

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos  
para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos**

**Evaluación de los cambios en la capacidad antioxidante y contenido de antocianinas  
de la broza de café deshidratada durante el almacenamiento y transporte, en  
condiciones reales de la empresa y en condiciones controladas**

Elaborado por:  
Katherine Fernández Arce

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
San José, Costa Rica

13 de diciembre del 2019

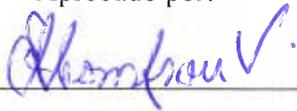
TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos

Elaborado por:

Katherine Fernández Arce

Aprobado por:



---

M.Sc. Eduardo Thompson  
**Presidente del Tribunal**



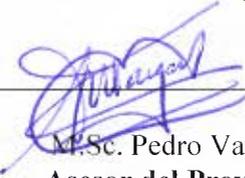
---

Ph.D Elba Cubero Castillo  
**Directora del Proyecto**



---

Ph.D Ana Ruth Bonilla Leiva  
**Asesora del Proyecto**



---

M.Sc. Pedro Vargas  
**Asesor del Proyecto**



---

M.Sc. Yorleny Araya  
**Profesora Designada**

## DERECHO DE PROPIEDAD INTELECTUAL

El presente documento posee confidencialidad parcial con respecto al proceso de elaboración de la broza deshidratada y el tipo de empaque ya que está amparado por un contrato de transferencia entre una empresa y la Universidad de Costa Rica.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios por darme la fuerza y la capacidad para desarrollar el presente trabajo, así como también por darme la oportunidad de concluir con un ciclo más en mi vida.

Agradezco a mi persona especial, Gabriel, por siempre estar presente en mi vida, por su apoyo incondicional, sus consejos, por inspirarme y principalmente por ser un pilar en mi vida.

Agradezco a mi familia por apoyarme y alentarme continuamente a dar lo mejor de mí, y por darme la posibilidad de sacar una carrera universitaria.

Agradezco a mis profesores, compañeros de carrera y a todas las personas que de una u otra forma formaron parte de proceso que hoy culmino.

## ÍNDICE GENERAL

DERECHO DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
RESUMEN.....	1
1. JUSTIFICACIÓN .....	2
2. OBJETIVOS .....	6
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3. MARCO TEÓRICO.....	7
3.1 Generalidades del grano de café.....	7
3.2 Broza de café.....	8
3.3 Valor agregado efectuado para reducir el impacto ambiental de la broza de café.....	9
3.4 Utilización de la broza de café como subproducto aprovechable para el ser humano.....	9
3.5 Composición química de la broza de café .....	11
3.6 Compuestos fenólicos y su importancia .....	12
3.6.1 Definición.....	12
3.6.2 Clasificación.....	12
3.6.3 Importancia en la salud humana .....	13
3.7 Principales compuestos fenólicos con capacidad antioxidante presentes en la broza de café .....	14
3.7.1 Ácidos Clorogénicos .....	14
3.7.2 Antocianinas.....	16
3.8 Factores que influyen en la estabilidad o degradación química de las antocianinas y ácido clorogénico como compuestos con capacidad antioxidante .....	17
3.9 Importancia de la selección del tipo de material de empaque para la protección de los compuestos funcionales en la broza de café deshidratada.....	19
3.9.1 Generalidades de los empaques .....	19
3.9.2 Evaluación de la idoneidad de los empaques en función de sus características físicas .....	20
3.10 Métodos para medir la degradación o conservación de las características físicas, sensoriales y microbiológicas de la broza de café .....	23
3.10.1 Métodos fisicoquímicos.....	23

3.10.1.1	Cuantificación de compuestos funcionales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	23
3.10.1.2	Color instrumental.....	24
3.10.1.3	Contenido de Humedad y Actividad del Agua.....	26
3.10.2	Métodos Microbiológicos.....	28
3.10.2.1	Salmonella sp. ....	29
3.10.2.2	Coliformes totales y fecales .....	29
3.10.2.3	Mohos y Levaduras .....	30
3.10.3	Métodos Sensoriales .....	31
4.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
4.1	LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO.....	33
4.2	MATERIA PRIMA .....	33
4.2.1	Origen de la materia prima .....	33
4.2.2	Método de recolección de la muestra .....	33
4.3	METODOLOGÍA .....	34
4.3.1	Selección y evaluación de empaques flexibles.....	34
4.3.1.1	Criterios de búsqueda y selección de empaques en el mercado costarricense.....	34
4.3.1.3	Diseño Experimental.....	35
4.3.2	Evaluación de la variación en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la broza de café deshidratada expuesta a diferentes condiciones de almacenamiento.....	39
4.3.2.1	Condiciones de almacenamiento de la broza de café deshidratada .....	39
4.3.2.2	Diseño experimental.....	42
A)	Análisis Fisicoquímicos .....	44
B)	Análisis Sensoriales .....	49
4.3.3	Evaluación de la estabilidad microbiológica de la broza de café deshidratada .....	55
4.3.3.1	Diseño experimental.....	55
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
5.1	Selección de las mejores estructuras de empaque con base en la evaluación de las propiedades de permeabilidad de agua y el sello. ....	58
5.1.1	Selección de empaques por evaluar:.....	58
5.1.2	Análisis de las propiedades físicas de los materiales de empaque:.....	60
5.1.2.1	Transparencia .....	60
5.1.2.1	Sellabilidad.....	60
5.1.2.3	Propiedades de barrera .....	63
5.1.3	Empaques seleccionados para el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada.....	68

5.2 Evaluación de la influencia de la temperatura y tipo de empaque durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada sobre el contenido de antocianinas, ácido clorogénico, humedad, color y sabor .....	69
5.2.1 Variaciones en el contenido de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido por HPLC .....	69
5.2.1.2 Análisis de las muestras de broza de café: .....	71
5.2.2 Variaciones en el contenido de humedad y actividad del agua ( $a_w$ ) .....	82
5.2.3 Variaciones en el color por método instrumental .....	85
5.2.6 Relación entre las diferencias de color perceptibles obtenidas mediante método instrumental y sensorial.....	97
5.2.7 Condiciones de almacenamiento y tipo de empaque seleccionado para la mayor conservación de los compuestos fenólicos .....	100
5.3 Determinación de la estabilidad microbiológica de la broza de café deshidratada en función de las variaciones de la temperatura y tipo de empaque .....	101
6. CONCLUSIONES .....	103
7. RECOMENDACIONES .....	106
8. BIBLIOGRAFÍA.....	107
9. ANEXOS .....	127
9.1 Fichas técnicas de los empaques evaluados.....	127
9.2 Características reportadas por los proveedores de los cinco empaques evaluados .....	130
9.4 Curvas de calibración obtenidas por medio de HPLC .....	132
9.5 Cromatogramas obtenidas por HPLC de muestras de broza de café enriquecidas con estándares analíticos.....	133
9.6 Evaluación del método para la determinación de la concentración de cianidina 3-o rutinósido y ácido clorogénico por HPLC.....	134
9.7. Cromatograma de los ácidos clorogénicos reportados para muestra de café Coffea Arabica mediante HPLC: .....	135
9.8 Concentración de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido en el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada: .....	136
9.9 Datos obtenidos mediante pruebas sensoriales .....	140
9.10 Resultados microbiológicos: .....	148

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química con los respectivos sustituyentes que conforman los principales tipos de antocianidinas (Tasao, 2010).....	16
<b>Figura 2.</b> Estructura química de cianidina 3-o-rutinosido (a) y cianidina-3-glicosido (b) (NCBI,2019).....	17
<b>Figura 3.</b> Visualización gráfica de la composición estructural de un empaque flexible multicapa.....	22
<b>Figura 4.</b> Efecto del contenido de humedad y actividad del agua en la propensión de reacciones de deterioro en alimentos (Gil <i>et al.</i> , 2013).....	28
<b>Figura 5.</b> Variación de la concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g muestra) según tiempo de almacenamiento en meses para la broza de café deshidratada.....	72
<b>Figura 6.</b> Variación de la concentración de ácido clorogénico (mg/g muestra) presente en la broza de café deshidratada según condición de almacenamiento y tipo de empaque. Se reporta con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza.....	74
<b>Figura 7.</b> Variación de la concentración de ácido clorogénico (mg/g muestra) según tiempo de almacenamiento en meses para la broza de café deshidratada.....	75
<b>Figura 8.</b> Degradación del ácido clorogénico (a, b, c) y cianidin 3-o-rutinosido (d, e, f) con modelo de cinética de orden uno para la broza de café deshidratada almacenada en condiciones controladas a 25 °C para los diferentes empaques y bloques analizados.....	79
<b>Figura 9.</b> Variación de la humedad en base seca y actividad del agua de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque (a) y bloque (b). Para cada empaque y bloque se reporta con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza en los valores de $a_w$ y humedad, respectivamente.....	83
<b>Figura 10.</b> Variación de la humedad (a) y actividad del agua (b) de la broza de café deshidratada almacenada en condiciones reales y condiciones controladas a través del tiempo de almacenamiento.....	84
<b>Figura 11.</b> Variación de la luminosidad ( $L^*$ ) de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque (a) y bloque (b). Para cada empaque y bloque se reportan con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza en los valores de luminosidad.....	85
<b>Figura 12.</b> Variación de la cromaticidad ( $C^*$ ) de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento.....	87

<b>Figura 13.</b> Variación de la tonalidad ( $h^\circ$ ) de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento.....	88
<b>Figura 14.</b> Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) a nivel instrumental de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento.....	89
<b>Figura 15</b> Infusiones de broza de café deshidratada utilizadas para la evaluación sensorial del color y sabor durante cero meses de almacenamiento a $-40^\circ\text{C}$ (P600-0, EE-0 y PET M-0) y seis meses de almacenamiento en condiciones controladas (CR-6) y) condiciones reales (CC-6), para los 3 tipos de empaques.....	95
<b>Figura 16.</b> Degradación del color observada en muestras de infusión de broza de café deshidratada previo (b) y posterior (a) a la evaluación sensorial.....	95
<b>Figura 17.</b> Cambios en la coloración de la broza de café deshidratada almacenadas en empaque P-600 durante cero meses (a), diez meses en condiciones reales (b) y diez meses en condiciones controladas (c).....	96
<b>Figura 18.</b> Comparación de la diferencia total de color obtenido por método sensorial ( $d'$ ) e instrumental ( $\Delta E$ ) de la broza de café deshidratada almacenada en condiciones reales (a) y en condiciones controladas (b).....	98
<b>Figura 19.</b> Diferencia total de color obtenido por método sensorial ( $d'$ ) e instrumental ( $\Delta E$ ) de la broza de café deshidratada almacenada en diferentes tipos de empaque.....	98
<b>Figura 20.</b> Diferencia total de color obtenido por método sensorial ( $d'$ ) e instrumental de la broza de café deshidratada correspondiente a cada fecha de recolección de cosecha (bloque).....	99
<b>Figura A.1</b> Ficha técnica de la bolsa P-600 utilizada para el estudio de almacenamiento de la de broza de café deshidratada.....	128
<b>Figura A.2</b> Ficha técnica de la bolsa P-800 utilizada para el estudio de almacenamiento de la de broza de café deshidratada.....	129
<b>Figura A.3</b> Temperaturas (a) y humedades relativas (b) según mes y condición de almacenamiento (real y controlada) obtenidas durante el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada.....	131
<b>Figura A.4.</b> Curva de calibración efectuada en HPLC para ácido clorogénico (a) y cianidina 3-o-rutinosido (b) a una longitud de onda de 327 y 512 nm, respectivamente...	132

<b>Figura A.5.</b> Superposición de cromatogramas de muestras de broza de café deshidratada con enriquecimiento de cianidina 3-o-rutinosido (línea roja, señal B) y sin enriquecimiento (línea azul, señal A), analizados a $\lambda=512$ nm.....	133
<b>Figura A.6</b> Superposición de cromatogramas de muestras de broza de café deshidratada con enriquecimiento de ácido clorogénico (línea azul, señal A') y sin enriquecimiento (línea roja, señal A''), analizados a $\lambda=327$ nm.....	133
<b>Figura A.7</b> Cromatograma obtenido mediante HPLC de los tiempo de retención según orden de elución de los ácidos clorogénicos presentes en café <i>Coffea arabica</i> (García & Quintana, 2008).....	135
<b>Figura A.8</b> Variación del contenido de ácido clorogénico (a, b, c) y cianidin 3-o-rutinosido (d, e, f) en función del tipo de empaque, tiempo y condición de almacenamiento (CC y CR) de la broza de café deshidratada correspondiente al bloque uno.....	138
<b>Figura A.9</b> Variación del contenido de ácido clorogénico (a, b, c) y cianidin 3-o-rutinosido (d, e, f) en función del tipo de empaque, tiempo y condición de almacenamiento (CC y CR) de la broza de café deshidratada correspondiente al bloque tres.....	139

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b> Composición porcentual en base seca de la pulpa y cáscara de café obtenidos como subproductos del procesamiento del café.....	12
<b>Cuadro II.</b> Concentración (mg/g) de los diferentes ácidos clorogénicos obtenidos en la cáscara de café <i>Arábica</i> provenientes de México e India.....	15
<b>Cuadro III.</b> Distribución de las condiciones reales (actuales) y controladas según tiempo y etapa de almacenamiento para el análisis de conservación de las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas en la broza de café deshidratada.....	42
<b>Cuadro IV.</b> Distribución de las condiciones de almacenamiento según empaque, diferentes fechas de recolección de muestras, etapa y tiempo para el análisis de conservación de las propiedades en la broza de café deshidratada.....	43
<b>Cuadro V.</b> Sets o pares evaluados según bloque y tipo de empaque mediante prueba 2-AFC para la determinación de los cambios en sabor y color en función del tiempo y condición de almacenamiento de la broza de café deshidratada.....	52
<b>Cuadro VI.</b> Empresa proveedora y los respectivos precios y presentaciones de venta de cada material de empaque por analizar.....	59
<b>Cuadro VII.</b> Tiempo, temperatura e impulso eléctrico obtenido para el sellado correcto de cada material de empaque en función de su grosor y el tipo de selladora utilizado.....	61
<b>Cuadro VIII.</b> Velocidad de transmisión de vapor de agua obtenido experimentalmente a 23 °C y 35 °C para cada material de empaque analizado.....	63
<b>Cuadro IX.</b> Coeficiente de permeabilidad obtenido experimentalmente a 23 °C y 35 °C para cada material de empaque analizado.....	67
<b>Cuadro X.</b> Tiempos de retención obtenidos según longitud de onda para los compuestos evaluados.....	70
<b>Cuadro XI.</b> Promedios de la concentración de cianidina-3-o-rutinosido obtenidos según bloque y condición de almacenamiento en broza de café deshidratada.....	71
<b>Cuadro XII.</b> Variación promedio de la concentración de ácido clorogénico (mg/g muestra) según bloque para la broza de café deshidratada.....	73
<b>Cuadro XIII.</b> Estadística de regresión lineal simple para los modelos de orden cero y uno de la cinética de degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido de la broza de café deshidratada según bloque, empaque y temperatura para las condiciones controladas.....	80

<b>Cuadro XIV.</b> Efecto de la temperatura de almacenamiento y tipo de empaque en la constante de degradación de primer orden (k) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del ácido clorogénico y cianidin 3-o-rutinosido presentes en la broza de café deshidratada almacenada en condiciones controladas.....	82
<b>Cuadro XV.</b> Pendiente e intercepto obtenidos mediante regresión lineal de la variación de la humedad y actividad del agua según condición y tiempo de almacenamiento para la broza de café deshidratada.....	85
<b>Cuadro XVI.</b> Pendiente e intercepto obtenidos mediante regresión lineal de la variación de la cromaticidad ( $C^*$ ), la tonalidad ( $h^\circ$ ) y diferencia total de color ( $\Delta E$ ) a nivel instrumental en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento para la broza de café deshidratada.....	90
<b>Cuadro XVII.</b> Análisis de <i>Salmonella</i> sp. en broza de café deshidratada con cero meses de almacenamiento y en tres diferentes fechas de recolección (bloques).....	91
<b>Cuadro XVIII.</b> Valores de d' (d-prima) y probabilidades exactas ( $\alpha$ ) obtenidas para el análisis de las variaciones en el sabor durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada mediante pruebas de diferenciación 2-AFC con 30 jueces.....	92
<b>Cuadro XIX.</b> Valores de d' (d prima) y probabilidades exactas ( $\alpha$ ) obtenidas para el análisis de las variaciones en el color durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada mediante prueba 2-AFC.....	93
<b>Cuadro A.1</b> Ficha técnica de la bolsa PET Metalizada utilizada para el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada.....	127
<b>Cuadro A2.</b> Composición del material, tipo de estructura y principales características reportadas en las correspondientes fichas técnicas para los cinco empaques analizadas...	130
<b>Cuadro A3.</b> Límite de detección y cuantificación obtenidos experimentalmente para la concentración de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido mediante HPLC.....	134
<b>Cuadro A4.</b> Análisis de regresión lineal de las curvas de calibración obtenidas para el ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido utilizados como estándares analíticos. ....	134
<b>Cuadro A.5</b> Concentración de ácido clorogénico (mg/g) obtenida por HPLC a $\lambda= 327$ nm de la broza de café deshidratada según bloque, tiempo de almacenamiento en meses, tipo de empaque y condición de almacenamiento.....	136
<b>Cuadro A.6</b> Concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g) obtenida por HPLC a $\lambda= 512$ nm de la broza de café deshidratada según bloque, tiempo de almacenamiento en meses, tipo de empaque y condición de almacenamiento.....	137

<b>Cuadro A.7</b> Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del sabor en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones controladas para los respectivos bloques y tipos de empaque.....	140
<b>Cuadro A.8</b> Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del sabor en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones reales para los respectivos bloques y tipos de empaque. Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores.....	142
<b>Cuadro A.9</b> Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del color en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones controladas para los respectivos bloques y tipos de empaque.....	144
<b>Cuadro A.10</b> Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del color en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones reales para los respectivos bloques y tipos de empaque.....	146
<b>Cuadro A.11</b> Resultados obtenidos de los recuento totales de mohos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales en broza de café deshidratada almacenada según bloque, tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento (cero y diez meses)...	148
<b>Cuadro A.12</b> Crecimiento logarítmico del recuento de mohos y levaduras y recuento de coliformes totales obtenidos en función del bloque, tipo de empaque y condición de almacenamiento de la broza de café deshidratada.....	149

## ABREVIATURAS

<b>a<sub>w</sub></b>	Actividad del agua	<b>λ</b>	Longitud de onda
<b>ANDEVA</b>	Análisis de Varianza	<b>L*</b>	Luminosidad
<b>h°</b>	Ángulo de tono o hue	<b>μL</b>	Micro litro
<b>CME</b>	Cuadrado Medio del Error	<b>mg/g</b>	Miligramo por gramo de muestra
<b>P</b>	Coefficiente de permeabilidad	<b>mL</b>	Mililitro
<b>CR</b>	Condiciones de almacenamiento reales	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>CC</b>	Condiciones de almacenamiento controlado	<b>PPO</b>	Polifenoloxidasa
<b>k</b>	Constante de degradación	<b>%HR</b>	Porcentaje de Humedad Relativa
<b>% H<sub>2</sub>O</b>	Contenido de humedad porcentual	<b>%</b>	Porciento
<b>C*</b>	Cromaticidad o saturación	<b>p</b>	Probabilidad
<b>ΔE</b>	Diferencia total de color	<b>T</b>	Temperatura
<b>2-AFC</b>	Escogencia Forzada Alternativa-2	<b>t</b>	Tiempo
<b>°C</b>	Grado Centígrado	<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tiempo de vida media
<b>d prima</b>	Grado diferencia percibida entre dos estímulos	<b>UFC/g</b>	Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra
<b>LC</b>	Límite de cuantificación	<b>VTVA</b>	Velocidad transmisión de vapor de agua
<b>LD</b>	Límite de detección	<b>VTVO</b>	Velocidad transmisión vapor de oxígeno
<b>Log</b>	Logaritmo		

## RESUMEN

Se efectuó la evaluación de cinco empaques flexibles de venta en el mercado costarricense, con el fin de seleccionar los tres empaques que contaron con las mejores capacidades de barrera y sellabilidad, para el posterior estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada. Los empaques evaluados fueron el P-600 (PET/PE/AL), P-800 (PET/PETmet/UV blanco), PET Metal (PP/PETmet/PE), Kraft Metalizado (Kraft/PE/Al) y EE.

La evaluación del sellado correcto de cada material se efectuó mediante la visualización de fugas con cámara al vacío, y el sello se realizó con selladora de impulso eléctrico y de superficie caliente. Mientras que la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) y el coeficiente de permeabilidad (P), como propiedades de barrera, fueron evaluadas a 23°C y 35 °C. Se obtuvo como resultados una disminución generalizada en la capacidad de barrera de los empaques hacia el permeante al aumentar la temperatura. Los valores experimentales de VTVA y P a 23 °C fueron de 24,74-77,55 g/m<sup>2</sup>·24h y 1,26 x10<sup>-11</sup> - 4,36 x10<sup>-11</sup> g·m/m<sup>2</sup>·s·Pa respectivamente, y a 35 °C de 48,80-92,13 g/m<sup>2</sup>·24h y 2,50 x10<sup>-11</sup> -6,08 x10<sup>-11</sup> g·m/m<sup>2</sup>·s·Pa respectivamente. En donde el orden de los valores más bajos o mayor capacidad de barrera según empaque fue de P-600 >PET Met >EE, motivo por el cual estos tres empaques fueron los utilizados para el posterior estudio de almacenamiento (10 meses) de la broza de café deshidratada en condiciones controladas (25°C/35°C/22°C) y en las condiciones reales que se realizan en un almacén (22-35°C/35°C/22°C).

En dicho estudio se cuantificó, a lo largo de cada mes de almacenamiento, las variaciones en la concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g) y ácido clorogénico (mg/g) con HPLC a 512nm y 327 nm respectivamente, % de humedad por termogravimetría, actividad del agua (a<sub>w</sub>), color instrumental (L\*, C\*, h°, ΔE), percepción sensorial (sabor y color mediante pruebas 2-AFC con iniciador), ausencia/presencia de *Salmonella* sp. (previo a los análisis sensoriales) y crecimientos logarítmicos (Log UFC/g) de mohos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales de la broza de café deshidratada correspondiente a tres fechas diferentes de recolección de cosecha (tres bloques), y los tres empaques previamente seleccionados (P-600, PET Metal y EE) y dos condiciones de almacenamiento (reales y controladas). Se obtuvo que las condiciones de almacenamiento reales fueron más favorables para la conservación de las variables respuestas medidas, en conjunto con el empaque P-600, y seguido por el EE.

Además, se realizaron cinéticas de degradación de cianidina 3-o- rutinósido y ácido clorogénico como los dos principales compuestos con capacidad antioxidante, en donde se obtuvo que la degradación de ambos compuestos siguió un modelo de primer orden. Por lo que se recomienda mantener las condiciones reales de almacenamiento, en conjunto con el empaque EE o el empaque P-600.

## 1. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento de la cultura del café ha traído consigo grandes cambios en las tendencias de consumo de bebidas. No obstante, sus progresos económicos se han visto opacados por la generación directa y significativa de daños a nivel ambiental (Ribeiro *et al.*, 2014; Decazy *et al.*, 2003). Esto debido a que, en el proceso de industrialización del café, se utiliza únicamente entre un 10%-20% del volumen total del fruto fresco y maduro; el resto se considera residuo (Kassu, 2010).

La producción de broza de café (corresponde a la cáscara y pulpa del café), como principal residuo agroindustrial generado tras el proceso de despulpado del café (también denominado chancado), es de aproximadamente 3 a 4 mil toneladas por año. Su principal aprovechamiento se efectúa en abono para plantas y alimento para animales, por lo que se desaprovecha su potencial como matriz alimentaria con un importante contenido de nutrientes para la salud humana (OIC, 2005; Farah, 2012).

No obstante, el creciente interés por la valorización de los subproductos de la agroindustria ha permitido dar a conocer la composición química de la broza y, a su vez, ha incentivado su uso en el desarrollo de investigaciones científicas enfocadas en la innovación y creación de alimentos con propiedades promotoras de la salud (Favela *et al.*, 2004; Villalta, 2016; Vargas, 2009; Quirós, 2014; Moreau, 2003; Rathinavelu & Graziosi, 2005).

