análisis of food additives*. Flow Injection and Food Additives (Vol.1).
 - Salazar, J., Chávez, J. A., Turó, A. García-Hernández, M. J. (2010). Effect of Ultrasound on Food Processing. En "Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties". Jasim Ahmed, Hosahalli S. Ramaswamy, Stefan Kasapis & Joyce I. Boye (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton Florida, Estados Unidos de América. Pag: 65-84.
 - Salinas Vargas, María Eugenia (2011). Determinación de polifenoles totales y cafeína en granos de café verde y tostado. Tesis de licenciatura, facultad de química UNAM.
 - Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Basillo Heredia, J., Cisneros – Zevallos, L y Jacob Velázquez, D.A (2013). The Folin-Coicalteu ussay revisited: improvement of its specificity total phenolic content determination. Anal Methonds, 5, 5990-5999.
 - Valencia E, Figueroa I, Martínez E, et al (2016). *Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas*. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas. 16, p.15-29.
 - Vega, A., De Leon, J., Reyes S. (2018). *Componentes bioactivos de diferentes marcas de café comerciales de Panamá. Relación entre ácidos clorogénicos y cafeína*. Centro de investigaciones en Recursos Naturales. 29 (4), 43-54.
 - Zavaleta, J., Muñoz, A., Blanco, T. (2005). *Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos*. Horizonte Médico, 5 (2)