Lo anterior se debe a que la broza de café está compuesta por fibra, proteínas, carbohidratos, compuestos antioxidantes y fenólicos. (Arrellano, 2009; Murthy *et al.*, 2012). La concentración elevada de estos últimos compuestos hace que se le catalogue como una materia prima de gran valor y con gran potencial de uso en la industria alimentaria. Los compuestos con capacidad antioxidante son moléculas que tienen la capacidad de retrasar o prevenir la aparición de ciertas enfermedades mediante la neutralización de los radicales libres (Kusoki *et al.*, 2005; Sáyago & Goñi, 2010; Valenzuela & Maíz, 2006).

Es importante destacar que actualmente la capacidad antioxidante se emplea como un buen indicador para categorizar los alimentos con potencialidad para ser consumidos con mayor frecuencia. De igual manera, es importante recalcar que la producción de alimentos con propiedades que contribuyen a la salud de los consumidores (alimentos funcionales) ha generado un impacto significativo a nivel mundial. Los factores determinantes del desarrollo y venta de alimentos funcionales se asocian a un aumento de enfermedades degenerativas, aumento del poder adquisitivo, mayor conocimiento de los consumidores de la relación dieta-salud, entre otros factores (Soto *et al.*, 2006; Sedó, 2001; Barrena & Sánchez, 2004).

En Costa Rica se produce la broza de café deshidratada como una alternativa que permite aumentar el valor agregado al sector cafetalero costarricense, mediante la incorporación de productos comestibles a partir de subproductos considerados como desechos. Actualmente, su producción a nivel industrial se realiza en un micro beneficio ubicado en la provincia de Alajuela, Costa Rica. En dicho micro beneficio, las condiciones de producción desarrolladas garantizan la obtención de un producto inocuo, estable, con cantidades apreciables de compuestos antioxidantes, alto contenido de antocianinas y una coloración atractiva debido a las tonalidades rojo-violeta.

La alta capacidad antioxidante de la broza de café deshidratada está relacionada con las concentraciones de ácido clorogénico (éster del ácido caféico y quínico) y antocianinas presentes en su composición. El primero es el principal compuesto responsable del sabor astringente, pero también posee influencia directa en la pigmentación de la fruta del café (Duarte *et al.*, 2010). Por otra parte, las antocianinas son los pigmentos hidrosolubles mayoritarios responsables de la coloración rojo-violeta (Esquivel & Jiménez, 2011).

Los productos ricos en compuestos antioxidantes poseen la desventaja de ser altamente susceptibles al deterioro por diversos factores, como por ejemplo, las antocianinas son afectadas por altas temperaturas, luz, oxígeno, pH mayores a 4, metales, valores altos de actividad del agua, entre otros (Ortiz *et al.*, 2011; Bolaños, 2015). El ácido clorogénico es susceptible al oxígeno, la luz y a los agentes oxidantes/reductores (Duarte *et al.*, 2010). Por este motivo, las condiciones de almacenamiento, transporte y tipo de

empaques constituyen factores importantes a considerar para reducir las pérdidas de compuestos con capacidad antioxidante en matrices alimentarias, como lo es la broza de café deshidratada.

La selección del empaque que mejor conserve la capacidad antioxidante de un alimento se puede efectuar con base en un estudio que permita cuantificar a lo largo de un determinado tiempo las pérdidas de nutrientes y cambios sensoriales asociados con la temperatura de almacenamiento (que puede incluir el transporte) y el tipo de empaque.

En el caso específico de la broza de café deshidratada, la ejecución de un estudio de almacenamiento para determinar si hay degradación o no de la capacidad antioxidante resulta de especial interés debido a que es un producto de exportación que experimenta constantes fluctuaciones de temperatura durante su transporte vía marítima. Además, existe una notoria diferencia de temperaturas entre el país de origen (Costa Rica) y los países de entrega (Estados Unidos, Canadá, Japón y los países europeos), por lo que el alimento se vuelve más susceptible al daño si no se emplea un empaque adecuado que permita mitigar los cambios bruscos en las condiciones de almacenamiento y el transporte.

El transporte y almacenamiento son los riesgos que se obvian a través de la cadena de producción, ya que se desarrollan mayoritariamente procesos que conserven las propiedades nutricionales (Goodwin & Young, 2011). No obstante, varios estudios mencionan que la degradación de pigmentos y compuestos biofuncionales ocurre en dichas etapas de la cadena, siendo el transporte uno de los puntos donde menos control se ejerce en los productos, debido al alto costo que implica mejorar las condiciones (uso de refrigeración o aislamiento) (Butzke *et al.*, 2012; Wicklund *et al.*, 2005; Ananingsih *et al.*, 2011; Ordoñez *et al.*, 2009; Karkuland *et al.*, 2014).

Es importante destacar que temperaturas de comercialización entre 22-25 °C se consideran idóneas para la conservación de la capacidad antioxidante y contenido de antocianinas (Buenaventura & Castaño, 2002), mientras que a 40 °C la velocidad de pérdida de los polifenoles bioactivos (Urrea *et al.*, 2012) y nutrientes en general (Espinoza *et al.*, 2008) es mayor. Además, el color y el contenido de antocianinas presentan una

degradación acelerada cuando se exponen a temperaturas de 55 y 80 °C, pero no para temperatura ambiente, condiciones de refrigeración y congelación (Villalta, 2016).

Ahora bien, como se mencionó con anterioridad, la conservación a través del tiempo de los nutrientes presentes en los alimentos requiere el uso de materiales de empaque adecuados, ya sean mono o multi capas (Quintana et al., 2007; Castaño *et al.*, 2004). Dichos materiales deben tener altas propiedades de barrera contra la humedad, luz y oxígeno, principalmente. Esto debido a que se ha documentado, a través de estudios de almacenamiento, que los empaques sometidos a algún tipo de transporte permitieron mayor paso de humedad en comparación con los que no pasaron por dicho proceso. Además, la vibración generó fatiga y resquebrajamiento de los empaques, por lo que se generó una disminución en sus propiedades de barrera (Dunno *et al.*, 2016).

El presente estudio pretende evaluar el efecto del almacenamiento de la broza de café deshidratada sobre la conservación de sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales como producto de alto valor nutricional. Para ello, se procederá a analizar diferentes tipos de empaques flexibles, cuyas características mecánicas y físicas permitan conservar las principales propiedades de interés en el producto. Dentro de dichas propiedades destacan el sabor característico, la coloración atractiva rojo-violeta relacionada con el contenido de antocianinas, la capacidad antioxidante en función de la concentración de antocianinas y ácido clorogénico y el mantenimiento de las condiciones microbiológicas aptas para ser catalogada como un alimento inocuo (Jacuinde *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar las condiciones de empaque y temperatura de almacenamiento en condiciones reales (actuales) y condiciones controladas de la broza de café deshidratada que permitan conservar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales durante un tiempo de almacenamiento que corresponda al período total de comercialización del producto de broza deshidratada (desde que se produce hasta que se consume).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.2.1 Seleccionar las mejores estructuras de empaque, evaluando las propiedades de permeabilidad de gases y el sello, de diferentes tipos de empaque, para su posterior uso en la conservación del contenido de antocianinas y ácidos clorogénicos con capacidad antioxidante presentes en la broza de café deshidratada.
- 2.2.2 Evaluar la influencia de la temperatura y tipo de empaque durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada sobre las variaciones en la capacidad antioxidante asociada al contenido de antocianinas y ácido clorogénico, contenido de humedad, color y sabor para la recomendación de la temperatura de almacenamiento y tipo de empaque.
- 2.2.3 Determinar la estabilidad microbiológica de la broza de café deshidratada en función de las variaciones de la temperatura y tipo de empaque para la garantía de la calidad e inocuidad microbiológica durante las condiciones de almacenamiento que corresponden al período total de comercialización del producto de broza deshidratada.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades del grano de café

El grano de café se obtiene de la fruta del arbusto del género *Coffea* de la familia *Rubiacea*. Las principales especies con importancia económica a nivel mundial son *Coffea Arábica* (Arábica) y *Coffea Canephora* (Robusta). Las cuales representan el 75% y 25% de la producción mundial de café, respectivamente (Mussatto *et al.*, 2011b).

En Costa Rica se cultiva únicamente café de la especie *Arábica*, en donde predominan las variedades Caturra y Catuaí. Dichas variedades brindan un grano con mayor calidad, así como también características sensoriales agradables (olor y sabor) que garantizan una calidad superior en cada taza de café (Mora, 2008).

En cuanto al sector cafetalero costarricense, el proceso de obtención del grano del café se tiene estandarizado por medio de la vía húmeda, debido a la variedad que se produce (*C. Arábica*). Dicho método permite una mejor conservación de la calidad del café, pero posee la desventaja de generar grandes cantidades de residuos, dentro de los cuales destaca la broza (Mora, 2008).

Las cantidades tan altas de residuos generados durante el procesamiento del café se hacen aún más notables si se parte del entendimiento de que el café es el segundo producto que mayor cantidad de divisas moviliza a nivel mundial, superado únicamente por el petróleo. Su consumo a nivel global, para el año 2018, fue de 161 739 000 sacos (cada saco con 60 kilogramos de producto), lo cual representa aproximadamente 600 mil millones de tazas de café. Adicionalmente, para ese mismo año, se contabilizó una producción total de café de 168 093 000 sacos (cada saco con 60 kilos de producto) generada por todos los países exportadores (OCI, 2019a; OCI, 2019b).

### 3.2 Broza de café

La broza representa la pulpa y cáscara obtenidas como primer producto de desecho durante el procesamiento agroindustrial del café. La cáscara y la pulpa constituyen aproximadamente un 12% y 29% del peso seco del fruto de café, respectivamente (Blinova *et al.*, 2017). Dichos porcentajes equivalen a la generación de 0,5 toneladas de pulpa y 0,18 toneladas de cáscara por cada tonelada de café recién procesado (Janissen & Huynh, 2018).

En cuanto al impacto a nivel global de la generación de broza, se debe destacar que la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (2010) publicó que en dicho país se producen al año 162 900 toneladas de broza por cada millón de sacos de café de 60 kg que se exportan. La cantidad previamente mencionada es equivalente a una contaminación ambiental generada durante un año por una población de 868 738 habitantes.

Las anteriores son cifras que se pueden considerar alarmantes debido a que Colombia es el tercer país con mayor producción de café a nivel mundial (9,42% de la producción mundial), siendo solamente superado por Brasil (30,16%) y Vietnam (19,18%) (OCI, 2019 c). Por lo tanto, el impacto negativo a nivel ambiental que posee la producción de broza de café como residuo de la actividad cafetalera es un tema que debe ser abordado con prioridad tomando en consideración que el café se cataloga como una de las bebidas con mayor posicionamiento y consumo a nivel mundial.

Ahora bien, en Costa Rica, el procesamiento industrial del café permite que el país se ubique en la posición número catorce a nivel mundial con una generación del 1,04% (OCI, 2019 c). Al igual que en otros países, se generan grandes cantidades de residuos de broza, los cuales al no ser aprovechados en su totalidad, terminan convirtiéndose en contaminantes ambientales.

El impacto negativo que produce la broza de café en el ambiente se debe a la lixiviación de altas cantidades de compuestos orgánicos presentes en su composición, como lo son azúcares, cafeína, los taninos, el ácido clorogénico, entre otros. Dichos compuestos generan graves efectos ecotoxicológicos debido al aumento de la demanda bioquímica y la

demanda de oxígeno del agua, la cual posteriormente va a estar en contacto con ecosistemas acuáticos y con zonas de cultivos (Fernández *et al.*, 2017).

### **3.3 Valor agregado efectuado para reducir el impacto ambiental de la broza de café**

El valor agregado que se le ha dado a través de los años a la broza de café ha permitido su uso como fuente para producir biocombustible, fertilizantes para suelos, obtención de fibra dietética y fuente de carbono para la producción de enzimas, extracción de compuestos bioactivos, utilización como sustrato para cultivo de cepas de hongos, obtención de aromas frutales, entre otros más (Woldesenbet *et al.*, 2016; Murthy & Naidu, 2012b; Buntic *et al.*, 2016; Ngo & Phan, 2016; Machado *et al.* 2012; Al-Dhabi *et al.* 2017; Velázquez *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2000).

No obstante, dicho valor agregado se encuentra limitado, debido a que, como se mencionó con anterioridad, posee altas cantidades de compuestos orgánicos que dificultan su utilización. Por ejemplo, las altas concentraciones de ácido clorogénico hacen que su aplicación como fertilizante en plantas se efectúe en concentraciones reducidas, debido a que puede llegar a ser fitotóxico para la germinación de las semillas y el crecimiento de plantas (Fernández *et al.*, 2017).

Ahora bien, en el caso específico de los compuestos bioactivos, su obtención y diversificación de usos han promovido un creciente interés en la investigación de sus propiedades nutricionales, y en la creación de subproductos comestibles a partir de residuos agroindustriales, esto con el objetivo de desarrollar alimentos con propiedades funcionales para la salud humana (Sáyago & Goñi, 2010; Quirós, 2014; Moreau, 2003).

### **3.4 Utilización de la broza de café como subproducto aprovechable para el ser humano**

A diferencia de lo que ocurre con el medio ambiente, algunos de los componentes presentes en la broza pueden ser beneficiosos como fuente de nutrimentos para el ser humano. Esto último si se efectúa un procesamiento adecuado que permita garantizar que

las concentraciones de cada compuesto son las adecuadas, así como también la inocuidad de la misma.

Es por ello que diversos estudios se han centrado en caracterizar y cuantificar, por medio de análisis químicos, la composición química de la broza de café. Dichas investigaciones han encontrado que la principal limitante en el uso de los subproductos del café es que en su composición se encuentra una cantidad significativa de compuestos fenólicos asociados con propiedades antinutricionales. En donde destaca la concentración elevada de cafeína, taninos y ácidos clorogénicos (Kumar, 2018; Janissen & Huynh, 2018; Geremu *et al.*, 2016; López & Gallegos, 2014; Ramírez, 1987).

Los taninos son compuestos que se encuentran principalmente en la corteza de las plantas. Se los considera compuestos antinutricionales debido a que pueden ser fácilmente afectados por la presencia de estructuras químicas variables y su posible polimerización (Wei *et al.*, 2012). No obstante, los taninos también presentan propiedades beneficiosas para la salud humana, dentro de las cuales destaca su uso como antiinflamatorio, antialérgico, antibacteriano y como tratamiento contra enfermedades cardiovasculares (Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Bagchi *et al.*, 2000). Por su parte, la cafeína, en concentraciones moderadas, produce beneficios en la salud relacionados con la disminución del riesgo de obesidad, reducción de los síntomas del Parkinson, retraso del deterioro cognitivo, entre otros (Hino *et al.*, 2007; Trevitt *et al.*, 2009). Por su parte, el ácido clorogénico posee propiedades beneficiosas para la salud debido a sus propiedades como antioxidante, hepatoprotector, entre otras (Zhou *et al.*, 2016; Barahuie *et al.*, 2017; Mikami & Yamazawa, 2015).

Debido a los beneficios que ofrece el consumo balanceado de dichos compuestos (considerados como antinutricionales), se han desarrollado métodos que permiten reducir o degradar su presencia a niveles aceptables con el objetivo de “desintoxicar” los subproductos del café. Dentro de los métodos más utilizados se encuentran el empleo de procesos no fermentativos y fermentativos. En el primer caso, en los no fermentativos, se usa la extracción de moléculas bioactivas, mientras que en los métodos fermentativos se recurre a la acción de microorganismos. En estos últimos destaca la fermentación y el

compostaje inoculado con cepas fúngicas específicas (por ejemplo *Aspergillus* sp.), las cuales tienen una alta eficiencia en la degradación de la cafeína o reducción de la cantidad de compuestos volátiles a niveles aceptables, al mismo tiempo que se aumenta la cantidad de carbonos y nitrógenos (Murthy & Naiud, 2010).

### **3.5 Composición química de la broza de café**

La broza de café, como se mencionó anteriormente, está compuesta principalmente por pulpa y cáscara, pero puede contener pequeñas cantidades de mucilago y de pergamino según el estado de madurez del fruto (Blinova *et al.*, 2017).

La madurez del fruto del café, al igual que la especie de la cual se obtenga (*Arábica* o *Robusta*), son factores que influyen de manera directa en la composición química de la broza y del grano. Por ejemplo, el grano de café de la variedad *Coffea Arábica*, en comparación con *Coffea Canephora*, posee mayor cantidad de lípidos y sacarosa, pero menor concentración de polisacáridos, cafeína, ácidos clorogénicos, entre otros compuestos (Trejos *et al.*, 2018).

De acuerdo con Pandey *et al.*, (2000), los macronutrientes presentes en la pulpa y en la cáscara obtenidos de la variedad de café Arábica difieren muy poco entre sí. La principal diferencia reside en la cantidad porcentual de dichos compuestos debido a variaciones en las condiciones del procesamiento efectuado.

En el cuadro I se muestra la caracterización fisicoquímica de la pulpa y la cáscara de café mediante su composición porcentual en base seca. En dicho cuadro se puede notar que los dos componentes son ricos en carbohidratos, minerales y proteínas. Además, se caracterizan por ser ricos en fibra dietética y compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes (Murthy & Naidu, 2012).

**Cuadro I.** Composición porcentual en base seca de la pulpa y cáscara de café obtenidos como subproductos del procesamiento del café.

<b>Componentes</b>	<b>Pulpa (% base seca)</b>	<b>Cáscara (% base seca)</b>
<b>Carbohidratos</b>	44,0-50,0	57,8
<b>Celulosa</b>	63,0	43,0
<b>Hemicelulosa</b>	2,3	7,0
<b>Fibra total</b>	18,0-21,0	31,9
<b>Lípidos</b>	2,5	1,5-2,0
<b>Proteína</b>	10,0-12,0	9,2
<b>Nitrógeno</b>	3,2	1,8
<b>Cafeína</b>	1,25-1,30	1,20
<b>Taninos</b>	1,8-8,6	4,5-9,3
<b>Ácido clorogénico</b>	10,7	12,59

Fuente: Pandey *et al.*, 2000; Murthy & Naidu, 2012; Brand *et al.*, 2000.

### 3.6 Compuestos fenólicos y su importancia

#### 3.6.1 Definición

Los polifenoles, también denominados compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios que se sintetizan en las plantas como medio de defensa frente a enfermedades e insectos. Su presencia se encuentra relacionada con la fisiología de la planta, debido a que ejercen funciones esenciales asociadas con estructura, resistencia a patógenos, polinización, pigmentación, crecimiento, desarrollo y protección contra la radiación UV abiótica (Sarkar & Shetty, 2014).

#### 3.6.2 Clasificación

La estructura química de los polifenoles se caracteriza por estar compuesta por un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos de benceno. Es por ello que su clasificación se puede basar en la cantidad de anillos de benceno que posee la molécula, o en los elementos que unen entre sí dichos anillos de benceno. De acuerdo con Shetty & McCue (2003), una

de las principales formas de clasificar los polifenoles es en flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y ligninas.

Los flavonoides destacan como la clase más abundante en las plantas, con más de 600 estructuras dilucidadas. Se pueden dividir en seis subclases, las cuales son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles (flavan-3-ols), isoflavonoides y antocianidinas (Shetty & McCue, 2003). En cuanto a las antocianidinas, estas son moléculas responsables de los colores rojos, morados y anaranjados en frutas, flores y hojas de la mayoría de plantas. La cianidina se cataloga como la antocianidina más común en alimentos. No obstante, a nivel vegetal, es muy común encontrar la presencia de antocianinas. Estos últimos son glucósidos de antocianidinas, y también son responsables de las coloraciones previamente mencionadas (Wrolstad *et al.*, 2005).

Ahora bien, los ácidos fenólicos o ácidos fenolcarboxílicos, mencionados con anterioridad (forman parte de la clasificación general de los compuestos fenólicos), son el segundo tipo de compuestos que se encuentran con mayor abundancia, después de los flavonoides. Dichos ácidos se categorizan en dos grupos: ácidos hidroxicinámicos (HCA) y ácidos hidroxibenzoícos (HBA). Los primeros se caracterizan por la presencia del grupo  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  y se encuentran en alimentos como los arándanos, las uvas, el café, el cereal, entre otros. Mientras que los ácidos hidroxibenzoícos presentan un grupo carboxílico y uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático (Tsao, 2010).

### **3.6.3 Importancia en la salud humana**

La importancia de los polifenoles a nivel de salud humana se asocia con su potencial antioxidante. Es decir, su capacidad de brindar protección frente a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y los daños provocados por la presencia de radicales libres, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, trastornos autoinmunes, entre otras (Geremu *et al.*, 2016; Tsao, 2010).

El potencial antioxidante de las moléculas resulta de especial interés debido a que el ser humano no puede sintetizar (producir) compuestos antioxidantes, por lo que su obtención se logra mediante el consumo de una dieta balanceada a base de alimentos de

origen vegetal con alto contenido de compuestos fenólicos. Dichos alimentos constituyen la principal fuente de antioxidantes en la dieta. No obstante, se tiene la ventaja de que aún en bajas concentraciones, los compuestos fenólicos como moléculas antioxidantes mantienen su capacidad de prevenir o retrasar la oxidación de lípidos y otras biomoléculas, y por ende evitar o retrasar la aparición de las enfermedades previamente mencionadas (Sarkar & Shetty, 2014).

Aunado a ello, es importante destacar que la biodisponibilidad de dichos compuestos fenólicos es trascendental para determinar sus efectos saludables en la posible prevención de enfermedades. Es por ello que se parte del entendimiento de que la biodisponibilidad es definida como la porción o fracción de un nutriente o compuesto, que una vez ingerido logra alcanzar la circulación sistémica y los sitios específicos en donde tienen la capacidad de ejercer su actividad biológica como compuesto bioactivo (Porrini & Riso, 2008).

### **3.7 Principales compuestos fenólicos con capacidad antioxidante presentes en la broza de café**

La concentración de polifenoles o compuestos fenólicos varía significativamente según la fuente alimentaria de origen vegetal (especie y variedad), el grado de madurez, la sección de la planta de la cual proviene (ej: semilla, hoja), entre otros factores. En el caso específico de la broza de café, su perfil fenólico se caracteriza por ser rico en sustancias biológicas activas y polifenoles como las antocianinas, ácido clorogénico, ácido ferúlico, quercetina, ácido quinolínico, entre otros más (Pandey *et al.*, 2000; Murthy & Naidu, 2012; Brand *et al.*, 2000). A continuación se detallan dos de los más abundantes, los cuales serán analizados en la presente investigación.

#### **3.7.1 Ácidos Clorogénicos**

Los ácidos clorogénicos son los principales ácidos fenólicos presentes en la broza de café que tienen alta capacidad antioxidante. Son polifenoles solubles formados por la esterificación del ácido quínico, en donde los sustituyentes más comunes son el ácido caféico y ácido ferúlico (Gauthier *et al.*, 2016).

Las principales clases de ácido clorogénico son el ácido cafeicoquinico (CGA), ácido feruloilquinico (FGA o FQA) y ácido dicanoilquinico (diCGA o diCQA). Estos a su vez se subdividen según la posición de sus sustituyentes. En el cuadro II, se muestran las clases de ácidos clorogénicos obtenidos en variedades de cáscara de café de México e India. En dicho cuadro se puede notar que el ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA) es el componente mayoritario, motivo por el cual se le tiende a denominar de forma generalizada como ácido clorogénico.

**Cuadro II.** Concentración (mg/g) de los diferentes ácidos clorogénicos obtenidos en la cáscara de café *Arábica* provenientes de México e India.

Compuesto	Abreviación	Concentración (mg/g)	
		México	India
Ácido 3-O-cafeoilquinico	3-CGA	0,1±0	< 0,1±0
Ácido 5-O-cafeoilquinico	5-CGA	1,9±0,8	0,2±0,1
Ácido 4-O-cafeoilquinico	4-CGA	0,2±0,1	< 0,1±0
Ácido 4-O-feruloilquinico	4-FQA	0,1±0	< 0,1±0
Ácido 5-O-feruloilquinico	5-FQA	< 0,1±0	< 0,1±0
Ácido 3,4-O-dicafeoilquinico	3,4-diCQA	< 0,1±0	< 0,1±0
Ácido 3,5-O-dicafeoilquinico	3,5-diCQA	0,1±0	0,1±0

Fuente: Bondensson, 2015.

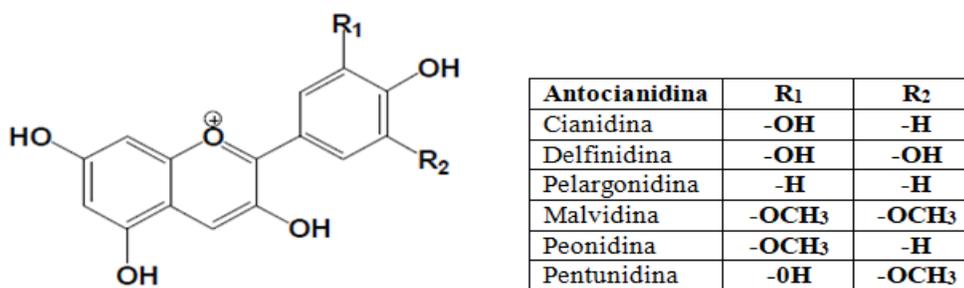
Los ácidos clorogénicos presentes en la broza de café, y al igual que en otras fuentes de alimento de origen vegetal, poseen funciones relacionadas con la pigmentación y sabor astringente. El efecto directo en el sabor del café varía en función de su concentración (Bondensson, 2015).

Ahora bien, en cuanto a las propiedades antioxidantes de los ácidos clorogénicos, se les relaciona con su capacidad de unirse covalentemente a la pared celular en conjunto con antocianinas, carotenoides, tocoferoles, entre otros compuestos (Murthy & Naidu, 2010). Además, sus efectos positivos en la salud han sido documentados en diversos estudios como por ejemplo el tratamiento de lesiones oxidativas intestinales y protección contra el daño oxidativo de macromoléculas como el ADN, lípidos y proteínas (Tsao, 2010).

### 3.7.2 Antocianinas

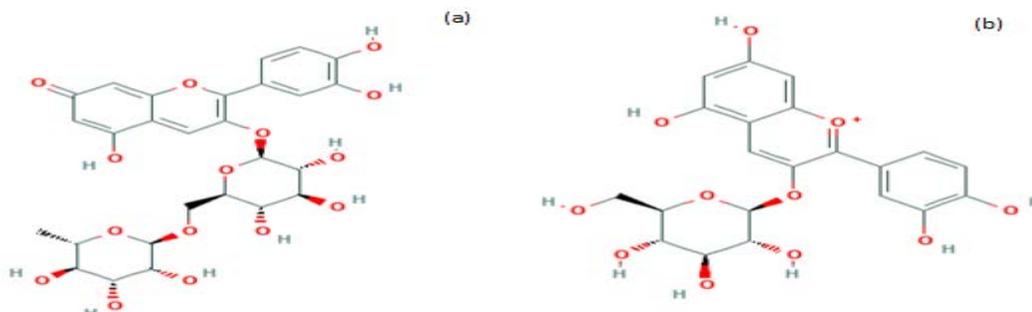
Las antocianinas son un grupo de pigmentos hidrosolubles que van desde la gama de colores amarillos a azules, siendo los de color rojo los más habituales. A nivel químico, están constituidas por la unión de una antocianidina (aglicona) y un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura básica de la aglicona es el ión flavilio (también denominado 2-fenilbenzopirilio), el cual generalmente funciona como un catión. Dicho ión flavilio se compone de dos grupos aromáticos, los cuales son un benzopirilio y un anillo fenólico. La cantidad y posición de los sustituyentes químicos en el ión flavilio son factores determinantes en el color de las antocianinas, ya que si se aumenta la cantidad de grupos hidroxilos en el anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que al aumentar la cantidad de grupos metoxilos se da la formación del color rojo (Ortiz *et al.*, 2011; Patay *et al.*, 2016).

En la actualidad se tienen contabilizadas aproximadamente 20 antocianidinas. Las más conocidas son la cianidina, pentunidina, pelargonidina, delfinidina, peonidina y malvidina. Dichas antocianidinas, al combinarse con los diferentes azúcares, generan aproximadamente 150 tipos de antocianinas (Ortiz *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Estructura química con los respectivos sustituyentes que conforman los principales tipos de antocianidinas (Tasao, 2010).

En el caso específico de la cáscara de café, las antocianinas que predominan son cianidina 3-o-rutinosido y cianidina-3-glicosido, las cuales se muestran en la figura 2.



**Figura 2.** Estructura química de cianidina 3-o-rutinosido (a) y cianidina-3-glicosido (b) (NCBI, 2019).

La importancia de las antocianinas a nivel alimentario se debe a que imparten características sensoriales (colores atractivos) y también poseen un efecto protector en la salud humana. En donde destacan funciones como lo son su actividad antioxidante, mejoras en la agudeza visual y comportamiento cognitivo, agentes quimio protectores, efectos antidiabéticos (control de lípidos y de la secreción de insulina), efectos vasoprotectores y antiinflamatorios, entre otros (Rojano *et al.*, 2012; Etherthon, 2004).

### 3.8 Factores que influyen en la estabilidad o degradación química de las antocianinas y ácido clorogénico como compuestos con capacidad antioxidante

Las antocianinas y los ácidos clorogénicos poseen la desventaja de tener una baja estabilidad asociada a diversos factores que transforman o alteran su estructura molecular. Es por este motivo que el análisis y comprensión de dichos factores se vuelve determinante para la búsqueda de alternativas que permitan disminuir su degradación o transformación a través del tiempo. A continuación, se describen brevemente los principales factores que afectan la estabilidad de las antocianinas y ácidos clorogénicos:

- **pH:** El incremento del pH aumenta la degradación de las antocianinas, ya que su mayor estabilidad se da en condiciones ácidas, en las cuales predomina el ión flavilio, el cual le confiere el color rojo. Al modificar las condiciones de pH hacia

un medio neutro o alcalino, se da una pérdida de color en las antocianinas debido a que el equilibrio se desplaza hacia sus formas incolores, denominadas carbinol y chalcona (Rojano *et al.*, 2012).

- **Temperatura:** Tanto los tratamientos térmicos como las temperaturas durante el almacenamiento son factores que influyen en la degradación de compuestos funcionales. Debido a que afectan su estructura y aumentan su cinética de degradación (Zapata *et al.*, 2016). Se ha demostrado por medio de diversos estudios que conforme aumenta el tiempo de exposición a altas temperaturas se obtiene una mayor pérdida del compuesto, siendo mayor la degradación a temperatura ambiente en comparación con temperaturas de refrigeración. Sin embargo, al disminuir la temperatura, las reacciones enzimáticas y de descomposición se ven reducidas (Flores & Flores, 2018).
- **Oxígeno:** La presencia de oxígeno puede acelerar la degradación de compuestos funcionales mediante un mecanismo oxidativo directo o por medio de la acción de enzimas oxidativas (Bastos & Alves, 2004).
- **Enzimas:** Las enzimas son compuestos de origen biológico, animal o vegetal capaces de acelerar la rapidez de las reacciones químicas (actividad catalítica). La principal enzima endógena presente en el café es la polifenoloxidasas (PPO), la cual pertenece al grupo de las oxidoreductasas (EC1) que son las que se encargan de catalizar la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. La polifenoloxidasas (PPO) cataliza la oxidación de ácido clorogénico a o-quinona, y esta última reacciona con las antocianinas para formar un producto de condensación que genera colores marrones no deseados (Patras *et al.*, 2010).

La reacción de la PPO sobre los compuestos fenólicos se genera una vez que el tejido celular es dañado (producto de cortes o por operaciones unitarias como el despulpado), por lo que entran en contacto los compuestos fenólicos (presentes en las vacuolas) y la enzima (presente en el citoplasma) debido a un rompimiento de la separación natural a nivel intracelular que los mantiene alejados. Para disminuir o eliminar la presencia del deterioro de la calidad de los alimentos se han estudiado

diferentes métodos, que pueden ser aplicados solos o combinados para desactivar la PPO, como por ejemplo la aplicación de calor, antioxidantes o inhibidores. No obstante, los efectos de cada método varían en función de la fuente de origen vegetal y de la variedad, ya que los niveles de PPO varían según la especie, estado de maduración y estadio fenológico. Por ejemplo, Terefe *et al.* (2010), demostraron que en muestras de purés de fresa (9 °Brix y pH=3,7) la PPO presentó una ligera disminución de su actividad (28%) después de haber sido expuesta a 100 °C durante 30 minutos. Además, observaron que se generó un aumento de la actividad de la PPO después de ser tratada a 40 y 50 °C.

- **Intensidad de luz:** La exposición de los compuestos funcionales a la luz hace que se aceleren las reacciones de degradación. La intensidad de luz es un factor determinante, ya que a mayor intensidad la degradación puede abarcar casi el 50% (Laleh *et al.*, 2006).
- **Otros:** Presencia de proteínas, iones metálicos, ácido ascórbico, entre otros.

### **3.9 Importancia de la selección del tipo de material de empaque para la protección de los compuestos funcionales en la broza de café deshidratada**

#### **3.9.1 Generalidades de los empaques**

Los empaques son estructuras que se encargan de preservar y proteger la calidad de los productos a lo largo de su ciclo de vida, el cual comprende desde la fabricación hasta el momento de consumo. Además, en la mayoría de los casos, forman parte importante del proceso de mercadeo de los alimentos (Kim, 2016).

Los empaques en contacto directo con los alimentos pueden clasificarse de forma general en dos grandes grupos, los cuales son rígidos (botellas o envases duros) y flexibles (laminas). En ambos casos, la selección de los materiales que conforman los empaques se determina en función del tipo de alimento que van a contener y de los requerimientos que permitan garantizar el mantenimiento adecuado de la calidad microbiológica, sensorial y química. Para ello, se efectúan consideraciones en torno a las propiedades de barreras

contra el ingreso de humedad, gases, entre otros factores que puedan dañar el producto (Kim, 2016).

### **3.9.2 Evaluación de la idoneidad de los empaques en función de sus características físicas**

Actualmente existe una gran cantidad de materiales de empaque, que van desde los biodegradables (denominados de tercera generación) hasta los sintéticos (primera generación). Las características físicas y el precio varían significativamente entre ellos. Dichas características físicas determinan su idoneidad de uso en la industria alimentaria. Ya que además de ser capaces de contener y proteger el alimento, deben poder garantizar su inocuidad (Sangerluab *et al.*, 2018).

Para evaluar las características físicas de los empaques y conocer la forma en que afectarán la vida útil de un alimento, es muy común medir sus propiedades de barrera. Dichas propiedades hacen alusión a la resistencia física que se opone al paso de cualquier molécula o compuesto capaz de difundirse a través del polímero, como por ejemplo oxígeno, agua, dióxido de carbono, aromas, entre otros. Es por ello que actualmente se emplea el uso del índice de permeabilidad (P), velocidad de transmisión del oxígeno (VTO) y velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) como principales criterios. Se busca que dichos criterios que sean bajos, es decir, que el intercambio de moléculas entre el ambiente exterior y el producto envasado sea muy bajo.

Ahora bien, es importante destacar que las propiedades de barrera de cada material varían en función de determinados factores. A continuación se detallan los principales:

- **Estructura química:** Los polímeros polares hidrófilos, cuando están secos, representan una buena barrera contra el ingreso y salida de gases y vapores orgánicos, pero conforme aumenta la humedad, dicha barrera disminuye. Los polímeros no polares no se ven afectados por la humedad, pero a nivel general sus propiedades de barrera son menos eficientes en comparación con los polímeros polares (Kim, 2016).

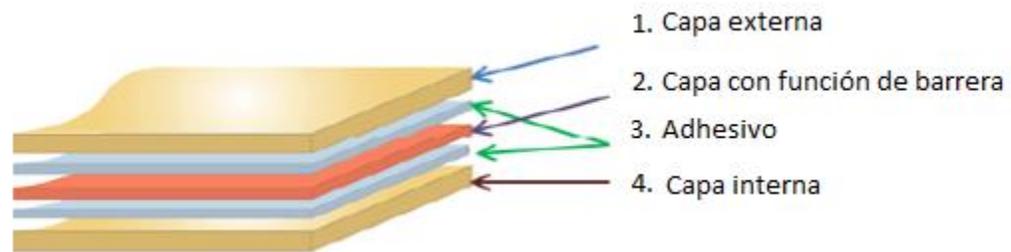
- **Uso de materiales combinados (multicapas):** La combinación de distintos polímeros hace que se modifique la polaridad, configuración y dimensiones del empaque, lo cual reduce la permeabilidad de las moléculas y por lo tanto, la capacidad de difusión a través del empaque es menor (Sangerluab *et al.*, 2018).
- **Grosor:** Las propiedades de barrera de las películas varían en función de su grosor, ya que dicho parámetro determina la distancia que el vapor de agua y/o gases deberán recorrer para difundirse de un lado al otro de la película. Por tanto, cuanto mayor sea el grosor mayor es la resistencia a la transferencia de masa y, por ende, se asegura una mayor estabilidad del alimento a través del tiempo (Gómez 2011).
- **Temperatura:** Los cambios bruscos de temperatura o la exposición a altas temperaturas durante periodos extensos (ej: almacenamiento), ocasionan un aumento en la permeabilidad del empaque asociado a alteraciones en su estructura (densidad molecular) y acomodo de los polímeros. Por lo tanto, la consideración de la temperatura de almacenamiento y la posibilidad de cambios bruscos es trascendental en la selección de los materiales con el fin de garantizar que tenga la capacidad de mantener y extender la vida útil del producto para el cual fue previsto (Farmer, 2013; Berk, 2009).
- **Humedad relativa:** La humedad relativa durante el almacenamiento afecta las propiedades de las películas hidrofílicas ya que al agua actúa como agente plastificante de los polímeros. Es decir, incrementa su permeabilidad y flexibilidad (Farmer, 2013).

### 3.9.3 Utilización de empaques flexibles multicapas

En el caso específico de los productos deshidratados, como lo es la broza de café, la protección frente a la humedad es trascendental, ya que el agua ocasiona pérdida de sus cualidades sensoriales físicas, por lo que su vida útil disminuye. Por lo tanto, una baja permeabilidad al vapor de agua es un requisito importante en las propiedades del empaque. De igual manera, es imprescindible cumplir con otras características que garanticen la conservación de sus cualidades nutricionales o funcionales, al mismo tiempo que se disminuyen los costos de producción. Algunas de las características deseables son: que los

componentes del empaque no interactúen con el alimento, alta resistencia al sellado, impedimento del paso de la luz, entre otros.

Para poder cumplir con la mayoría de los requisitos nombrados con anterioridad, es común que se empleen estructuras flexibles (empaques) multicapas. Dichas estructuras están compuestas por varios polímeros, los cuales son unidos mediante procesos de laminación o co-extrusión. En la figura 3 se muestra gráficamente la composición general de un empaque multicapa a base diferentes láminas.



**Figura 3.** Visualización gráfica de la composición estructural de un empaque flexible multicapa.

La ventaja a nivel tecnológico de las estructuras multicapas reside en que cada uno de los polímeros va a tener un efecto en el rendimiento y las propiedades de barrera del empaque, por lo que se espera que dicho rendimiento mejore. Por ejemplo, al utilizar etileno vinil alcohol (EVOH) con aluminio (combinación de bajo costo) se logra optimizar la barrera contra el oxígeno y el vapor del agua, y al mismo tiempo se aumenta la resistencia a roturas y la flexibilidad del empaque (Gómez, 2011).

### **3.10 Métodos para medir la degradación o conservación de las características físicas, sensoriales y microbiológicas de la broza de café**

#### **3.10.1 Métodos fisicoquímicos**

##### **3.10.1.1 Cuantificación de compuestos funcionales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida de alto rendimiento, conocida como HPLC, por sus siglas en inglés, es un método que permite separar compuestos de una muestra por medio de diferencias de retención entre una fase estacionaria y una fase móvil. El mecanismo de separación consiste en introducir la muestra de interés en pequeñas cantidades, para posteriormente obtener los componentes que la conforman de manera separada debido a que se retrasan de forma diferente dependiendo de las interacciones químicas o físicas que experimentan con la fase estacionaria y la fase móvil. Dicha fase estacionaria corresponde al material que reviste la columna cromatografía (cilindro con pequeñas partículas redondeadas), y puede estar elaborada con base en un sólido con capacidades adsorptivas o de exclusión, o un soporte inerte revestido con una fase líquida (Lough & Wainer 2012; Corradini *et al.*, 2011).

Las dos técnicas de separación que se emplean con mayor frecuencia en HPLC son por medio del uso de una fase normal (NP-HPLC) y una fase reversa (RP-HPLC). Dicha clasificación se emplea con base en las polaridades de la columna (de la fase estacionaria). En ambos tipos se usa una columna de fase sólida que interactúa con los componentes de la muestra, es decir, con los analitos. La diferencia consiste en que en la NP-HPLC se emplea una fase estacionaria polar y la fase móvil es no polar. En la RP-HPLC la fase estacionaria es polar y la fase móvil tiene una polaridad moderada (Corradini *et al.*, 2011).

Ahora bien, la identificación de los compuestos que se analizan por medio de HPLC requiere la utilización de detectores de señales que midan diferentes propiedades fisicoquímicas de las moléculas, como por ejemplo la absorbancia. La absorbancia o espectro de absorción de luz de una sustancia se selecciona con base en una longitud de onda (nm) específica, la cual puede usarse de forma que se obtenga el valor de absorbancia máxima (máxima sensibilidad) que presenta el compuesto de interés. La señal obtenida será

representada gráficamente (cromatogramas) en función del tiempo de retención, y será proporcional a la concentración de analito de interés (Parriot 2012).

En el caso específico de las antocianinas, presentan un espectro de absorción característico con bandas entre los 250nm, 370nm y 500-540 nm (utilizadas con mayor frecuencia debido al pH del medio). Por su parte, los ácidos clorogénicos utilizan longitudes de absorción entre 327-330 nm, debido a que en dicho rango se logra cuantificar el ácido clorogénico 5-ACQ, el cual es el más abundante (Bastos & Alves, 2004; Lough & Wainer 2012).

### **3.10.1.2 Color instrumental**

Las mediciones de color son de gran utilidad en los alimentos debido a que se emplean para analizar la evolución de la calidad o estado de un alimento en función de la identificación de posibles cambios, presencia de inconsistencias, deterioro, entre otros factores relacionados con el color. La importancia de dichas mediciones a nivel alimentario se debe a que el color representa el primer parámetro percibido y utilizado por los consumidores para evaluar la calidad de un alimento, y posteriormente aceptar o rechazar su consumo (Domínguez *et al.*, 2012).

Las mediciones colorimétricas requieren la comprensión de que los términos que describen el color se pueden dividir en subjetivos (psicosensoriales) y objetivos (psicofísicos). Los subjetivos abarcan la luminosidad, el brillo, la tonalidad, saturación, croma y coloración. Los términos objetivos hacen referencia al estímulo, el cual se evalúa por medio de distribuciones espectrales (reflectancia o transmitancia) del objeto y de la respuesta del observador. Dichas mediciones se obtienen por medio de colorímetros, y posteriormente se logra relacionar los términos subjetivos con los objetivos mediante el uso de terminologías específicas, las cuales son obtenidas a través del desarrollo de ecuaciones matemáticas (MacDougall, 2002; Mac Adam 2013).

Los colorímetros son dispositivos que emulan la respuesta del ojo humano al color y la luz por medio del uso de tres filtros con colores predeterminados (rojo, azul y verde). Dichos dispositivos permiten obtener parámetros numéricamente precisos y comprensibles

mediante un lenguaje estándar y conocido, al cual se le denomina como espacio de color (Mac Adam, 2013).

El espacio de color corresponde al método que se emplea para comunicar el color de un objeto de forma objetiva, uniforme y estandarizada. Para ello se pueden emplear diferentes sistemas o escalas como lo son CIELAB, CIELCH o CIE XYZ. Las dos primeras son las escalas más utilizadas debido a que logran mayor uniformidad en los resultados y, a su vez, permiten correlacionar los valores numéricos con la percepción visual de los seres humanos y con el tamaño del objeto percibido. Es decir, representan mejor las diferencias de color según como lo perciben los seres humanos. No obstante, la principal diferencia reside en que la escala CIELAB utiliza coordenadas rectangulares mientras que la escala CIELCH coordenadas cilíndricas (Agostón 2013).

En el caso específico de la escala CIELCH, se utilizan los parámetros de luminosidad ( $L^*$ ), hue o tono ( $H^*$ ) y croma o saturación ( $C^*$ ) por medio del uso de coordenadas cilíndricas. El tono corresponde a los colores rojo/verde o azul/amarillo, según el ángulo expresado en grados que presentan las coordenadas cromáticas  $a^*$  y  $b^*$ . El croma se define como la coloración vista en función de la cantidad de brillo percibido, el cual se representa por medio del eje vertical ( $L^*$ ). Es decir, determina si el color analizado se encuentra más cercano al color neutro (gris) o al matiz puro (Rettig & Hen 2014; Caivano & Buera 2012).

Adicionalmente, se puede determinar las diferencias de color entre una muestra y un estándar o entre dos muestras. Dicha determinación puede ser obtenida y expresada numéricamente por medio de la diferencia total de color ( $\Delta E$ ), el cual es un parámetro que permite identificar diferencias de color en una misma muestra que no son visibles para el ojo humano.

### 3.10.1.3 Contenido de Humedad y Actividad del Agua

El agua es uno de los principales componentes de muchos alimentos, motivo por el cual sus propiedades coligativas, reológicas y su abundancia, influyen en cómo será el alimento en cuanto a textura, sabor, tiempo de vida útil y otras características (Badui, 2013).

La presencia del agua en las matrices alimentarias se encuentra presente de forma heterogénea, debido a que su afinidad o unión varía en función del tipo de molécula con la cual interactúa (lípidos, proteínas, carbohidratos). Es por ello que actualmente se utiliza el modelo de monocapa BET para ilustrar de forma simplificada la distribución del agua en matrices alimentarias (Louis & Stewart, 2013).

El modelo BET clasifica el agua en tres tipos o fracciones: libre, ligada e inmovilizada. En donde el agua libre (capa más externa del modelo BET) representa la porción que posee libertad de movimiento y puede ser congelada o evaporada, debido a que solamente interactúa con otras moléculas de agua. Dicha porción de agua puede ser cuantificada mediante métodos analíticos, y es la principal responsable de la actividad del agua relacionada con reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas en el alimento. Por su parte, el agua inmovilizada (capa intermedia modelo BET) corresponde a la porción que no posee la libertad de movimiento, aun cuando interactúa únicamente con otras moléculas de agua. Y, por último, el agua ligada es aquella que interactúa con todo tipo de moléculas presentes en los alimentos, pero no participa en reacciones químicas ni puede ser utilizada por solutos próximos como disolvente. Este tipo de agua no puede ser fácilmente congelada, por lo que requiere temperaturas de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  para asegurar su congelación (Prothon & Ahrne, 2004; Louis & Stewart 2013; Gil *et al.*, 2013).

La determinación del contenido de humedad o contenido total de agua (%  $\text{H}_2\text{O}$ ), es uno de los análisis con mayor importancia a nivel de la industria alimentaria. Dicho análisis se clasifica como un método directo debido a que implica la determinación de la mayor cantidad de agua presente en los alimentos. Es decir, la cuantificación de las tres fracciones

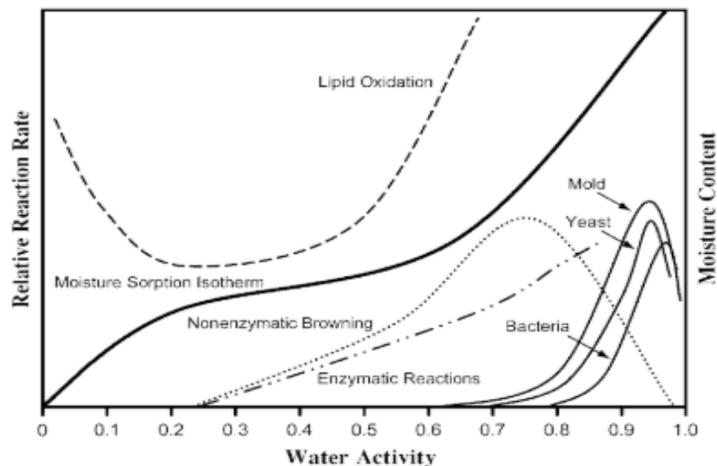
de agua explicada anteriormente a través del modelo de monocapa BET (agua libre, inmovilizada y gran parte del agua ligada) (Barbosa *et al.*, 2008).

La metodología que se emplea para determinar el contenido de humedad consiste en evaporar de manera continua el agua de la muestra mientras se registra la pérdida de masa hasta alcanzar un peso constante. Dicho método posee la desventaja de que la pérdida de masa en la muestra puede deberse tanto a la fracción de agua evaporada como a la pérdida de compuestos volátiles capaces de evaporarse a las mismas temperaturas del análisis. Además, no puede utilizarse como parámetro único para estimar la vida útil de un alimento debido a que su resultado no corresponde únicamente a la medición del agua libre en el alimento (Timmermann *et al.*, 2001).

Ahora bien, la determinación del agua libre en los alimentos es trascendental debido a que, como se mencionó anteriormente, es en esa fracción en donde se dan muchas de las reacciones de deterioro del alimento, tanto físicas como químicas, motivo por el cual representa un ambiente potencialmente idóneo para el crecimiento de microorganismos de deterioro y patógenos. Su cuantificación en alimentos se efectúa por medio de la medición de la actividad del agua o  $a_w$  (Geertui. *et al.*, 2016).

El  $a_w$  o actividad del agua, se define como la relación entre la variación de las presiones parciales y el vapor de agua, y determina específicamente el valor de agua disponible para las reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas en un alimento. Dicha disponibilidad del agua puede verse disminuida según contenido de solutos y sustancias en suspensión presentes en el alimento, debido a factores como la concentración, estructura molecular, polaridad y tamaño (Rodríguez, 2008).

En la figura 4 se puede notar que, según el valor o rango del  $a_w$ , así será la susceptibilidad del alimento a cada tipo de reacción.



**Figura 4.** Efecto del contenido de humedad y actividad del agua en la propensión de reacciones de deterioro en alimentos (Gil *et al.*, 2013).

A partir de la figura 4 se puede observar que el conocimiento del  $a_w$  de un producto alimenticio es vital para estimar su vida útil y controlar su conservación, ya que al aumentar el valor del  $a_w$ , menor será su vida útil. Asimismo, si se aumenta el contenido de humedad total (%  $H_2O$ ) también aumenta el  $a_w$  y, por ende, menor será la estabilidad del alimento (Geertui. *et al.*, 2016).

### 3.10.2 Métodos Microbiológicos

A pesar de los estrictos controles exigidos en la industria de alimentos, se ha observado que anualmente se continúa reportando una alta cantidad de personas que se enferman a causa del consumo de agua o alimentos contaminados. En el 2017, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), reportó un total de 48 millones de personas enfermas a nivel mundial, de las cuales 128 mil fueron hospitalizadas y 3000 murieron a causa de enfermedades transmitidas por alimentos (CDC, 2017).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son una causa de morbilidad y mortalidad significativa a nivel mundial, lo cual a su vez constituye en un impedimento en el desarrollo socioeconómico de las poblaciones. Es por ello que la utilización de métodos microbiológicos para determinar la presencia de bacterias en los alimentos es

imprescindible para poder brindar alimentos de alta calidad que no representen un peligro para la salud del consumidor final (OMS, 2015).

A continuación, se detalla brevemente algunos microorganismos que pueden estar presentes en alimentos de origen vegetal como la broza de café deshidratada, así como también los análisis requeridos para su cuantificación.

### **3.10.2.1 *Salmonella* sp.**

El género *Salmonella* sp., es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Posee dos especies de *Salmonella* entérica (con 6 subespecies) y *Salmonella bongori*. Se le cataloga como un patógeno intracelular anaerobio facultativo y no esporulado que tiene la capacidad de multiplicarse bajo diversas condiciones ambientales, algunas de las cuales son: amplios rangos de temperatura (5- 47 °C), pH (4-9), concentración de NaCl (0,4-4%) y actividad acuosa (0,94-0,99) (Podolak & Black, 2016).

*Salmonella* sp. está presente en el intestino de personas y animales sanos. Su transmisión a los alimentos y al agua se genera principalmente por contaminación con heces, y puede provocar una infección gastrointestinal denominada Salmonelosis. Dicha enfermedad representa uno de los principales problemas en salud pública, con alrededor de 1,2 millones de casos reportados (CDC, 2019).

El análisis de *Salmonella* sp., en la industria alimentaria es indispensable como indicador de la inocuidad de los alimentos. Para ello se utiliza una técnica microbiológica que expresa cualitativamente su presencia o ausencia en diferentes matrices, y posteriormente se efectúa una caracterización de las colonias mediante pruebas fisicoquímicas y serológicas. Esta última etapa se efectúa debido a que existen alrededor de 2500 serotipos identificados, siendo *Salmonella enterica serovar typhimurium*, *Enteritidis* y *Newport* los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial (Pedraza *et al.*, 2014).

### **3.10.2.2 Coliformes totales y fecales**

La medición de coliformes totales y fecales se utiliza como indicador de la calidad microbiológica de los alimentos y del agua. Los coliformes pertenecen a la familia de las

*Enterobacteriaceae*, y se encuentran presentes en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, pero también se pueden distribuir fácilmente en el suelo, semillas y vegetales (Hayes, 2013).

Los coliformes totales (incluyen los coliformes fecales y los de origen ambiental) se caracterizan por ser bacilos gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos y con capacidad de fermentar la lactosa a  $35 \pm 2$  °C. Por su parte, los coliformes fecales son aquellos fermentan la lactosa a  $44,5 \pm 2$  °C, siendo *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* los géneros más representativos. Los resultados positivos para coliformes fecales se asocian con mayor probabilidad (aprox. 90%) de presencia de *Escherichia coli*. Es por esto que dicho microorganismo se emplea como indicador de contaminación fecal en los alimentos (Erkmen & Bozoglu, 2016; Tobón *et al.*, 2017).

*E. coli* es un microorganismo que se encuentra en los intestinos de todos los animales, por lo que una de sus funciones es evitar que especies de bacterias perjudiciales se fijen y se desarrollen en la zona. No obstante, existen cuatro clases capaces de causar enfermedades (gastroenteritis) en el ser humano, las cuales son reconocidas como *E. coli* enteropatógena (grupo EEC). Dentro de dicho grupo destaca la cepa enterohemorrágica denominada *E coli* O157:H7. Las fuentes de contaminación de los alimentos debido a cepas patogénicas se asocian con colaboradores, agua o animales contaminadas con materia fecal, y utilizados durante el procesamiento de alimentos (Farfán *et al.*, 2016).

### **3.10.2.3 Mohos y Levaduras**

Los hongos son organismos multicelulares del reino Fungi que pueden vivir en plantas y animales. Se les denomina mohos a las variedades filamentosas, las cuales tienen la capacidad de adaptarse y proliferar bajo diversas condiciones ambientales, como por ejemplo amplio rango de acidez, temperatura cálidas (20-30 °C) y de refrigeración, baja actividad del agua, entre otros (Ravishankar & Jamuna, 2014).

La mayor importancia de los mohos en la industria de los alimentos se asocia con el deterioro que causan, en donde destaca *Aspergillus* sp. como el género más común. Asimismo, existen algunos mohos capaces de producir toxinas, y otros que por el contrario

se emplean para mejorar las características sensoriales de ciertos alimentos, como por ejemplo *Penicillium roqueforti* durante la producción de quesos (Corry *et al.*, 2011).

Las levaduras son hongos unicelulares que al igual que los mohos se pueden distribuir ampliamente en la naturaleza (agua, aire, suelo, plantas, entre otros) por lo que pueden causar importantes pérdidas económicas debido al deterioro de alimentos. No obstante, las levaduras también poseen importantes aplicaciones en la industria de alimentos, dentro de los cuales destaca su uso para la producción de alimentos fermentados como por ejemplo cerveza, pan, otros (Bibek & Arun, 2013).

### **3.10.3 Métodos Sensoriales**

El análisis sensorial de los alimentos se ha establecido como una técnica de medición trascendental para la industria alimentaria. La percepción sensorial que los seres humanos poseen de los alimentos se encuentra estrechamente relacionada con su aceptación y patrones de compra y/o consumo (Kilcast, 2010).

La evaluación sensorial se efectúa a través de diferentes pruebas que se seleccionan con base en la información que se desea recopilar. La forma más general de clasificar dichas pruebas abarca tres categorías: pruebas afectivas, pruebas discriminativas y pruebas descriptivas. En el caso específico de las pruebas de discriminación (diferenciación), su objetivo primordial se centra en determinar si dos muestras con atributos difíciles de distinguir son lo suficientemente diferentes para ser catalogadas como tales. Motivo por el cual, dichas pruebas representan herramientas eficaces para evaluar la percepción que los consumidores poseen con respecto a los alimentos (Ibañez & Barcina 2001).

La eficacia de las pruebas de discriminación se basa en la implementación de métodos que sean capaces de ejercer una estabilidad consciente de los posibles criterios a presentarse en el panelista (persona que evalúa las muestras), y por ende, permitan reducir la presencia de la respuesta sesgada. Entiéndase respuesta sesgada como aquella que depende de las variaciones en el criterio del panelista, por lo que puede generar la recolección de datos erróneos (Morten *et al.*, 2008; O'Mahony, 1995).

Actualmente en las pruebas de discriminación se utilizan procedimientos que permiten eliminar la respuesta sesgada por medio de la estabilización del criterio del analista. Dichos procedimientos se denominan criterios con base en una respuesta forzada. Su fundamento se basa en el criterio  $\beta$  y el criterio  $\tau$ . El primero,  $\beta$ , establece un límite entre dos categorías de interés (previamente definido), mientras que  $\tau$  se basa en la determinación de distancias entre dos categorías distintas (Lawless & Heyman, 2010).

Los procedimientos de escogencia forzada que involucran las pruebas de diferenciación se categorizan de la siguiente manera: Triangular, Dúo-trío, Tétrada, 3-Escogencia Forzada Alternativa (3-AFC), 2- Escogencia Forzada Alternativa (2-AFC o comparación pareada) y 2-AFC con iniciador. En el caso específico de la prueba 2-AFC con iniciador, se utiliza el criterio  $\beta$  para la selección de una muestra con base en el estímulo de interés. Para ello se indica el atributo a comparar entre dos muestras a analizar. Adicionalmente, se emplea una muestra que tiene la función de ser un iniciador, es decir, que permite ambientar la cavidad oral del panelista mediante un enjuague, pero que no será analizada (Lawless & Heyman, 2010; Olivas, 2008).

Ahora bien, el análisis de resultados de las pruebas de diferenciación implica el uso de una distribución binomial y el modelo Thurstoniano. En el caso específico de la distribución binomial, logra detectar, mediante la probabilidad de aciertos, si el resultado obtenido se debió al azar o si los panelistas realmente percibieron diferencias entre las muestras. Mientras que con el modelo Thurstoniano (metodología sensorial más avanzada), se indica el grado o magnitud de la diferencia percibida entre dos estímulos confundibles de interés por medio del cálculo del parámetro  $d'$  ( $d'$  prima). La medición de dicho valor,  $d'$ , se efectúa a través de desviaciones estándar con el objetivo de determinar que tan bien los evaluadores (panelistas) logran diferenciar entre dos estímulos de interés. Por lo que un aumento en el valor  $d'$  indica que mayor es la diferencia percibida (Roesslet *et al.*, 1978; Lawless & Heyman, 2010).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO**

Los análisis fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos se llevaron a cabo en los laboratorios de la Escuela de Tecnología de Alimentos, y en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica.

Adicionalmente, se utilizaron las instalaciones del Centro de Investigación y Semillas de la Universidad de Costa Rica (sede de San Pedro) para el almacenamiento de las muestras y un almacén en la provincia de Alajuela.

### **4.2 MATERIA PRIMA**

#### **4.2.1 Origen de la materia prima**

En el presente trabajo de investigación se evaluó la broza de café deshidratada de la especie *Coffea Arabica* la cual correspondió a producto terminado proveniente de tres recolecciones de café durante los meses de enero a febrero del año 2018. La recolección se efectuó en tres fechas distintas debido a que se buscaba captar las variaciones presentes en la coloración del fruto del café fresco asociadas al grado de madurez y exposición al sol. Se utilizaron tres recolecciones de broza, en donde cada fecha de recolección se consideró como un lote. Es decir, se analizaron tres lotes de broza de café deshidratada.

#### **4.2.2 Método de recolección de la muestra**

Para cada fecha de recolección de la muestra (lote) se tomó un total de 16,5 kg de broza deshidratada recién procesada, la cual fue cuarteada (cada día de manera independiente), y posteriormente empacada aleatoriamente en los tres empaques flexibles por analizar durante el mes cero y durante los siguientes diez meses de almacenamiento bajo dos sistemas de temperaturas.

La cantidad de broza de café deshidratada que se colocó en cada empaque flexible fue de 500 g, para cada fecha de almacenamiento, es decir, 33 bolsas para los tres lotes en estudio.

## **4.3 METODOLOGÍA**

### **4.3.1 Selección y evaluación de empaques flexibles**

El primer objetivo de la presente investigación consistió en seleccionar y analizar cinco empaques flexibles de venta en el mercado costarricense, y posteriormente escoger los tres empaques que presentaron las mejores condiciones de desempeño según propiedades físicas y mecánicas. Estos empaques fueron utilizados para la ejecución del segundo objetivo de la presente investigación (sección 4.3.2), el cual consistió en la evaluación de condiciones de temperatura de almacenamiento controladas y condiciones reales (actuales) de un almacén.

#### **4.3.1.1 Criterios de búsqueda y selección de empaques en el mercado costarricense**

Para los criterios de búsqueda y selección de los empaques por analizar durante el primer objetivo del estudio, se tomó en consideración la presencia de todos o la mayoría de los factores que se nombran a continuación: información teórica reportada en estudios previos de empaque y almacenamiento, material de empaque, dimensiones, disponibilidad de venta en pequeñas cantidades (con fines de la ejecución del estudio), costo económico de compra y/o producción (cantidad de unidades mínimas y precio por unidad), presencia de fichas técnicas (anexos 9.1 – 9.2) con las correspondientes características teóricas brindada por los proveedores, protección contra la luz, facilidad en el sellado y baja permeabilidad al vapor de agua. Este último requisito se consideró como un indicador determinante de la capacidad de cada empaque para conservar o reducir la degradación de las propiedades de interés (propiedades fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas) en la broza de café deshidratada a través del almacenamiento.

#### **4.3.1.2 Empaques seleccionados para la evaluación y comparación de sus propiedades físicas y mecánicas**

A continuación, se muestran las cuatro empresas costarricenses proveedoras de los cinco empaques flexibles seleccionados con base en los criterios expuestos en la sección 4.3.1.1:

- EC CR: Proveedor del empaque actual de la empresa que produce la broza en estudio, designado como EE.
- Total Técnica SA: Proveedor del empaque flexible PET Metal.
- Quimifarma CR: Proveedor de los empaques flexibles P-600 y P-800.
- Plástico Tico SA: Proveedor del empaque Kraft Metalizado

#### **4.3.1.3 Diseño Experimental**

Se efectuó un diseño irrestricto aleatorio con un factor que corresponde al tipo de empaque como variable nominal. Los niveles de medición del factor tratamiento fueron los cinco tipos de empaque analizados.

Las variables respuesta de interés fueron: producción del sello, velocidad de transferencia de vapor de agua (VTVA) y coeficiente de permeabilidad (P). Para todas las variables respuesta y niveles de medición se efectuaron un total de tres réplicas.

##### **4.3.1.3.1 Métodos de análisis de laboratorio para medir las variables respuesta**

Las metodologías que a continuación se detallan forman parte de los métodos propuestos por Jiménez *et al.* (2017) para la evaluación de empaques flexibles. Para cada prueba se efectuaron tres repeticiones por cada tipo de empaque.

##### **I. Sellabilidad**

La producción del sello se efectuó por medio de la medición del tiempo en segundos con cronómetro, selección de la temperatura en grados Celsius (para la selladora de superficie caliente) y la intensidad del impulso eléctrico (1-5) requerido para la obtención del sellado correcto de cada tipo de empaque. Para ello se utilizó una selladora de superficie caliente con mordazas grafiladas accionada mediante pedal mecánico (marca Double Leopard, modelo CHA-300) y una selladora manual de impulso eléctrico tipo cizalla (marca Thor, modelo PFS200).

El control del sello como prueba cualitativa se realizó con el fin de evaluar la producción del sello en los diferentes empaques flexibles por medio de la presencia o no de

fugas. El procedimiento consistió en la colocación de 15 gramos de producto (snack deshidratado de venta a nivel costarricense) en las respectivas bolsas flexibles. Dichas bolsas se procedieron a sellar con base en los parámetros de tiempo y temperatura previamente determinados mediante el método de producción del sello. Seguidamente, se sumergieron los empaques en una cápsula conectado al vacío, el cual contenía en su interior un litro de agua. Dicha modificación con agua se efectuó para obtener condiciones de atmósfera controlada, mientras que la conexión al vacío se realizó con el objetivo de evidenciar la presencia de fugas cuando el empaque sellado se encontraba sumergido en agua.

La presencia de fugas fue evidenciada por medio de burbujas en el agua, debido a la salida de aire dentro del empaque, y se consideró como un sellado ineficiente, por lo que los parámetros previamente utilizados se debían de redefinir (mayor tiempo y/o temperatura), para posteriormente repetir la prueba de control del sello. Es importante destacar que la producción del sello se consideró como un resultado para el análisis de los materiales de empaque debido a que la obtención de tiempos cortos durante la creación del sello permite agilizar las líneas de producción de alimentos a nivel industrial.

## II. Velocidad de transferencia de vapor de agua (VTVA)

Se utilizaron seis frascos específicos (recipientes redondos con tornillos ajustables) para la determinación del VTVA por cada material de empaque analizado. A cada material de empaque se le midió el grosor en micrómetros, por medio de la utilización del micrómetro Ogawa Seiki (capacidad de 0-25 mm y 0,01 mm). Posteriormente, se procedió a hacer mediciones de masa en balanza granataria marca Ohaus de cada frasco vacío, cada frasco con 20 gramos de desecante (silica gel), y cada frasco con desecante más una lámina fija de cada material de empaque en la parte superior (una lámina por frasco).

Seguidamente, se colocaron los frascos en dos desecadores que contenían un litro de agua cada uno, de manera que al cerrarlo se generó un vacío parcial (3 frascos por desecador). Posteriormente se procedió a incubar dichas desecadoras a 23 ° C y 35 ° C (una desecadora por cada temperatura) durante 144 horas. Es decir, cada lámina de empaque fue evaluada a 23 °C y 35 °C.

Durante el transcurso de las 144 horas se realizaron mediciones de masa a los tiempos de 24, 48, 72 y 144 horas con el objetivo de registrar las variaciones en el peso y evidenciar el tiempo que tarda el material de empaque en llegar al equilibrio y, por ende, dejar de generar variaciones de masa a través del tiempo (Farmer, 2013).

Por cada temperatura analizada, se determinó de manera independiente la velocidad de transmisión de vapor del agua (VTVA) a través de un metro cuadrado de material de empaque en un periodo de 24 horas. Es decir, se reportó la variación de la masa en función del tiempo y la temperatura para cada tipo de empaque. Su determinación se logró mediante la aplicación de la siguiente fórmula matemática:

$$VTVA \text{ (kg/m}^2\text{-h)} = \frac{24*m}{t*A} \quad [1]$$

Dónde:

m: ganancia o pérdida de masa (kg).

t: tiempo (h).

A: área del material de empaque (m<sup>2</sup>)

La temperatura de análisis de 35 °C se logró mediante el uso de la cámara de incubación del laboratorio de Microbiología de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica. El análisis de temperatura a 23 °C se realizó en el Laboratorio de Química de la misma escuela. De igual manera, se debe aclarar que las mediciones de VTVA no se realizaron de manera simultánea para los cinco empaques en estudio, debido a que no se contaba con la cantidad de frascos (cilíndricos con tornillos) para llevar a cabo el análisis de manera simultánea por triplicado. No obstante, sí se hicieron las corridas simultáneas por temperatura para cada tipo de empaque.

### III. Coefficiente de permeabilidad del vapor de agua (P)

El coeficiente de permeabilidad de vapor del agua de cada material de empaque a las temperaturas analizadas (35 °C y 23 °C), se obtuvo utilizando los datos experimentales

de la prueba de VTVA. Su determinación se logró mediante la aplicación de la siguiente fórmula matemática:

$$P \text{ (g}\cdot\text{m/m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa)} = \frac{V*G}{A*T*\Delta P} \quad [2]$$

Dónde:

*P*: Coeficiente de permeabilidad

*V*: cantidad de vapor (g)

*G*: grosor de empaque (m)

*A*: Área (m<sup>2</sup>)

*T*: Tiempo (s)

$\Delta p$ : Diferencia de presión a través de la película (Pa)

Para las diferencias de presión a través del material, se consideró que la presión a través del material de empaque es igual a la presión del vapor saturado a la temperatura ambiente. Es decir, se asumió que el desecante dentro del recipiente cilíndrico con tornillos generó un ambiente con vapor de agua de 0 kPa.

Por último, se aclara que la utilización de 35 °C y 23 °C como temperaturas para el análisis se seleccionó con base en que un cambio brusco en la temperatura permite que se generen alteraciones en el empaque debido a cambios en la estructura y acomodo de los polímeros. Es por este motivo que se analizaron los valores de VTVA y coeficientes de permeabilidad a 35 °C y 23 °C como variables respuesta independientes, ya que al considerar la posible presencia de cambios bruscos de temperatura, se logra determinar de manera directa la influencia que se genera sobre el coeficiente de permeabilidad (Farmer, 2013; Lawngoski, 2017).

#### **4.3.1.3.2 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó por medio del programa estadístico JMP 10.0. Se efectuó un análisis de variancia (ANDEVA) con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ), para determinar si alguno de los materiales de empaque generó diferencias

significativas. En caso de presentarse diferencias significativas, se aplicó una prueba Tukey-Kramer HSD ( $\alpha = 0,05$ ) para determinar cuál(es) tratamiento(s) generaron las diferencias. Por último, se utilizó la prueba HSu ( $\alpha = 0,05$ ) con el objetivo de comparar los mejores tratamientos (tipo de empaque) en función de los valores más bajos de las variables respuesta de interés (menor permeabilidad y VTVA) y, por lo tanto, seleccionar los mejores empaques para el posterior estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada.

#### **4.3.2 Evaluación de la variación en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la broza de café deshidratada expuesta a diferentes condiciones de almacenamiento.**

El presente enunciado corresponde al segundo objetivo de la investigación. La broza de café deshidratada que se analizó como unidad experimental, fue empacada en tres diferentes estructuras de empaque. Dichas estructuras correspondieron a los tres empaques previamente seleccionados por medio de la realización del primer objetivo descrito en la sección 4.3.1.

##### **4.3.2.1 Condiciones de almacenamiento de la broza de café deshidratada**

Las muestras de broza de café deshidratada, previamente empacadas en las correspondientes bolsas flexibles, fueron almacenadas en la zona del almacén real y en la cámara marca Growth Chamber modelo HOTech624 del Centro para Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica.

El almacenamiento se efectuó mediante simulación de las condiciones reales (actuales) de una empresa y condiciones controladas. Ambas condiciones correspondieron a dos sistemas de temperaturas que permitieron recrear las etapas del almacén en Costa Rica, transporte vía marítima y comercialización en el extranjero. Para ello, se tomó como parámetro de temperaturas los siguientes datos:

- Temperatura máxima registrada en la zona del almacén: Variaciones que van desde los 22,2 a 35,0 °C como temperatura máxima registrada mediante termopar en la zona (Pérez, 2017).

- Temperatura mejorada (controlada) para la zona del almacén: 25 °C como temperatura reportada para reducir la degradación de compuestos antioxidantes (Martínez *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2016).
- Temperatura máxima reportada durante el transporte vía marítima a Canadá: 45 °C asumiendo las condiciones más críticas según ubicación del contenedor en el embarque. Es decir, que el contenedor que transporta el producto sea ubicado en la parte superior del embarque (Pérez, 2017).
- Temperatura durante el proceso de comercialización en el extranjero: 21 °C asumiendo que llega en una época que no sea verano y que el almacén tiene control de temperatura (Pérez, 2017).

Los sistemas de temperatura para las dos condiciones de almacenamiento por analizar (real y controlado) se definieron con base en los criterios previamente mencionados, en conjunto con la disponibilidad de cámaras de almacenamiento con la capacidad para la colocación de la cantidad de broza empacada requerida para el análisis durante 10 meses de estudio. Esto último fue un factor determinante debido a que el tamaño de cada empaque y la cantidad total implicó la utilización de una cámara completa destinada únicamente para el desarrollo de la investigación. Motivo por el cual no se utilizaron las temperaturas previamente mencionadas, pero sí las más cercanas a ellas según disponibilidad de espacio en cámaras.

A continuación se detalla el sistema de temperaturas utilizado según la condición de almacenamiento de la broza de café deshidratada para los 10 meses de estudio y en el anexo 10.3 se muestra el comportamiento obtenido de las mediciones de temperatura y humedad relativa para las dos condiciones de almacenamiento:

a) Condición de almacenamiento real (actual) de la empresa

- Mes cero a mes seis: Se mantuvo la broza de café deshidratada y empacada en la zona del almacén real durante seis meses consecutivos, expuesta a temperaturas que fluctuaron entre 22-35 °C según las condiciones climáticas de la zona.

- Mes siete: Se mantuvo la broza de café deshidratada y empacada durante un mes a 35 °C (tiempo equivalente a la duración del transporte marítimo en barco) en la cámara del CIGRAS en la Universidad de Costa Rica, San Pedro.
- Mes ocho al mes diez: Se mantuvo la broza de café deshidratada y empacada durante tres meses consecutivos (tiempo aproximado que tarda el producto en ser consumido por el usuario final) a 21 °C en la cámara del CIGRAS en la Universidad de Costa Rica, San Pedro.

b) Condición de almacenamiento controlada

- Mes cero a mes seis: Se mantuvo la broza de café deshidratada y empacada en la a 25 °C durante seis meses consecutivos en la cámara del CIGRAS en la Universidad de Costa Rica, San Pedro.
- Mes siete: Se mantuvo la broza de café deshidratada y empacada durante un mes a 35 °C (tiempo equivalente a la duración del transporte marítimo en barco) en la cámara del CIGRAS en la Universidad de Costa Rica.
- Mes ocho al mes diez: Se mantuvo la broza de café deshidratada y empacada durante tres meses consecutivos (tiempo aproximado que tarde el producto en ser consumido por el usuario final) a 21 °C en la cámara del CIGRAS en la Universidad de Costa Rica, San Pedro.

Es importante aclarar que las temperaturas y tiempo equivalente al transporte marítimo (un mes a 35 °C) y el almacenamiento en el extranjero (tres meses a 21 °C), no fueron modificadas en las dos condiciones o sistemas de temperaturas. Esto debido a que es una variable que no se puede controlar o mejorar, ya que implicaría aumento en el costo económico asociado con la exportación de la broza de café deshidratada para enviarla refrigerada o interferir con el importador en Estados Unidos. En el cuadro III, se muestran los sistemas de temperatura utilizados.

**Cuadro III.** Distribuciones de las condiciones reales (actuales) y controladas según tiempo y etapa de almacenamiento para el análisis de conservación de las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas en la broza de café deshidratada.

Etapa de almacenamiento	Cantidad de Meses	Condiciones Reales (Actuales)		Condiciones Controladas	
		Temperatura (°C)	Zona de almacenamiento muestras	Temperatura (°C)	Zona de almacenamiento muestras
Almacén en Costa Rica	6	22-35	Almacén	25	Cámara CIGRAS, San Pedro
Transporte marítimo a Canadá o Estados Unidos	1	35	Cámara CIGRAS, San Pedro	35	Cámara CIGRAS, San Pedro
Comercialización en el extranjero y etapa de consumo	3	21	Cámara CIGRAS, San Pedro	21	Cámara CIGRAS, San Pedro

#### 4.3.2.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial de tres factores (tipo de empaque, sistema de temperaturas y tiempo de almacenamiento), con niveles de medición 3x2x11. Los bloques correspondieron a los tres lotes (fechas) de recolección de muestra, mientras que el factor tipo de empaque fue una variable nominal que tuvo tres niveles de medición correspondientes a los tres tipos de empaques a analizados. El factor sistema de temperatura, como variable nominal, tuvo dos niveles de medición que correspondieron a las condiciones reales o actuales y controladas (contemplan el almacenamiento, transporte y comercialización). El factor tiempo como variable continua tuvo 11 niveles de medición debido a que los análisis de interés se efectuaron una vez al mes desde el tiempo cero hasta los 10 meses de almacenamiento.

Durante todos los meses de almacenamiento se impidió el paso de la luz a través de todos los empaques al mantenerse cubiertos con sacos de café (yute). Además, se efectuaron mediciones periódicas de humedad relativa y temperatura, en las cámaras y el almacén, con termohigrómetro marca EXTECH modelo SDL200. Durante los primeros siete meses de almacenamiento, se registró la humedad relativa con el fin de corroborar que las condiciones reales (zona de almacén) y controladas (zona de almacén en cámara del

CIGRAS) mantuvieron diferencias de humedad relativa poco representativas (esto fue un factor controlado, ver anexo 9.3).

A continuación, por medio del cuadro IV, se muestra la distribución de las condiciones de almacenamiento evaluado según el diseño experimental previamente planteado.

**Cuadro IV.** Distribución de las condiciones de almacenamiento según empaque, diferentes fechas de recolección de muestras (bloques), etapa y tiempo para el análisis de conservación de las propiedades en la broza de café deshidratada.

Diferentes fecha de recolección de muestra	Etapa	Cantidad de Meses	Temperatura de almacenamiento (°C)					
			Condiciones Reales			Condiciones Controladas		
			E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
Bloque 1 Bloque 2 Bloque 3	Almacén en Costa Rica	7	22-35 °C			25C		
	Transporte marítimo a Canadá o Estados Unidos	1	45 °C			45 °C		
	Comercialización en el extranjero	2	22 °C			22 °C		

Nota: La letra “E” hace referencia a la palabra empaque.

Ahora bien, las variables respuestas medidas fueron las siguientes: contenido de cianidina 3-o-rutinosido, contenido de ácido clorogénico, contenido de humedad, actividad del agua ( $a_w$ ) y color instrumental, como propiedades fisicoquímicas.

Adicionalmente, el diseño experimental para las pruebas sensoriales fue irrestricto aleatorio con dos factores, condición de empaque y almacenamiento, con 2 niveles: cada mes de almacenamiento vs el mes cero (almacenado a -40 °C) y el tiempo de almacenamiento con 4 niveles (mes 2, 4, 6 y 8). Se analizó el color y sabor mediante paneles sensoriales con pruebas de discriminación, para determinar si había diferencia de color y sabor a lo largo del tiempo, según condiciones de almacenamiento. Las muestras en el último mes no se evaluaron sensorialmente ya que su color había cambiado mucho.

Es importante aclarar que, previo a la realización de los paneles sensoriales, se efectuó la determinación de *Salmonella* sp. en la broza de café deshidratada, con el fin de

garantizar que el producto era microbiológicamente inocuo y, por ende, salvaguardar la salud de las personas muestreadas a través de los paneles sensoriales (sección 4.3.3).

Adicionalmente, se debe tomar en consideración que la broza deshidratada con la cual se trabajó en los paneles sensoriales formó parte de trabajos de investigaciones previos de la Universidad de Costa Rica que permitieron desarrollar el producto en condiciones de limpieza y desinfección en función de garantizar su inocuidad y la mayor conservación de la actividad antioxidante asociada a los compuestos fenólicos presentes (Rivera, 2015).

#### **4.3.2.2.1 Métodos de análisis de laboratorio para medir las variables respuesta**

##### **A) Análisis Fisicoquímicos**

###### **I. Extracción de polifenoles**

Se efectuó la extracción de polifenoles por duplicado como método para la obtención del extracto acuoso requerido para la determinación de la concentración de cianidina 3-o-rutinosido y ácido clorogénico por HPLC. La metodología utilizada corresponde con el análisis del CITA suscrito bajo la codificación P-S-A-Q-017 (CITAa, 2015), el cual se detalla a continuación:

La muestra de broza de café deshidratada se molió en licuadora marca Oster, y seguidamente se pesó una cantidad de 1,0000 g de dicha muestra molida en balanza analítica OHAUS. Posteriormente se le adicionó a la muestra recién pesada 15 mL de acetona y agua (70:30) y se agitó de forma seriada en equipo especializado (10 minutos en plantilla para agitación, 10 minutos en baño ultrasónico y 10 minutos en plantilla para agitación). Finalizado el proceso de agitación, se dejó reposar la muestra por 5 minutos, y posteriormente se decantó con papel filtro Whatman #41 en balón para rotavapor múltiple marca Buchi. En dicho rotavapor se concentró la muestra por medio de la eliminación de la acetona a 40 °C y 150 mbar. Una vez obtenido el líquido concentrado, se trasvasó cuantitativamente a un balón aforado de 25 mL mediante el uso de jeringa desechable #10 y un filtro de 0,45 µm acoplado en el extremo de la jeringa. El balón se aforó con agua grado HPLC y posteriormente se trasvasó 15 µL a viales de HPLC.

Todo el proceso anteriormente mencionado se efectuó en un cuarto oscuro para evitar el proceso de degradación de los compuestos fenólicos por presencia de luz.

## II. Determinación de cianidina 3-o-rutinósido y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La metodología utilizada para la determinación de polifenoles por HPLC, corresponde con el análisis del CITA suscrito con el código P-SA-Q-044 (CITAb, 2016). El análisis se realizó por duplicado para cada extracto preparado mediante el método de extracción de polifenoles previamente mencionado. Adicionalmente se efectuaron dos curvas de calibración, cada una con el patrón de referencia o compuesto puro que se buscaba cuantificar en la broza café deshidratada.

El contenido del compuesto de interés (cinidina 3-o-rutinósido o ácido clorogénico) en la muestra de broza de café deshidratada se expresó en miligramos por gramo de muestra seca. El resultado se obtuvo con la fórmula que se muestra a continuación, la cual implica el uso de las ecuaciones de la recta obtenidas a partir de las curvas de calibración.

$$\text{mg cianidina-3-rutinosido / g muestra} = \frac{(\text{área} - \frac{b}{Cn}(\frac{mg}{L})) * Fd * V (L)}{\text{masa muestra (g)}} \quad [3]$$

Dónde:

Fd = factor de dilución aplicado a la muestra antes de inyectar

V = volumen del extracto en litros (L)

Cn = concentración

b = intercepto de la curva de calibración

Ahora bien, los detalles del equipo, reactivos y condiciones utilizados para la cuantificación de los compuestos se muestran a continuación:

*Equipo de cromatografía líquida de alta resolución compuesto por*

- Horno para columna cromatografía Shimadzu CTO-20A.
- Inyector de muestras automático SIL-20A HT, controlado por el módulo CBM-20A.

- Bomba de dos pistones Shimadzu LC-20AT
- Integrador de áreas Shimadzu LC-Solutions.

*Condiciones en el equipo para las mediciones cromatografías*

- Columna cromatográfica: Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 100 A, tamaño 150 mm x 2,0 mm y número de serie 545197-2.
- Lámpara: D2&W
- Temperatura del horno: 30 °C
- Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$
- Flujo: 0,30 mL/min
- Tiempo de proceso: 37 minutos
- Longitud de onda de trabajo: 512 nm y 327 nm para la detección de cianidina 3-o-rutinósido y ácido clorogénico respectivamente.
- Fases móviles: Solución de ácido fórmico al 2% (solución A) y solución de acetonitrilo al 80% y ácido fórmico al 2% (solución B).

*Curva de calibración para los patrones de referencia*

Los reactivos utilizados como patrones de referencia (estándares analíticos) y las correspondientes concentraciones para las curvas de calibración fueron los siguientes:

1. Keracyanin clorhídrico (nombre comercial para cianidina 3-o-rutinosido): Porcentaje de pureza de  $\geq 98\%$  reportado en la etiqueta por la empresa proveedora Millipore Sigma, la cual comercializa el reactivo con el código #36428-5MG-F.  
La curva de calibración se preparó a partir de concentraciones de disolución patrón de 200,100, 80, 60,40, 20 y 10 mg/L.
2. Ácido clorogénico: Porcentaje de pureza de  $\geq 95\%$  reportados en la etiqueta por la empresa proveedora Sigma Aldrich, la cual comercializa el reactivo con el código C3887-1G. La curva de calibración se preparó a partir de concentraciones de disolución patrón de 200,150, 100, 80, 60, 40, 20 y 10 mg/L.

*Corrección del corrimiento de la señal para la identificación de los compuestos mediante HPLC:*

Debido a que en cada muestra de broza analizada se obtuvieron varias señales o picos para una misma longitud de onda, se procedió a analizar una muestra de broza enriquecida con 10 µL patrón de referencia (spike) y una muestra sin enriquecimiento (sin spike). El enriquecimiento permitió determinar cuál señal o pico se vio aumentado (con mayor intensidad en la señal) en la muestra. Es decir, indicó la señal y el respectivo tiempo de retención que debe ser utilizado para determinar la concentración de cada compuesto en las muestras de interés por medio del uso de la curva de calibración.

II. Determinación del modelo de la cinético de degradación de cianidina 3-o-rutinósido y ácido clorogénico

Se determinaron los órdenes de reacción y las constantes de velocidad de degradación del ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido a partir de los datos experimentales de la concentración versus tiempo para una misma temperatura de almacenamiento.

Para la reacción de primer orden se empleó un análisis de regresión lineal simple de la representación gráfica del logaritmo natural de la concentración en función del tiempo de almacenamiento en días para cada temperatura de almacenamiento. Mientras que para el modelo de orden cero, se efectuó el mismo procedimiento, pero con la concentración en función del tiempo de almacenamiento en días. En ambos casos se relacionó la pendiente de la recta con la constante de degradación (k) y ésta, con el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) que indica la estabilidad del compuesto a través del tiempo. Para ello se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$[C_n] = [C_{n_0}] \cdot e^{-k \cdot t} \quad [4]$$

$$\ln[C_n] = \ln[C_{n_0}] - k \cdot t \quad [5]$$

$$t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad [6]$$

Dónde:

[C<sub>n</sub>]= Concentración del compuesto (mg/g muestra) al tiempo t.

[C<sub>n0</sub>]= Concentración del compuesto al inicio del almacenamiento.

t= tiempo en días.

k= constante de velocidad de degradación (días<sup>-1</sup>)

Posteriormente, con el objetivo de determinar el modelo que mejor describe la degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido a través del tiempo, se emplearon como indicadores estadísticos el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el cuadrado medio del error (CME) y un análisis de variancia simple con un nivel de significancia del 0,05, por medio del programa estadístico JMP.

### III. Determinación del contenido de humedad

Se utilizó el analizador termogravimétrico (TGA) marca LECO para determinar por triplicado el contenido de humedad asociada a la pérdida de peso según temperatura en la broza de café deshidratada. En el equipo se utilizaron las condiciones asociadas al método suscrito con el nombre *Café H*, el cual implica una temperatura de análisis de humedad de 104 °C y una masa de muestra inicial de 0,500 g.

### IV. Determinación de la actividad del agua ( $a_w$ )

La determinación se llevó a cabo por triplicado en el medidor Aqualab Water Activity Measurement serie 4TE. La metodología seguida fue la P-SA-Q-041 del CITA, la cual se basa en modificaciones al manual del equipo (CITAc, 2015). Previo a cada medición se efectuó la calibración del equipo con agua y estándares de cloruro de litio (LiCl) y cloruro de sodio (NaCl).

### V. Color instrumental

El color instrumental se determinó por triplicado con colorímetro marca Hunter Lab, modelo Color Flex. Los parámetros medidos directamente fueron la luminosidad ( $L^*$ ), coordenada  $a^*$  y coordenada  $b^*$ ; los cuales corresponden a la escala CIELab.

La determinación se efectuó en celdas circulares plásticas con 15,25 g de broza de café deshidratada molida y acomodada uniformemente con el fin de impedir el paso de la luz a través de ella. Se utilizó una fuente de luz D65, ángulo de visión de 10° y un ángulo de incidencia de 45° de la fuente de luz sobre la muestra con fondo blanco (geometría óptica 45/0). Previo a la medición de color, se procedió a calibrar el quipo por medio de una teja de color blanco ( $L^*=93,02$  /  $a^*=-1,12$  /  $b^* = 1,51$ ), negro y verde estándar ( $L^*=53,11$ /  $a^*=-26,13$  /  $b^* = 12,28$ ). Esta última teja color verde, se empleó como método de comprobación de la calibración (Hunter Lab, 2008).

Los resultados de color instrumental se expresaron utilizando la escala CIELCh, ya que permiten obtener mejores aproximaciones con respecto a la percepción de los colores de los seres humanos (Gulrajani, 2010). Los parámetros determinados en dicha escala son la luminosidad ( $L^*$ ), medidas hue o tono ( $h^\circ$ ), saturación o cromaticidad ( $C^*$ ) y diferencia total de color ( $\Delta E$ ). Para ello, se hizo uso de las siguientes expresiones matemáticas:

$$h^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad [7]$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad [8]$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [9]$$

## B) *Análisis Sensoriales*

Se efectuaron pruebas sensoriales de diferenciación para evaluar los cambios en el sabor y color de la broza de café deshidratada almacenada en condiciones reales y controladas. Para ello se procedió a comparar las muestras de brozas con un tiempo de cero meses (respectivas fechas iniciales de recolección de muestras) con respecto a las muestras almacenadas con un tiempo de almacenamiento de 2, 4, 6 y 8 meses.

Es importante aclarar que la broza deshidratada como producto alimenticio fue desarrollada en condiciones de limpieza y desinfección que permiten garantizar su inocuidad (Rivera, 2015). No obstante, previo a la ejecución de los paneles sensoriales se procedió a efectuar pruebas microbiológicas que permitieran asegurar la inocuidad del producto.

Ahora bien, para poder realizar la comparación de los cambios sensoriales a través del almacenamiento, se utilizó una cámara de congelación a -40 °C ubicada en las instalaciones del Centro de Investigaciones de Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. En dicha cámara se almacenó únicamente la muestra con cero meses en los tres tipos de empaque y los tres bloques (fechas de recolección de la cosecha). Lo anterior con el objetivo de inhibir la pérdida de las propiedades sensoriales de interés (sabor y color) y, a su vez, para tener una muestra control, con muy pocos cambios a lo largo del tiempo de estudio.

Las pruebas de discriminación utilizadas para determinar la magnitud de la diferencia percibida en color y sabor entre dos estímulos ( $d'$ ) fueron de tipo 2-AFC (2-Escogencia Forzada Alternativa), ya que es un método direccionado que estabiliza el criterio del panelista en la posición correcta (Lawless & Heyman, 2010). Adicionalmente, se buscó evitar la presencia del error de estímulo, es decir, evitar que el criterio del panelista sea influenciado por una asociación de los atributos de interés (relación entre el sabor y color) mediante la ejecución en primer lugar del panel de sabor seguido por el panel de color, usando juegos de muestras diferentes (Angulo & O'Mahony, 2009).

Por lo tanto, se realizaron cuatro paneles sensoriales para determinar diferencias en sabor, y en color, los cuales se efectuaron a los 2, 4, 6, y 8 meses de almacenamiento. Cada panel contó con un total de 30 evaluadores (panelistas) no entrenados por bloque de muestra.

A continuación, se detalla la evaluación microbiológica de *Salmonella* sp. previo a la realización de las pruebas sensoriales (como indicador de inocuidad de la muestra), y posteriormente la preparación efectuada en las muestras y los respectivos procedimientos utilizados durante las evaluaciones del sabor y color a través de los paneles sensoriales:

#### *Evaluación de la inocuidad de la broza de café para ser sometida a evaluación sensorial*

##### I. Ausencia / presencia *Salmonella* sp.

Se utilizó la técnica de ausencia/presencia descrita por el Manual Bacteriológico Analítico (FDAc, 2007) para la determinación de *Salmonella* sp. Dicha técnica conlleva el

montaje de un control positivo y negativo, y la ejecución de cuatro etapas consecutivas las cuales son: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento y confirmación bioquímica y serológica de las colonias. La última etapa no se efectuó debido a que no se obtuvieron colonias de *Salmonella* sp. (típicas o atípicas) en el aislamiento con medio selectivo y diferencial. La metodología utilizada se muestra a continuación (FDAc, 2007):

1. *Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo:* Se pesaron aseptícamente 25 gramos de muestra de broza de café deshidratada en un *beaker* con bolsa para homogenizar en Stomacher. Se adicionaron 225 mL de Caldo Lactosado (CL), se homogenizó en Stomacher y se incubó a  $35 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

2. *Enriquecimiento en medio líquido selectivo:*

- Se transfirió 0,1 mL del caldo de pre-enriquecimiento (preparación elaborada en el punto 1) a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), se mezcló en Vórtex y se incubó a  $42 \pm 0,2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.
- Se transfirió 1,0 mL del caldo de pre-enriquecimiento (preparación elaborada en el punto 1) a 10 mL de caldo Tetrionato (TT), se mezcló en Vórtex y se incubó a  $35 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

3. *Aislamiento en medio selectivo y diferencial:* se rayó con asa bacteriológica dos placas petri con agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), dos placas petri con agar Hecktoen Entérico (HE) y dos placas petri con agar sulfito bismuto (SB), por cada tubo incubado en el punto 2. Seguidamente, se incubaron todas las placas petri a 35°C durante  $24 \pm 2$  horas. Una vez transcurrido el tiempo descrito, se reportó la presencia de *Salmonella* sp. en los casos en los que se obtuvo colonia azul verdosas con o sin centro negro, o completamente negras en agar HE; colonias rojas o rosadas con o sin centro negro, o completamente negras en agar XLD y/o colonias cafés, grises o negras (con o sin brillo metálico) en agar SB. Adicionalmente, se tomó en cuenta para el análisis la presencia de colonias amarillas con o sin centro negro como cepas atípicas de *Salmonella* sp.

*Preparación de las muestras por evaluar mediante paneles sensoriales*

La broza de café deshidratada fue evaluada durante los paneles sensoriales (sabor y color) como una infusión a temperatura ambiente. Para ello se procedió a utilizar 15 gramos

de broza y 7 gramos de azúcar por cada 250 mL de agua hirviendo. Se estableció un tiempo estándar de extracción de la broza en agua caliente de 10 minutos en conjunto con agitación suave y constante, mediante un agitador magnético.

#### *Panel sensorial 2-AFC para sabor*

Se recopilaron datos de 30 consumidores de infusiones, los cuales evaluaron de manera simultánea, en cada panel sensorial, seis sets (pares) de muestras cada una con una muestra iniciadora (primer) para preparar el paladar antes de las muestras. Se preguntó por la muestra con el sabor más intenso, la cual fue asociada como la muestra con el sabor más dulce debido a que los azúcares son la principal fuente de energía, lo cual hace que las personas tengan mayor habilidad para reconocer su presencia en alimentos.

Cada set de muestras correspondió a cada una de las combinaciones de los tres empaques y las dos condiciones de almacenamiento (real y controlada). Cada muestra fue presentada en un recipiente plástico transparente con un volumen de 15 mL y codificada con tres dígitos de manera aleatoria (previamente balanceada según secuencias). Además, para evitar que el panelista notara diferencias en color y, por lo tanto, efectuará asociaciones del sabor con las tonalidades de color de las muestras, se utilizó luz roja (para la evaluación de sabor) y blanca (para la evaluación de color) en cada cabina durante la ejecución del panel, en conjunto con luz blanca en el pasillo. En el cuadro V se muestran los sets (pares) utilizados durante la evaluación sensorial.

**Cuadro V.** Sets o pares evaluados según bloque y tipo de empaque mediante prueba 2-AFC para la determinación de los cambios en sabor y color en función del tiempo y condición de almacenamiento de la broza de café deshidratada.

Número de Par	Par o Set evaluado		
	Bloque 1 (Sesión 1)	Bloque 2 (Sesión 2)	Bloque 3 (Sesión 3)
1	0-B1 vs B1-C-EE	0-B2 vs B2-C-EE	0-B3 vs B3-C-EE
2	0-B1 vs B1-C-PET Metal	0-B2 vs B2-C-PET Metal	0-B3 vs B3-C-PET Metal
3	0-B1 vs B1-C-P600	0-B2 vs B2-C-P600	0-B3 vs B3-C-P600
4	0-B1 vs B1-R-EE	0-B2 vs B2-R-EE	0-B3 vs B3-R-EE
5	0-B1 vs B1-R-PET Metal	0-B2 vs B2-R-PET Metal	0-B3 vs B3-R-PET Metal
6	0-B1 vs B1-R-P600	0-B2 vs B2-R-P600	0-B3 vs B3-R-P600

Nota: B1=bloque 1; B2=bloque 2; B3=bloque 3; C=condición de almacenamiento controlado; R=condición de almacenamiento real.

Se utilizó el programa FIZZ para presentar las instrucciones de cada prueba y recopilar las evaluaciones obtenidas. Al panelista se le brindaron las siguientes instrucciones a través de la computadora presente en cada cabina: “Se le presentan 6 sets de muestras con infusión de broza de café deshidratada. Cada set está compuesto por un par de muestras. Pruebe todas las muestras de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, y escoja para cada par de muestras el número de muestra que presenta el sabor más intenso (fuerte). Enjuáguese suficientemente antes de continuar con el siguiente set, y expectore cada enjuague. Antes de probar cada muestra por favor pruebe la muestra que no está rotulada”.

*Panel sensorial 2-AFC para color:*

Se recopilaron datos de 30 consumidores de infusiones, los cuales evaluaron de manera simultánea en cada panel sensorial seis sets (pares) de muestras. Cada set de muestras correspondió a cada una de las combinaciones de los tres empaques y las dos condiciones de almacenamiento (real y controlada). Cada muestra fue presentada en un recipiente plástico transparente con un volumen de 15 mL y codificada con tres dígitos de manera aleatoria (previamente balanceada según secuencias). Se utilizó luz blanca en cada cabina y en el pasillo durante la ejecución del panel.

Se utilizó el programa FIZZ para presentar las instrucciones de cada prueba y recopilar las evaluaciones obtenidas. Al panelista se le brindaron las siguientes instrucciones a través de la computadora presente en cada cabina: “Se le presentan 6 sets de muestras con infusión de broza de café deshidratada. Cada set está compuesto por un par de muestras. Seleccione la muestra, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, que presenta mayor intensidad en la coloración rojo-violeta. Por favor no movilice ni cambie la ubicación de las muestras”.

#### **4.3.2.2.2 Análisis Estadístico**

##### ***A) Métodos físicoquímicos***

El análisis estadístico se realizó por medio del programa estadístico JMP 10,0. Se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) de tres factores (tipos de empaque, condición de almacenamiento y tiempo de almacenamiento) según bloque con un nivel de

significancia del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) para analizar el efecto de cada factor (efectos simples) y la interacción de factores sobre las variables respuesta. Para los factores simples en los que se encontró diferencias significativas se aplicó la prueba Tukey-Kramer HSD ( $\alpha = 0,05$ ) para determinar cuál (es) generaron diferencias.

Además, en los casos en los que el tiempo presentó diferencias significativas, se aplicó una regresión lineal para analizar lo que sucede en cada empaque según tiempo de almacenamiento. Si se presentaron interacciones significativas se utilizó la prueba de Bonferroni.

Para las cinéticas de degradación de cianidina-3-o-rutinosido y ácido clorogénico en función de la temperatura de almacenamiento, se realizó un análisis de correlación simple con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) y se estableció el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en conjunto con el cuadrado medio del error (CME). Lo anterior con el objetivo de determinar el orden de la reacción (cero o uno) de las cinéticas de degradación de cada compuesto.

### ***B) Métodos sensoriales***

En el análisis estadístico de las pruebas de discriminación se utilizó una potencia de prueba del 95%, y un mínimo número de aciertos de 21 jueces (de 30) para considerar la presencia de diferencias significativas entre muestras (Roessler *et al.*, 1978). Durante el análisis estadístico se obtuvieron las probabilidades (p) exactas y fijas por medio de tablas binomiales de dos colas con  $\alpha$  de 0,05 para determinar en cuáles muestras se percibieron cambios en color y sabor (Ennis, 2011; Roessler *et al.*, 1978). La utilización de dos colas en vez de una se debió a que no se sabía con certeza cuál era la respuesta correcta.

Adicionalmente, se determinó por medio de desviaciones estándar, los grados de diferencia entre los estímulos de interés o índice Thurstoniano de grado de diferencia ( $d'$ ) (Ennis, 2011). Esto con el fin de determinar el tamaño de la diferencia entre dos estímulos de interés que los panelistas lograron diferenciar.

### ***C) Relación entre las diferencias de color perceptibles por medio de método instrumental (Hunter Lab) y sensorial (2-AFC)***

Se comparó la diferencia total de color ( $\Delta E$ ) obtenida por medio de Hunter Lab y el grado de diferencia ( $d'$ ) obtenido mediante prueba sensorial de discriminación, con un  $\alpha=0,05$ . No se realizó análisis de correlación ya que el método sensorial genera datos categóricos.

## **4.3.3 Evaluación de la estabilidad microbiológica de la broza de café deshidratada**

### **4.3.3.1 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial de tres factores (tipo de empaque, sistema de temperaturas y tiempo de almacenamiento), con niveles de medición 3x2x2. El bloque correspondió al lote (fechas) de recolección de muestra. El factor tipo de empaque es una variable nominal con tres niveles de medición que correspondió a los tres tipos de empaques por analizar. El factor sistema de temperatura como variable nominal tuvo dos niveles de medición que corresponden a las condiciones reales y controladas. El factor tiempo como variable continua tuvo 2 niveles de medición debido a que los análisis microbiológicos se efectuaron al tiempo cero y a los diez meses de almacenamiento.

Las variables respuesta microbiológicas fueron el recuento total de mohos y levaduras, el recuento total de coliformes fecales y totales. y ausencia/presencia *Salmonella sp.* Para los recuentos, se determinó el crecimiento logarítmico obtenido entre el tiempo de almacenamiento a cero meses y diez meses, para los tres tipos de empaque y las dos condiciones de almacenamiento.

#### 4.3.3.1.2 Métodos de análisis de laboratorio para medir las variables respuesta:

##### II. Recuento de mohos y levaduras:

Se utilizó la técnica de recuento de mohos y levaduras por esparcimiento descrita en Manual de Análisis Bacteriológico (FDAa, 2001). La metodología a seguir consistió en pesar 25 gramos de muestra de broza de café deshidratada en un *beaker* con bolsa para homogenizar en Stomacher. Seguidamente se adicionó 225 mL de Agua Peptonada Estéril (APE) y se homogenizó en Stomacher. Se prepararon diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-5}$ , utilizando cuatro tubos de vidrio con 9 mL de APE cada uno. Se montaron las diluciones por esparcimiento y duplicado en placas con Agar Papa Dextrosa acidificado a pH 3,5. Para ello se transfirió por triplicado 0,1 mL de la dilución en tubo a las respectivas placas rotuladas con la misma dilución. Las placas se incubaron sin invertir a una temperatura de 23 °C durante cinco días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las placas con colonias y se reportaron en UFC/g.

##### III. Recuento de coliformes totales y fecales:

Se utilizó la técnica de recuento por vaciado descrita en Manual de Análisis Bacteriológico (FDAb, 2002). La metodología a seguir consistió en pesar 25 gramos de muestra de broza de café deshidratada en un *beaker* con bolsa para homogenizar en Stomacher. Adicionar 225 mL de Agua Peptonada Estéril (APE) y homogenizar en Stomacher. Se prepararon diluciones decimales hasta  $10^{-5}$ , utilizando cuatro tubos de vidrio con 9 mL de APE cada uno. Las diluciones se montaron (0,1 mL de la dilución en tubo a la placa) por vaciado y cuadruplicado. Seguidamente, se cubrieron con Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV), se homogenizaron (movimiento suave formando un ocho en la zona de trabajo) y se dejaron solidificar. Se recubrieron con una sobre capa de ABRV y posteriormente se incubaron dos placas de cada dilución a 44,5°C (determinación de coliformes fecales) y a 35 °C (determinación de coliformes totales) durante 24 horas. Una

vez transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las placas con colonias y se reportan en UFC/g.

#### **4.3.3.1.3 Análisis estadístico:**

Se reportó el promedio del crecimiento logarítmico para cada tratamiento con el correspondiente intervalo de confianza al 95% (a excepción del análisis de ausencia/presencia de *Salmonella* sp.). A los resultados obtenidos del crecimiento logarítmico se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) con una probabilidad de 0,05 con el fin de evaluar la significancia del efecto de cada uno de los factores durante el almacenamiento. Para los factores en los que se encontró diferencias significativas se aplicó la prueba Tukey-Kramer HSD ( $\alpha = 0,05$ ) para determinar cuál (es) generaron diferencias.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Selección de las mejores estructuras de empaque con base en la evaluación de las propiedades de permeabilidad de agua y el sello.**

Se procedió a seleccionar y analizar cinco empaques flexibles de venta en el mercado costarricense, con el fin de elegir los empaques que, durante el almacenamiento, permitan disminuir la pérdida de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante presentes en la broza de café deshidratada.

#### **5.1.1 Selección de empaques por evaluar:**

La búsqueda y escogencia de los empaques a evaluar a nivel de mercado costarricense se vio restringida por el volumen de empaques flexibles requeridos para el posterior estudio de almacenamiento (sección 5.2). Esto debido a que el volumen de empaques a utilizar fue considerado por las empresas como pequeña y no rentable, motivo por el cual no se lograron obtener empaques especializados, es decir, empaques diseñados con las mejores combinaciones de componentes reportados a nivel de literatura. No obstante, dentro de las opciones factibles a nivel costarricense, se logró seleccionar los empaques con las mejores propiedades físicas y de barrera.

En el cuadro A2 (sección 9.2 en anexos) se detallan las empresas proveedoras de los empaques, así como también la respectiva composición estructural reportada en las correspondientes fichas técnicas. En el caso específico de la empresa Total Técnica SA, la cual es la proveedora del empaque PET metal, esta cuenta con certificado BRC Packaging (Grado AA: BRC REF 1977852 certificado C0172033). Dicho certificado garantiza que los empaques son producidos bajo estándares que permiten garantizar la inocuidad alimentaria. Mientras que la empresa Quimifarma CR, la cual es la proveedora de los empaques P-600 y P-800, certifica por que los componentes y procesamiento de cada material de empaque cumplen con la regulación estipulada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) número 21.175.05 referente a empaques farmacéuticos y alimentarios. Por su parte, el empaque Kraft metalizado cuenta con certificación por la empresa SGS, la cual afirma que el material es seguro para empacar alimentos.

En el cuadro VI se detallan los costos según cantidades mínimas de venta de cada material de empaque.

**Cuadro VI.** Empresa proveedora y los respectivos precios y presentaciones de venta de cada material de empaque por analizar.

<b>Material de empaque</b>	<b>Empresa Proveedora</b>	<b>Presentación de venta</b>	<b>Venta mínima</b>	<b>Precio por venta mínima (\$ USD)</b>
<b>EE</b>	EC CR	Bolsas (18,0 x 34,0 plg)	nr	Nr
<b>PET metal</b>	Total Técnica SA	Bobinas	100 kg de bobina sin impresión	6,85 por kg de bobina (aprox. \$685)
<b>P-600</b>	Plástico Tico SA	Bolsas (7,89 x 10,83 plg)	50 unidades	28,41
<b>P-800</b>	Quimifarma CR	Bolsas (6,9 x 9,7 plg)	50 unidades	23,35
<b>Kraft metalizado</b>	Quimifarma CR	Bolsas (12,4 x 4,4 plg)	50 unidades	12,96

Nota: nr =no reportado

A partir del cuadro VI se observa que la presentación de venta de la mayoría de los materiales de empaque es en bolsa, por lo tanto, las dimensiones de cada bolsa ya están definidas por los proveedores. A excepción de Total Técnica S.A, la cual es la única empresa que produce en el país sus propios empaques, mientras que las empresas restantes son importadoras del producto. Por lo tanto, las dimensiones de las bolsas en venta se consideran una limitante en el estudio, debido a que el tamaño de la bolsa incide en el precio, cantidad de venta mínima, entre otros factores.

Adicionalmente, se debe destacar que el tamaño de cada bolsa como presentación de venta representa una desventaja a nivel económico, ya que el proceso de exportación de la broza de café requiere una dimensión de bolsa específica, la cual debe ser igual o superior a las dimensiones que actualmente utiliza el proveedor de broza (dato de las dimensiones es confidencial). Esto debido a que la cantidad de broza a empacar es un dato relevante en la decisión. No obstante, en el presente trabajo no se menciona la cantidad de broza por empaque debido a que se considera un dato confidencial. Por lo tanto, se debe contemplar un costo adicional asociado a la contratación de una empresa que ofrezca los servicios de formación de bolsas cuyo equipo tenga la capacidad de procesar dichas

dimensiones sin poner en riesgo la integridad del empaque. Al aumentar la dimensión del empaque se aumenta la superficie y, por ende, se puede dar una afectación de las propiedades de barrera requeridas.

## **5.1.2 Análisis de las propiedades físicas de los materiales de empaque:**

### **5.1.2.1 Transparencia**

En el caso específico de la presente investigación, no se midió cuantitativamente la transparencia de cada material debido a que no se contaba con el equipo. No obstante, al comparar contra luz los empaques en estudio, se logró determinar que el P-800 parece dejar pasar la luz aún cuando su apariencia metalizada indica lo contrario. Por lo que, dicho empaque, podría presentar la desventaja de que no brinda la protección adecuada para los compuestos sensibles a la luz presentes en la broza de café deshidratada, y además se requiere determinar qué longitudes de onda permite pasar a través de su estructura.

### **5.1.2.1 Sellabilidad**

La sellabilidad es una de las propiedades de mayor importancia a nivel de empaques, debido a que hace alusión al gasto energético y tiempo que se requiere en lograr el cierre correcto que no ponga en riesgo el producto envasado. Se relaciona de manera directa con la temperatura de fusión del material de empaque debido a que es en dicha temperatura en donde se logra fundir y combinar el o los polímeros que conforman el material (Grumezescu, 2016).

Las pruebas de sellabilidad se realizaron como prueba al empaque (sin producto adentro). En el cuadro VII se muestran los valores registrados para los cinco empaques analizados.

**Cuadro VII.** Tiempo, temperatura e impulso eléctrico utilizado para el sellado correcto de cada material de empaque en función de su grosor y el tipo de selladora utilizado.

Material de empaque	Grosor (µm)	Selladora Impulso Eléctrico		Selladora Superficie Caliente		Fugas en cámara al vacío
		Tiempo (s)	Impulso eléctrico	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	
EE	155	0,50	4	0,50	120	No
PET metal	105	0,55	4	0,60	160	No
P-600	110	0,50	5	0,50	110	No
P-800	60	0,40	3	0,50	60	No
Kraft metalizado	150	No hizo sello		No hizo sello		NA

En el cuadro VII se observa que los empaques con mayores grosores eran los que requirieron los valores más altos de impulso eléctrico y temperatura. Dicho comportamiento corresponde con lo esperado debido a que los polímeros con mayores espesores tienen mayor fuerza estructural, por lo que se requiere alcanzar temperaturas más altas que permitan fundir y mezclar las estructuras químicas que conforman el material de empaque (Umile & Cirillo, 2016). Asimismo, es importante destacar que en la selladora por impulso eléctrico no se manipuló de manera directa el tiempo y la temperatura, pero sí el grado de impulso eléctrico a generar. No obstante, sí se puede asegurar que se alcanzan temperaturas capaces de fundir y mezclar los polímeros de manera eficiente. Esto se debe a que el impulso eléctrico, el cual es proporcionado por las resistencias eléctricas, se encuentra relacionado con la temperatura de calentamiento, tiempo de calentamiento de las resistencias y presión entre las superficies calientes, que son las que aparecen en el cuadro anterior.

Ahora bien, es importante aclarar que la ficha técnica del empaque de EE no reporta el tipo de material utilizado, pero sí que es un empaque con una estructura definida que contiene polietileno.

En los resultados reportados en el cuadro VII, se puede notar que el EE no fue el empaque que requirió mayores temperaturas o tiempo para fundirse y lograr el sello, aún cuando es una resina con alta dureza y la que posee mayor grosor (155 µm). Lo anterior se puede atribuir a que, al contener polietileno, se logra mejorar las propiedades de

sellabilidad del material. Esto tomando en consideración que el polietileno de baja densidad y de alta densidad posee una temperatura de fusión de 121-17 °C y 135-154 °C respectivamente (Alavi *et al.*, 2014).

Ahora bien, el empaque PET metal fue el que requirió un mayor tiempo, temperatura e impulso eléctrico para garantizar un sellado apropiado, aún cuando el grosor del empaque (105 µm) fue inferior al del kraft metalizado (150 µm) y el de EE (155 µm). El comportamiento obtenido se debe a que la composición el empaque PET metal se basa en una serie de láminas a base de polipropileno (temperatura de sellado de 140-205 °C), polietileno de tereftalato (temperatura de sellado de 205- 220 °C) y polietileno (temperatura de sellado de 110-135 °C). Los materiales mezclados poseen altos puntos de fusión, por lo que su combinación implica mayores condiciones de tiempo y temperatura para lograr fundir todas las capas y sellarlas (Alavi *et al.*, 2014; Thomas & Visakh, 2011).

En el caso específico del empaque Kraft metalizado, no se logró el sellado correcto con ningún tipo de selladora. Dicho comportamiento se debe al elevado grosor del empaque y a que la capa exterior es a base de papel kraft. Este último material posee una resistencia elevada, la cual está asociada a que en su composición hay un bajo contenido de lignina y una alta relación de azufre. Además, al no estar blanqueado, su resistencia se mantiene elevada, lo cual evita que se funda, y por ende, no se alcancen las demás capas del empaque (Awada *et al.*, 2015; Brodin, 2009).

El empaque P-600, en comparación con el empaque P-800, requirió mayor tiempo de contacto, temperatura e impulso eléctrico para lograr el sellado correcto. Esto debido a que el primero está conformado por una mayor cantidad de láminas (PET, PE baja densidad y aluminio) y también posee mayor grosor. Además, aun cuando el P-600 y P-800 poseen el mismo polímero en su composición (PET), la diferencia entre el entrecruzamiento de las cadenas, contracción y orientación o combinación con los demás componentes hace que se cambie la densidad y, por lo tanto, la sellabilidad del material (Thomas *et al.*, 2012).

### 5.1.2.3 Propiedades de barrera

#### 5.1.2.3.1 Velocidad de transferencia de vapor de agua (VTVA)

La velocidad de transferencia de vapor de agua (VTVA) es una de las principales propiedades de barrera analizadas en los materiales de empaque. Permite medir la masa de agua que logra atravesar una superficie homogénea de un material en un tiempo determinado de 24 horas ( $\text{g/m}^2 \cdot 24\text{h}$ ). Es una propiedad que resulta de interés debido a que está directamente relacionada con la vida útil y estabilidad del producto envasado, por lo que cuánto menores sean los valores de VTVA mejores serán las propiedades de barrera del material de empaque (Lagarón, 2011; Mrkić *et al.* 2007).

Por medio del cuadro VIII se detallan los valores de velocidad de transferencia de vapor de agua (VTVA) evaluados a nivel experimental a 23 y a 35 °C para los empaques. En dicho cuadro se muestra que los valores de VTVA presentaron diferencias significativas entre empaques para la temperatura de análisis de 23 °C ( $p < 0,0001$ ) y 35 °C ( $p < 0,0003$ ). Así, al aplicar la prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ ) se obtuvo que para 23 °C los empaques EE, PET Metal y P-600 no fueron significativamente diferentes entre sí, pero si difieren con respecto a P-800 y Kraft metalizado. Además, estos dos últimos empaques fueron significativamente diferentes entre sí. A 35 °C, los empaques EE, PET Metal, P-800 y Kraft metalizado no fueron significativamente diferentes entre sí, pero si con respecto al empaque P-600. Este último fue el de menor VTVA.

**Cuadro VIII.** Velocidad de transmisión de vapor de agua obtenido experimentalmente a 23 °C y 35 °C para cada material de empaque analizado.

Material de Empaque	VTVA ( $\text{g/m}^2 \cdot 24\text{h}$ )	
	T = 23 °C	T = 35 °C
EE	(28,56 ± 8,27) <sup>c</sup>	(84,36 ± 19,52) <sup>a</sup>
PET Metal	(26,07 ± 8,27) <sup>c</sup>	(81,88 ± 19,52) <sup>a</sup>
P-600	(24,74 ± 8,27) <sup>c</sup>	(48,80 ± 19,52) <sup>b</sup>
P-800	(77,55 ± 8,27) <sup>a</sup>	(92,13 ± 19,52) <sup>a</sup>
Kraft Metalizado	(62,44 ± 8,27) <sup>b</sup>	(82,85 ± 19,52) <sup>a</sup>

Nota: Para cada temperatura de análisis los promedios de los valores de VTVA reportados con letras distintas son significativamente diferentes. Promedios reportados con 95 % de confianza.

Adicionalmente, en el cuadro VIII se observa que los cinco empaques analizados presentaron mayor VTVA a 35 °C con respecto a 23 °C. Es decir, al aumentar la temperatura se generó una disminución en la capacidad de barrera de los empaques hacia el permeante, además, el P-600 fue el que menor cambio sufrió. Dicho comportamiento concuerda con lo esperado debido a que el flujo de vapor es directamente afectado por cambios en la temperatura, así como también por diferencias en la humedad relativa dentro y fuera del empaque (Kim, 2016).

De igual manera, se puede notar que la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) varió en función de la naturaleza de los polímeros para todos los empaques y con las dos temperaturas analizadas (23 °C y 35 °C). Esto se asocia a las diferencias presentes en cuanto a las características físicas y químicas de cada material de empaque (Waack *et al.*, 1955). No obstante, todos los valores de VTVA obtenidos experimentalmente se encontraron dentro del rango reportado para la mayoría de películas de plástico con el cual se favorece la conservación de los alimentos, el cual va de 1-100 g/m<sup>2</sup>·24h (Keller & Kouzes, 2017).

Los valores de VTVA obtenidos para el empaque P-600 demostraron que, independientemente de la temperatura, su estructura posee una resistencia física más eficiente hacia el paso de las moléculas de agua capaces de difundirse a través de sus polímeros. Este comportamiento se asocia a la combinación de materiales en su composición, ya que el PET es una película con alta resistencia al calor y con una transmisión de vapor reportada teóricamente entre 15-20 g/m<sup>2</sup>·24h a 38 °C y 90 % HR. Además, la presencia de LDPE coextruido también le confiere una excelente estabilidad térmica, lo que a su vez permite que se pueda utilizar en un amplio rango de temperaturas sin que se genere degradación térmica. Cabe destacar que el proceso de coextrusión del LDPE es lo que contribuye a mejorar las propiedades de barrera del material, en comparación con las que tiene que el LDPE sin coextruirse, que son de 10-20 g/m<sup>2</sup>·24h a 38 °C y 90 % HR (Giles *et al.*, 2014).

El empaque PET Metal fue el segundo empaque con menor VTVA a 23 °C, pero al analizar su comportamiento a 35 °C se obtuvo que la ganancia de masa incrementó a más del triple. Dicho incremento tan marcado puede estar asociado principalmente a la presencia de polietileno en su estructura, ya que los polímeros amorfos como el polietileno poseen una mayor permeabilidad a los gases en comparación con los polímeros cristalinos (ej: celulosa) conforme se aumenta la temperatura. No obstante, en el caso específico del polietileno, posee una constante de permeabilidad mayor debido a que tiene una energía cohesiva menor, aun cuando posee una alta simetría en su estructura, en comparación con la permeabilidad de estructuras que también se catalogan como simétricas y con bajas permeabilidades, como lo es el policloruro de vinilo lidenado (Waack *et al.* 1955).

Ahora bien, en el caso del empaque de EE, el valor de VTVA obtenido experimentalmente a 23 °C hace que se catalogue como el tercer empaque con mejor barrera a 23 °C, solamente superado por el P-600 y PET Metal. No obstante, al igual que sucedió con el PET Metal, el VTVA aumentó tres veces su valor al incrementar la temperatura del análisis a 35 °C. Dicho aumento de VTVA a 35 °C hizo que fuera el segundo empaque con peor capacidad de barrera y menor estabilidad frente a los cambios de temperatura, lo cual concuerda con lo reportado por Eval Americas (2009), ya que el material que lo constituye es higroscópico con sensibilidad a ambientes con alta humedad relativa. Además, si se combina con cambios de temperatura, los filamentos que lo conforman se vuelven más susceptibles a la degradación, motivo por el cual un aumento de 10 °C puede provocar que su tasa de transferencias de gases se incremente hasta más del doble (Somwangthanaroj *et al.*, 2012).

El empaque P-800 está hecho a base PET, PET metalizado (MetPET), adhesivos y aditivos que hacen que se mejoren las propiedades físicas, como el brillo. No obstante, aunque el MetPET tiene una buena barrera de oxígeno y humedad, el VTVA obtenido experimentalmente para las dos temperaturas analizadas fue el más alto en comparación con los demás empaques analizados. Dicho comportamiento se asocia al bajo grosor del empaque (60 µm), así como también a que el proceso de metalización del PET produce cambios significativos, principalmente en las propiedades ópticas y eléctricas. Además, el

uso de varios aditivos y adhesivos en la composición de un empaque (como se reporta en la ficha técnica) hace que se incremente la permeabilidad del vapor de agua debido a que se disminuyen las fuerzas intermoleculares en la cadena del polímero y, por ende, se genera mayor movilidad molecular y mayor capacidad de entrada de las moléculas de agua (Paine, 2012).

Para el empaque Kraft metalizado se esperaba un bajo valor de VTVA debido al elevado grosor del empaque (150  $\mu\text{m}$ ), ya que es una estructura que está conformada por aluminio. No obstante, los resultados de VTVA obtenidos a nivel experimental fueron elevados, y puede atribuirse a que al flexionar el papel de aluminio este puede ser fácilmente agrietado. Además, el papel kraft (capa externa), al mojarse, disminuye drásticamente sus propiedades de barrera (Kerry, 2012).

#### **5.1.2.3.1 Coeficiente de Permeabilidad**

El coeficiente de permeabilidad es una medida de la velocidad con la que una cantidad de permeante (gas o vapor) pasa a través de un sólido en función del área del polímero, en un tiempo determinado y con una diferencia de presión a través del material ( $\text{g}\cdot\text{m}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$ ). Cuanto menor sean los valores, mejor barrera al vapor de agua.

En el cuadro IX se muestran los coeficientes de permeabilidad a 23 y 35 °C para los materiales de empaque analizados. Con base en los resultados estadísticos se obtuvo que los coeficientes de permeabilidad de los materiales de empaque presentaron diferencias significativas para la temperatura de análisis de 23 °C ( $p < 0,0001$ ) y 35 °C ( $p < 0,0001$ ). Por tanto, al aplicar la prueba Tukey Kramer HSD ( $\alpha = 0,05$ ), se obtiene que para 23 °C no fueron significativamente diferentes entre sí los empaques Kraft Metalizado y PET Metal al igual que P-800 y P-600. No obstante, el empaque EE fue significativamente diferente con respecto a todos los anteriores. Al aumentar la temperatura a 35 °C, los empaques EE y Kraft metalizado entre sí, al igual que P-600 y P-800 entre sí, no fueron significativamente diferentes, pero sí lo fue el PET Metal con respecto a los anteriores.

**Cuadro IX.** Coeficiente de permeabilidad obtenido experimentalmente a 23 °C y 35 °C para cada material de empaque analizado.

Material de Empaque	Coeficiente de Permeabilidad ( $\text{g}\cdot\text{m}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$ )	
	T = 23 °C	T = 35 °C
<b>EE</b>	$(2,06 \times 10^{-11} \pm 5,47 \times 10^{-12})^b$	$(6,08 \times 10^{-11} \pm 9,96 \times 10^{-12})^a$
<b>PET Metal</b>	$(4,03 \times 10^{-11} \pm 5,47 \times 10^{-12})^a$	$(5,07 \times 10^{-11} \pm 7,13 \times 10^{-12})^b$
<b>P-600</b>	$(1,26 \times 10^{-11} \pm 5,47 \times 10^{-12})^c$	$(2,50 \times 10^{-11} \pm 9,97 \times 10^{-12})^c$
<b>P-800</b>	$(2,17 \times 10^{-11} \pm 5,47 \times 10^{-12})^c$	$(2,57 \times 10^{-11} \pm 9,97 \times 10^{-12})^c$
<b>Kraft Metalizado</b>	$(4,36 \times 10^{-11} \pm 5,47 \times 10^{-12})^a$	$(5,78 \times 10^{-11} \pm 9,72 \times 10^{-12})^a$

Nota: Para cada temperatura de análisis, los promedios de los valores de VTVA reportados con letras distintas son significativamente diferentes. Promedios reportados con 95 % de confianza.

A partir del cuadro IX se puede apreciar que, al incrementar la temperatura, se aumenta el valor de los coeficientes de permeabilidad de todos los empaques, excepto para PET Metal. Dicho comportamiento concuerda con lo mencionado por Mrkić *et al.* (2007), debido a que la temperatura ejerce un estrés mecánico en el polímero, lo cual a su vez hace que cambien las propiedades de barrera por un incremento en el nivel de energía de permeabilidad de las moléculas.

Es importante destacar que, a partir del cuadro IX, también se puede notar que, para las dos temperaturas analizadas, el empaque Kraft metalizado y el EE fueron los que obtuvieron los coeficientes de permeabilidad más altos, aún cuando eran los empaques con mayores grosores. Dicho comportamiento se puede atribuir a las características fisicoquímicas de cada material, como lo son la densidad, cristalinidad, orientación, entre otras (Siracusa, 2012). En el caso específico del Kraft metalizado y el EE, ambos empaques poseen polietileno en su composición, el cual es un polímero semicristalino que tiene una fase cristalina rígida y una fase amorfa elástica. Dicha semicristalinidad lo vuelve más susceptible a los cambios de temperatura, ya que la temperatura hace que disminuya su cristalinidad y, por ende, se dé un aumento de la fase amorfa la cual produce los fenómenos de sorción y difusión del permeante en los polímeros semicristalinos (Cocca *et al.*, 2011;

Olkhov *et al.*, 2003; Siracusa, 2012). Además, la manipulación de las bolsas y el peso que soportan son factores que pueden provocar grietas en el empaque.

Ahora bien, tomando en consideración lo previamente mencionado, se esperaba que el empaque P-600 obtenga un coeficiente de permeabilidad alto. Esto debido a que está compuesto por polietileno de baja densidad, el cual posee un porcentaje de cristalinidad bajo que va entre 40-60 % y, por ende, un porcentaje elevado de la fase amorfa. No obstante, los resultados experimentales difieren de lo esperado debido a que el empaque P-600 fue el de menor permeabilidad junto con el P-800. El comportamiento presentado se puede asociar a que los polímeros también pueden actuar como filtros de membrana, permitiendo el paso de algunas moléculas rápidamente y retardando el paso de otras. Dicha restricción se asocia con factores como el tamaño de la molécula del permeante y la afinidad del permeante con la matriz polimérica (según polaridades) (Aguilar, 2007).

Aunado a lo anterior, es importante destacar que el aumento en los coeficientes de permeabilidad del Kraft metalizado, P-800 y PET Metal se atribuye a que las películas que poseen algunas de sus capas metalizadas presentan mayor estrés debido a la temperatura y, por ende, cambios en las propiedades de barrera. Esto se da porque al estar metalizados se vuelven más susceptibles a la rugosidad de la superficie y al incremento de poros en su estructura (Galotto *et al.* 2008).

### **5.1.3 Empaques seleccionados para el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada**

Con los resultados expuestos con anterioridad, se procedió a efectuar una comparación estadística de las variables de interés para los diferentes empaques con respecto a las obtenidas en el empaque con mejores propiedades. Debido a que el interés estuvo en seleccionar los empaques con menor permeabilidad, se procedió a efectuar la prueba estadística Hsu MCB ( $\alpha = 0,05\%$ ). Dicha prueba implica una comparación con el mejor empaque definido según la obtención de los valores más bajos de velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) y coeficientes de permeabilidad (P). En dicho análisis se buscó determinar cuando no se presentaron diferencias significativas, ya que en

este caso se indica que el promedio reportado para cada variable respuesta de cada empaque no fue significativamente mayor con respecto al valor mínimo (más bajo) obtenido.

Por lo tanto, se obtuvo que a 23 °C los empaques PET Metal ( $p = 0,6019$ ) y EE ( $p= 0,2249$ ) obtuvieron los valores más bajos y cercanos al valor de VTVA del empaque P-600 (más bajo reportado); pero a 35 °C ninguno se acercó al valor más bajo, el cual fue obtenido con P-600. De igual manera, al analizar el coeficiente de permeabilidad, se obtuvo que a 23 °C ningún empaque se acercó al valor más bajo obtenido por P-600; y a 35 °C solamente se acercó el empaque P-800 ( $p= 0,7166$ ).

Consecuentemente, partiendo de lo analizado con anterioridad, se considera que los mejores empaques a utilizar para el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada, eran el empaque EE, P-600 y PET metal. Dichos empaques impiden el paso de la luz, excepto el EE, poseen buenas características de sellabilidad, tienen las mejores propiedades de barrera analizadas (los valores más bajos de transmisión de vapor de agua y permeabilidad) y son menos afectados por cambios de temperatura. Además, cuentan con certificaciones de que el proceso y los materiales utilizados son inocuos y son aceptados en los diferentes reglamentos asociados con envases alimentarios (sección 5.1.1).

## **5.2 Evaluación de la influencia de la temperatura y tipo de empaque durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada sobre el contenido de antocianinas, ácido clorogénico, humedad, color y sabor**

### **5.2.1 Variaciones en el contenido de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido por HPLC**

Para la cuantificación del contenido de ácido clorogénico y antocianinas en la broza de café, se elaboró una curva de calibración con diferentes concentraciones de reactivo puro (estándar analítico) de ácido clorogénico y cianidina-3-o-rutinosido como patrones de referencia. En la sección 9.4 en anexos se muestran las respectivas ecuaciones de regresión lineal obtenidas para cada patrón de referencia en función de la concentración (mg/L) y el área de la señal. Así como también, las características de desempeño del método (sección 9.6 en anexos) y los cromatogramas de las muestras de broza de café deshidratada con y sin enriquecimiento (sección 9.5 en anexos) utilizados para corroborar que las señales o picos

aumentados correspondieron a cianidina 3-o-rutinosido y el ácido clorogénico. Para este último compuesto, se observa (ver anexo 9.5) un corrimiento de los picos, pero sí se logran identificar correctamente ya que se mantiene el patrón de señales como lo expuesto por García & Quintero, 2008 y por Geremu *et al.*, 2016 (ver anexo 9.7, figura A.7).

En el cuadro X se detallan los tiempos de retención utilizados según cada señal obtenida en los cromatogramas.

**Cuadro X.** Tiempos de retención obtenidos según longitud de onda para los compuestos evaluados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (nm)
Cianidina 3-o-rutinosido	14,13	512
Ácido clorogénico	9,29-11,45	327

En el cuadro X se observa que el tiempo de retención fluctuó entre 9,29-11,45 minutos para el ácido clorogénico. Dichas variaciones pueden asociarse a pérdida de especificidad de la columna por obstrucción de sus poros o a que hay compuestos en la broza de café deshidratada que se encuentran reaccionando con el ácido de interés, por lo que se generan corrimientos de las señales. No obstante, en las figuras expuestas en la sección 9.5 en anexos, se puede notar que el ordenamiento y la separación de las señales se mantuvo igual, solamente variaron los tiempos.

En cuanto a los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) obtenidos para el ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido (ver anexo 9.6) se obtuvo que la concentración mínima de cada compuesto que pudo ser detectada, medida y reportada con fiabilidad correspondió a 2,02 mg/L y 0,23 mg/L para ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido respectivamente. Mientras que el límite de cuantificación más bajo de la concentración (punto más bajo de la curva de calibración) para la obtención de una medida precisa fue de 6,73 y 0,78 mg/L respectivamente.

### 5.2.1.2 Análisis de las muestras de broza de café:

Para la variación de la concentración de cianidina-3-o-rutinosido en función de las condiciones de almacenamiento, se obtuvo, mediante análisis estadístico ( $\alpha= 0,05$ ) que los factores simples, la condición de almacenamiento ( $p = 0,0137$ ), el bloque ( $p= <0,0001$ ) y el tiempo de almacenamiento ( $p= <0,0001$ ) presentaron diferencias significativas, y no se presentó interacción de dichos factores. Además, al aplicar la prueba Tukey-Kramer HSD ( $\alpha =0,05$ ), se encontró que la condición real de almacenamiento fue la que permitió la mayor conservación de cianidina-3-o-rutinosido a lo largo del estudio, y que la concentración del compuesto en el bloque dos fue significativamente mayor en comparación con el bloque 1 y 3 para las dos condiciones analizadas. Lo previamente mencionado se muestra por medio del cuadro XI.

**Cuadro XI.** Promedios de la concentración de cianidina-3-o-rutinosido obtenidos según bloque y condición de almacenamiento en broza de café deshidratada.

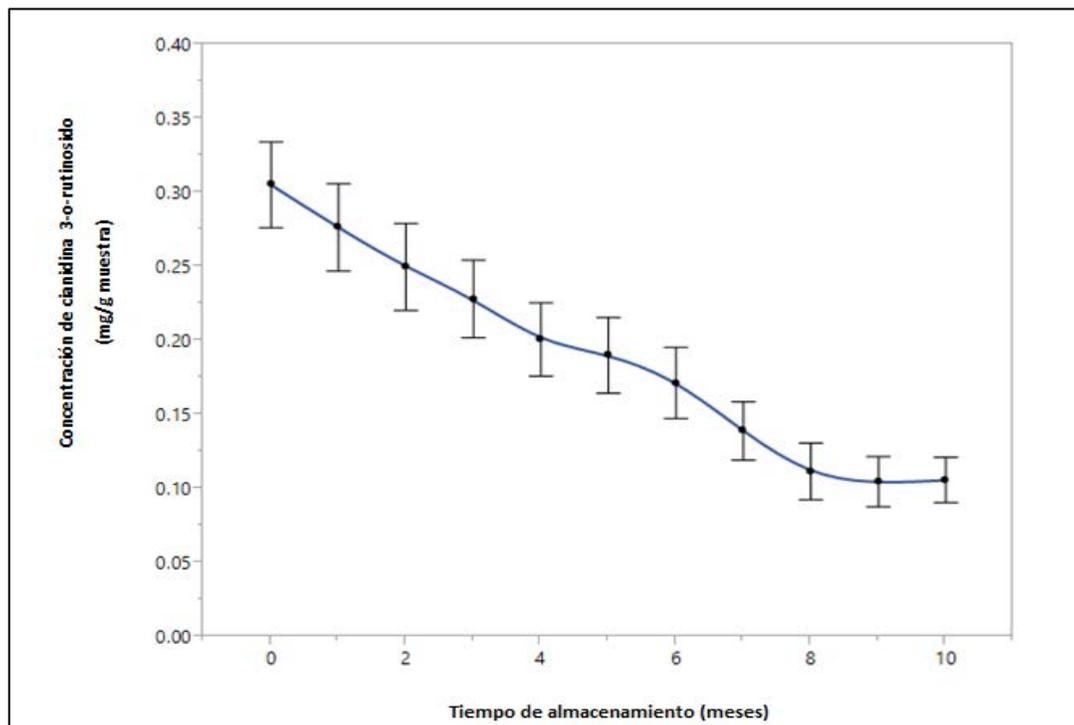
Concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/ g muestra)				
Condición de Almacenamiento		Bloque		
Real	Controlada	1	2	3
0,200 <sup>A</sup>	0,179 <sup>B</sup>	0,116 <sup>B</sup>	0,350 <sup>A</sup>	0,103 <sup>B</sup>

Nota: Se reporta con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95% de confianza en los valores de concentración obtenidos por medio de la prueba de Tukey.

Así mismo, al analizar la relación estadística entre la concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g muestra) y el tiempo (meses), se obtiene la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Concentración de cianidina 3-o-rutinosido} = 0,2942 - 0,021 * \text{Tiempo [7]}$$

Dicha ecuación indica que la concentración de cianidina disminuyó en 0,021 mg/g por mes, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) entre el contenido de cianidina y el tiempo del 18%. Es decir, la variación total de la concentración de cianidina es explicada por el modelo de regresión en un 18 %. En la figura 5 se muestra la degradación de cianidina 3-o-rutinosido en función del tiempo de almacenamiento.



**Figura 5.** Variación de la concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g muestra) según tiempo de almacenamiento en meses para la broza de café deshidratada.

Para la variación de la concentración de ácido clorogénico en función de las condiciones de almacenamiento, se obtuvo mediante análisis estadístico ( $\alpha= 0,05$ ), que los factores simples que presentaron diferencias significativas fueron el bloque ( $p= <0,0001$ ), tiempo de almacenamiento ( $p= <0,0001$ ), tipo de empaque ( $p= <0,0001$ ) y condición de almacenamiento ( $p= 0,0004$ ). Mientras que solamente la interacción entre el tipo de

empaque y la condición de almacenamiento ( $p = <0,0011$ ) presentaron diferencias significativas.

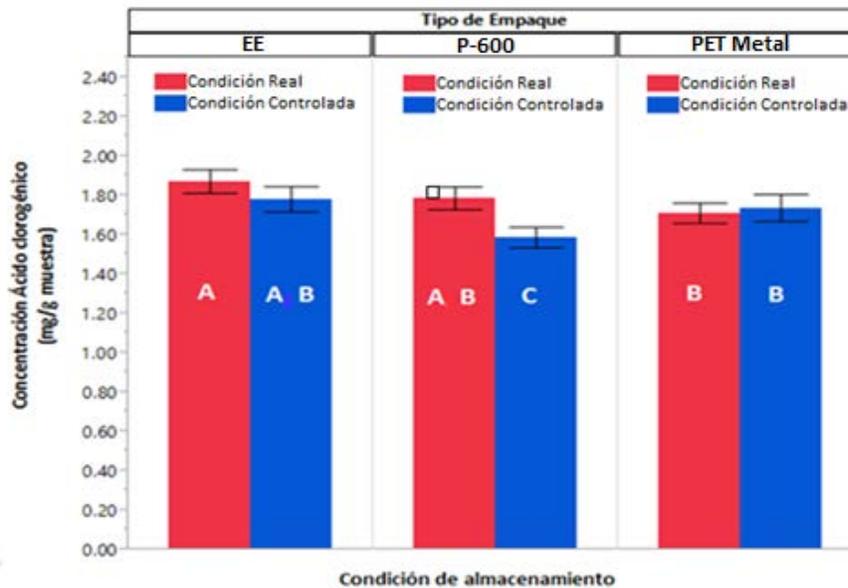
Al aplicar la prueba Tukey Kramer HSD ( $\alpha = 0,05$ ) se obtuvo que el bloque 3 fue significativamente diferente con respecto al bloque 1 y 2 debido a que fue el que presentó una menor concentración del compuesto, como se muestra en el cuadro XII.

Los empaques PET Metal y P-600 fueron significativamente diferentes del EE debido a que este último empaque fue el que permitió la mayor conservación de ACG en condiciones reales, mientras que el empaque P-600 conservó menos ACG que los otros dos empaques en condiciones controladas. Asimismo, la condición real (actual) conservó mejor la concentración en comparación con la condición controlada. Dichos resultados se muestran por medio de la figura 6.

**Cuadro XII.** Variación promedio de la concentración de ácido clorogénico (mg/g muestra) según bloque para la broza de café deshidratada.

Bloque	Concentración Ácido Clorogénico (mg/g muestra)
1	1,766 <sup>A</sup>
2	1,809 <sup>A</sup>
3	1,660 <sup>B</sup>

Nota: Para cada bloque se reporta con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza.

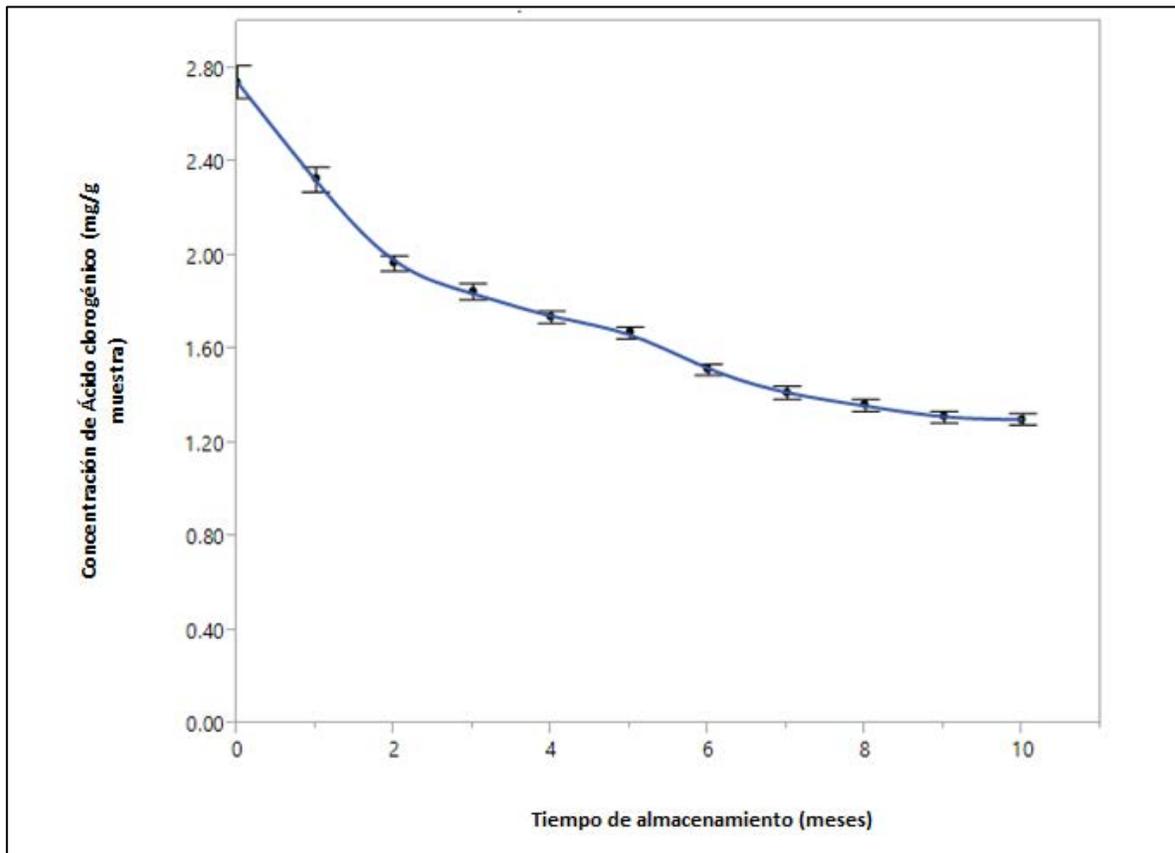


**Figura 6.** Variación de la concentración promedio de ácido clorogénico (mg/g muestra) presente en la broza de café deshidratada según condición de almacenamiento y tipo de empaque. Se reporta con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza.

Al analizar la relación estadística entre la concentración de ácido clorogénico (mg/g muestra) y el tiempo (meses), se obtuvo la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Concentración de ácido clorogénico} = 2,389 - 0,129 * \text{Tiempo} \quad [10]$$

Dicha ecuación indica que la concentración de ácido clorogénico disminuyó en 0,129 mg/g por mes, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) entre el contenido de ácido y el tiempo del 70 %. Es decir, la variación total de la concentración de ácido clorogénico es explicada por el modelo de regresión únicamente en un 70 %. En la figura 7 se muestra la ecuación de regresión obtenida para la degradación de ácido clorogénico, donde se observa una pérdida de más de la mitad del compuesto al cabo de los diez meses de almacenamiento.



**Figura 7.** Variación generalizada de la concentración de ácido clorogénico (mg/g muestra) según tiempo de almacenamiento en meses para la broza de café deshidratada.

Ahora bien, con base en lo mostrado previamente, se puede notar que las condiciones reales permitieron una mejor conservación del ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido en comparación con las condiciones controladas. El comportamiento obtenido se debió a que las temperaturas en las condiciones reales variaron significativamente (desde 21°C a 35 °C) durante los primeros seis meses, y, aunque se alcanzaron temperaturas mayores a las de las condiciones controladas (25 °C), el tiempo de exposición a dichas temperaturas fue corto y no fue constante; por lo que no se logró ver el efecto de las temperaturas altas (superiores a 25 °C) reflejado en el estudio de almacenamiento.

Adicionalmente, en las figuras 5 y 7 se pudo notar que durante los dos primeros meses de almacenamiento se presentó una disminución abrupta de los compuestos de

interés (ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido) en las dos condiciones de almacenamiento analizadas (real y controlada) y para los tres tipos de empaque en estudio (promedio). Dicha disminución fue más pronunciada en el ácido clorogénico que en la antocianina. El comportamiento se puede deber a la alta inestabilidad del ácido clorogénico frente a la temperatura. En el caso específico del ácido clorogénico, la temperatura lo puede degradar casi totalmente a derivados de fenol, isomerizarlos, transformarlos en quinolactonas y/o degradarlos en compuestos de bajo peso molecular (Trugo, 1984). Por este motivo se han reportado disminuciones significativas de ácido clorogénico entre el café tostado y sin tostar (Zamora, 2009). En el caso de la antocianina, la degradación fue notoria, pero menos pronunciada debido a que en ella la temperatura induce una destrucción lenta de los pigmentos hasta transformarse en chalcona. La chalcona es una estructura inestable que se degrada en compuestos de color café (Guzmán *et al.*, 2010).

También se pudo notar que independientemente del empaque utilizado, la concentración de cada compuesto disminuyó a través de los diez meses de almacenamiento hasta alcanzar valores poco cambiantes, siendo esta la principal diferencia en el comportamiento a lo largo de los meses. Esta variación estable correspondió a los últimos tres meses de almacenamiento establecida a una temperatura de 22°C, lo cual podría indicar que temperaturas más bajas pueden reducir la destrucción del ACG. Además, las variaciones también se pueden atribuir a las propiedades de barrera de cada empaque (analizadas previamente en la sección 5.1), así como también a la posible presencia de la enzima polifenoloxidasas (PPO) la cual genera modificaciones estructurales en los compuestos y, por ende, se modifican los tiempos de retención utilizados para su cuantificación mediante HPLC (Zaro, 2014).

No obstante, es importante destacar que, aunque la broza de café deshidratada fue elaborada en condiciones que garantizan su estabilidad, existe la posibilidad de que aún quede presencia de actividad enzimática latente. Es decir, que una porción o toda la enzima se encuentre en forma inactiva, pero susceptible de ser activada por uno o varios tratamientos intencional o deficientemente aplicados (Yemenicioglu *et al.*, 1998).

En el caso específico de la enzima polifenoloxidasas en estado latente (PPO latente), su activación podría contrarrestar el efecto de la inactivación por calor. Esto debido a que el tratamiento térmico puede causar un aumento en la liberación de PPO unidas a la membrana. Dicha liberación puede darse en mayor cantidad si la muestra, previo al tratamiento térmico, no se sometió a algún procedimiento de ruptura de células o alteración de tejidos que permitiera liberar la totalidad de las enzimas. Por lo que al generarse el mecanismo de activación de la enzima se genera una asociación y disociación de proteínas (cambios conformacionales que limpian el polipéptido de extensión, pero protegen el sitio activo de la enzima latente) hasta la transformación de la enzima del estado latente hacia una forma activa transitoria. Dicho comportamiento (activación de la PPO latente por calor) se ha observado en manzana Gloster, uvas, albaricoque, melocotón, aguacate, cáscara de manzana, grano de cacao y otros (Derardja *et al.*, 2017; Cabanes *et al.*, 2007; Yemenicioglu *et al.*, 1998).

En cuanto a las variaciones en las concentraciones de ácido clorogénico y antocianina obtenidas entre los bloques (diferentes fechas de recolección de cosecha), se obtuvo que efectivamente hubo una variación significativa asociada al grado de madurez del fruto, la cual se puede visualizar por medio del cuadro XI y XII, en donde se detallan las concentraciones (mg/g) según los bloques.

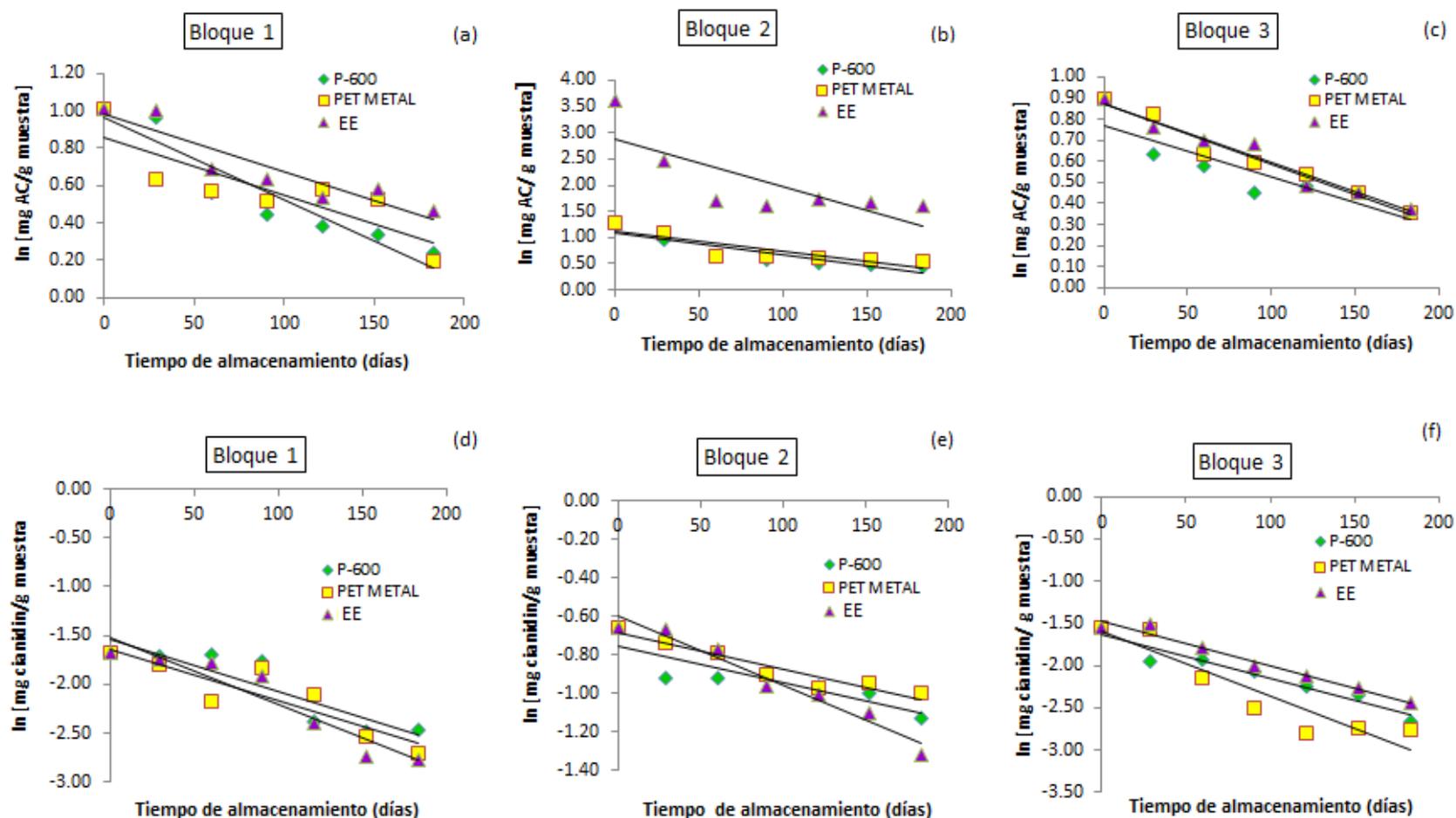
A partir de dichos cuadros se observa que las concentraciones más altas de cada compuesto (para cero meses de almacenamiento) se obtuvieron en el bloque 2, el cual representa el pico de la cosecha donde hay mayor cantidad de café en estado maduro. El resultado obtenido concuerda con lo reportado por Marín & Puerta (2008) en donde los valores más altos de ácido clorogénico se obtuvieron para los granos de café en estado maduro y sobre maduro. De igual manera, concuerda con lo reportado por Puertas *et al.*, (2012) en donde los valores más altos de antocianina se obtuvieron para el fruto del café en estado sobre maduro.

### **5.2.1.3. Cinéticas de degradación de la concentración de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido**

La determinación de los parámetros cinéticos de degradación durante el almacenamiento es de utilidad para predecir los cambios en la concentración de los compuestos de interés. Para ello, se efectuó el ajuste de cada cinética según modelos de reacción de orden cero y orden uno, con el objetivo de determinar el modelo que mejor describe la degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido a través del tiempo.

Es importante destacar que las cinéticas de degradación de compuestos son dependientes de la temperatura, es decir, solamente pueden efectuarse para compuestos expuestos a una misma temperatura (Sánchez, 2015). Por lo tanto, para fines del presente estudio sólo se pudo realizar cinéticas para las condiciones de almacenamiento controladas (CC) durante los primeros seis meses que estuvo a una temperatura de 25 °C (equivalente al almacenamiento a partir de los 0 a 183 días) y los últimos tres meses que estuvo a una temperatura de 22 °C (equivalente al almacenamiento a partir de los 244 a los 292 días). Lo anterior se debe a que en las condiciones reales de almacenamiento (CR), la temperatura durante los primeros seis meses (equivalente a al almacenamiento a partir de los 0 a 183 días) fluctuó de manera significativa y no esperada entre 21-35 °C.

En la figura 8 se muestra gráficamente el modelo ajustado a una cinética con orden de reacción uno. En dicho modelo (orden uno), se representó el logaritmo natural de la concentración en función del tiempo de almacenamiento en días para cada temperatura de almacenamiento. Mientras que para el segundo modelo (orden cero), se efectuó el mismo procedimiento, pero con la concentración en función del tiempo de almacenamiento en días. Seguidamente, en el cuadro XIII, se detalla el análisis de regresión y los criterios de calidad del ajuste obtenidos para cada orden de reacción.



**Figura 8.** Degradación del ácido clorogénico (AC) (a,b,c) y cianidina 3-o-rutinosido (d,e,f) con modelo de cinética de orden uno para la broza de café deshidratada almacenada en condiciones controladas a 25 °C para los diferentes empaques y bloques analizados.

**Cuadro XIII.** Estadística de regresión lineal simple para los modelos de orden cero y uno de la cinética de degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido de la broza de café deshidratada según bloque, empaque y temperatura para las condiciones controladas.

Compuesto	Bloque	Tipo de Empaque	Orden 1						Orden 0					
			T =25 °C			T =22 °C			T =25 °C			T =22 °C		
			r <sup>2</sup>	CME	p	r <sup>2</sup>	CME	P	r <sup>2</sup>	CME	p	r <sup>2</sup>	CME	p
Ácido clorogénico	1	P-600	0,8896	0,1106	0,0014	0,8724	0,2961	0,2326	0,8376	0,2660	0,0038	0,5944	0,0052	0,0206
		PET Metal	0,7303	0,1352	0,0143	0,5944	0,0104	0,4395	0,6924	0,2793	0,0202	0,5944	0,0104	0,4395
		EE	0,8646	0,0882	0,0024	0,4056	0,0109	0,5605	0,8285	0,2165	0,0044	0,5460	0,0138	0,4394
	2	P-600	0,7989	0,1516	0,0067	0,9603	0,0091	0,1277	0,7258	0,4316	0,0146	0,9309	0,0205	0,1693
		PET Metal	0,7324	0,1650	0,0140	0,9925	0,0062	0,1061	0,6970	0,4466	0,0194	0,9943	0,0038	0,0482
		EE	0,6393	0,2032	0,0309	0,9724	0,0047	0,1062	0,6039	0,5237	0,0398	0,9724	0,0070	0,1062
	3	P-600	0,8141	0,0833	0,0054	0,8935	0,0280	0,3003	0,8141	0,0833	0,0054	0,8042	0,0309	0,2918
		PET Metal	0,9735	0,0343	<0,0001	0,9725	0,0062	0,1061	0,9734	0,0343	<0,0001	0,9994	0,0010	0,0148
		EE	0,9663	0,0375	<0,0001	0,8542	0,0309	0,2918	0,9663	0,0375	<0,0001	0,8126	0,0337	0,2850
Cianidina 3-o-rutinosido	1	P-600	0,7647	0,2003	0,0045	0,9999	0,0351	0,0672	0,7849	0,0247	0,0034	0,9997	0,0003	0,0116
		PET Metal	0,8158	0,1804	0,0021	0,9938	0,0265	0,0504	0,8135	0,0210	0,0022	0,9840	0,0019	0,0808
		EE	0,9137	0,1586	0,0002	0,4820	0,0189	0,6815	0,9179	0,0170	0,0002	0,4056	0,0011	0,5605
	2	P-600	0,7560	0,1318	0,0050	0,9780	0,0370	0,2271	0,7964	0,0412	0,0029	0,9021	0,8041	0,2026
		PET Metal	0,9444	0,0409	<0,0001	0,9167	0,0319	0,1863	0,9419	0,0174	<0,0001	0,9265	0,0069	0,1747
		EE	0,9516	0,0754	<0,0001	0,9410	0,0205	0,1693	0,9779	0,0180	<0,0001	0,9362	0,0035	0,1625
	3	P-600	0,9004	0,1778	0,0003	0,6873	0,1422	0,5081	0,9276	0,0154	0,0001	0,5946	0,0014	0,4394
		PET Metal	0,8876	0,2108	0,0005	0,8458	0,1188	0,2569	0,8008	0,0322	0,0027	0,8293	0,0042	0,2712
		EE	0,9740	0,0751	<0,0001	0,9404	0,1414	0,1570	0,9562	0,0128	<0,0001	0,9085	0,0043	0,1956

Nota: Cuadrado Medio del Error (CME).

Con base en los resultados expuestos en el cuadro XIII se obtiene que la degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido siguió una cinética de primer orden para la temperatura de 25 °C (primeros seis meses de almacenamiento) y 22 °C (últimos tres meses de almacenamiento). La afirmación efectuada se basa en que los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) fueron más altos y cercanos a 1 para el modelo de reacción de orden uno en comparación con el de orden cero. Además, los valores del cuadrado medio error (*CME*) fueron más bajos para la cinética de orden uno, lo cual indica que dicha cinética explica con menor error la degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido en cada temperatura de almacenamiento. El orden de reacción de la cinéticas de degradación obtenidas concuerda con lo reportado en la degradación de compuestos fenólicos en la cáscara de manzana (Henríquez *et al.*, 2014), degradación de betacianinas, betaxantinas y vitamina C en jugo de remolacha y miel de abeja (Sánchez *et al.*, 2015), degradación de compuestos fenólicos y antocianinas en una bebida funcional a base de arándano (Torres & Ruiz, 2015), degradación de antocianinas durante el almacenamiento en jugo de arándanos, (Zapata *et al.*, 2016), entre otros.

Ahora bien, partiendo del orden uno para las cinéticas, se procedió a determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento y tipo de empaque en la constante de degradación ( $k$ ) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido presentes en la broza de café deshidratada almacenada en condiciones controladas. Los datos obtenidos y expuestos a través del cuadro XIV evidencian que la constante de degradación ( $k$ ) fue mayor a 25 °C con respecto a 22 °C. Es decir, a mayores temperaturas de almacenamiento se generó una mayor pérdida de la concentración de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido. De igual manera, al aumentar la temperatura, se observó una disminución del tiempo necesario para que la concentración de cada compuesto descendiera a la mitad de su valor inicial ( $t_{1/2}$ ). Es decir, se degrada con mayor rapidez.

**Cuadro XIV.** Efecto de la temperatura de almacenamiento y tipo de empaque en la constante de degradación de primer orden (k) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del ácido clorogénico y cianidin 3-o-rutinosido presentes en la broza de café deshidratada almacenada en condiciones controladas.

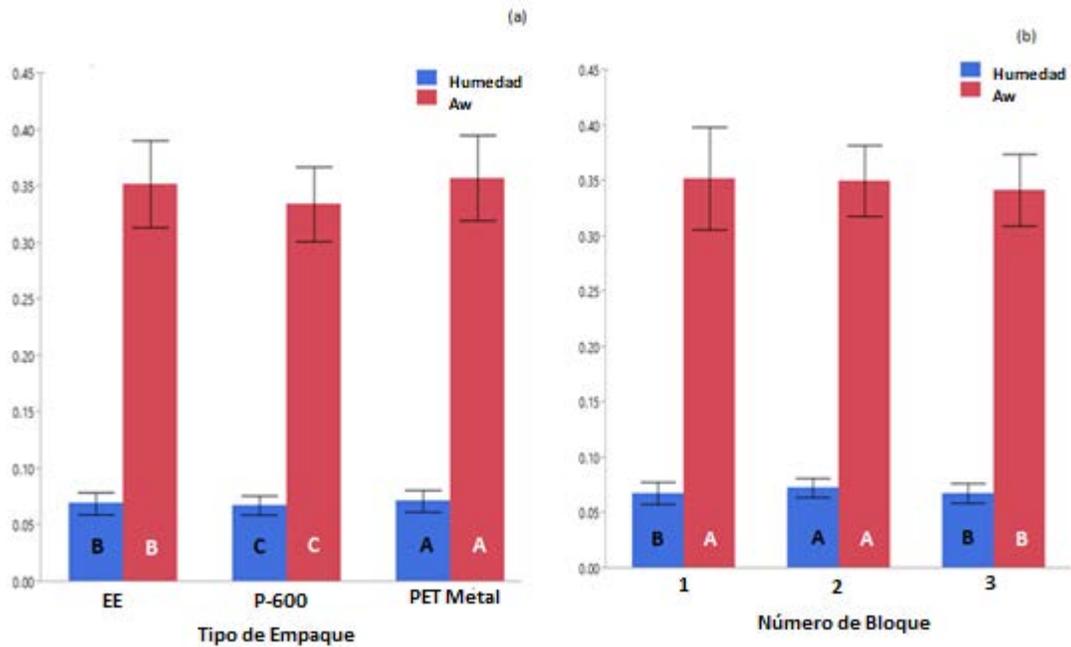
Compuesto	Bloque	Empaque	T =25 °C		T=22 °C	
			k (días <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (días)	k (días <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (días)
Ácido clorogénico	1	P-600	0,0044	158	0,0002	3465
		PET Metal	0,0031	224	0,0003	2310
		EE	0,0031	224	0,0003	2310
	2	P-600	0,0042	165	0,0014	495
		PET Metal	0,0038	182	0,0010	693
		EE	0,0089	78	0,0008	866
	3	P-600	0,0024	289	0,0015	462
		PET Metal	0,0029	239	0,0011	630
		EE	0,0028	248	0,0017	408
Cianidin 3-o-rutinosido	1	P-600	0,0054	128	0,0097	71
		PET Metal	0,0053	131	0,0099	70
		EE	0,0069	100	0,0004	1733
	2	P-600	0,0019	365	0,0029	239
		PET Metal	0,0019	365	0,0029	239
		EE	0,0036	193	0,0024	289
	3	P-600	0,0052	133	0,0041	169
		PET Metal	0,0077	90	0,0082	85
		EE	0,0053	131	0,0163	43

### 5.2.2 Variaciones en el contenido de humedad y actividad del agua ( $a_w$ )

La humedad en base seca presentó diferencias significativas para los factores simples, el bloque ( $p < 0,0001$ ), tiempo de almacenamiento ( $p < 0,0001$ ), condición de almacenamiento ( $p < 0,0001$ ) y tipo de empaque ( $p < 0,0001$ ) como factores simples. Además, únicamente la interacción entre el tiempo y condición de almacenamiento presentó diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ). El mismo comportamiento se obtuvo para la actividad del agua.

Al aplicar la prueba Tukey (figura 9), se obtuvo que para las dos variables respuesta (humedad y  $a_w$ ) los tres tipos de empaques fueron significativamente distintos entre sí,

siendo el empaque P-600 el que menor variaciones permitió, seguido por el EE y por último el PET Metal. El bloque 3 presentó un  $a_w$  significativamente menor a los bloques 1 y 2, mientras que la humedad fue mayor en el bloque 2, en comparación con los bloques 1 y 3.

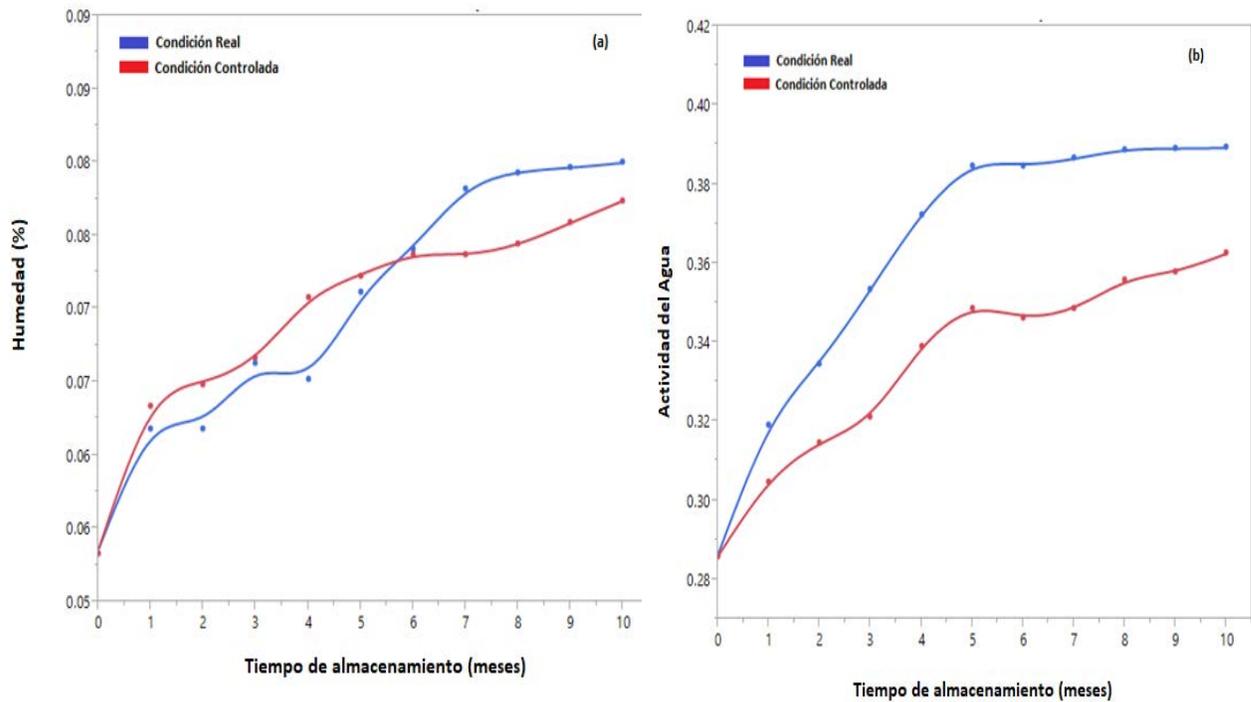


**Figura 9.** Variación de la humedad en base seca y actividad del agua de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque (a) y bloque (b). Se reporta con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza en los valores de  $a_w$  y humedad, respectivamente.

Lo observado por medio de la figura 9 se debe a que la permeabilidad real (difusión activa de gases y vapores) de los empaques varía inversamente al espesor del material, por lo que dicha permeabilidad no se logra eliminar de manera efectiva al aumentar el grosor de los empaques. Por este motivo se siguen observando infiltraciones en el empaque los cuales aumentan la actividad del agua y su humedad (Cipriani, 2016).

En cuanto a la interacción entre el factor tiempo y condición de almacenamiento, la figura 10 muestra el comportamiento obtenido para la humedad y  $a_w$ . En dicha figura se

puede notar que, a lo largo del estudio de almacenamiento se generó un aumento sostenido, el cual fue mayor en condiciones reales con respecto a las condiciones controladas.



**Figura 10.** Variación de la humedad en base seca (a) y actividad del agua (b) de la broza de café deshidratada almacenada en condiciones reales y condiciones controladas a través del tiempo de almacenamiento.

Adicionalmente, al analizar las regresiones lineales según condición y tiempo de almacenamiento, se obtuvo que las condiciones controladas generaron el menor aumento de humedad y actividad del agua en función del tiempo, debido que la pendiente fue más pequeña para las dos variables respuesta analizadas. Dicho comportamiento se desprende de los valores estimados expuestos por medio del cuadro XV, los cuales concuerdan con lo reportado por Saavedra et al., (2013) en chips de manzana deshidratados, ya que el incremento de la humedad es directamente proporcional a la temperatura de almacenamiento. Esto tomando en consideración que en las condiciones reales se alcanzaron temperaturas máximas de 35 °C durante los primeros seis meses de almacenamiento, lo cual hizo que las propiedades de barrera de los empaques decrecieran

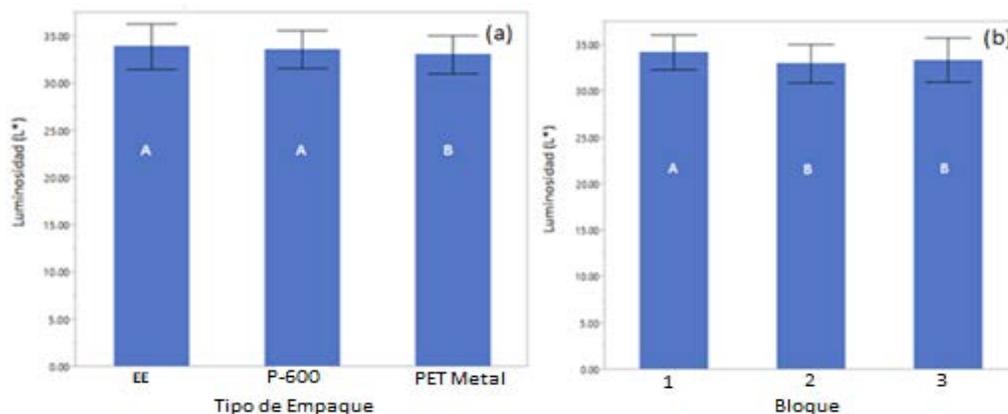
en mayor medida en comparación con las condiciones controladas, y por ende se incrementara la migración gradual de humedad dentro del empaque

**Cuadro XV.** Pendiente e intercepto obtenidos mediante regresión lineal de la variación de la humedad y actividad del agua según condición y tiempo de almacenamiento para la broza de café deshidratada.

Variable respuesta	Condición de Almacenamiento					
	Real			Controlada		
	Pendiente	Intercepto	R <sup>2</sup>	Pendiente	Intercepto	R <sup>2</sup>
Humedad	0,0026	0,0569	0,66	0,0019	0,0598	0,53
Actividad del agua	0,0009	0,3153	0,53	0,0007	0,2995	0,61

### 5.2.3 Variaciones en el color por método instrumental

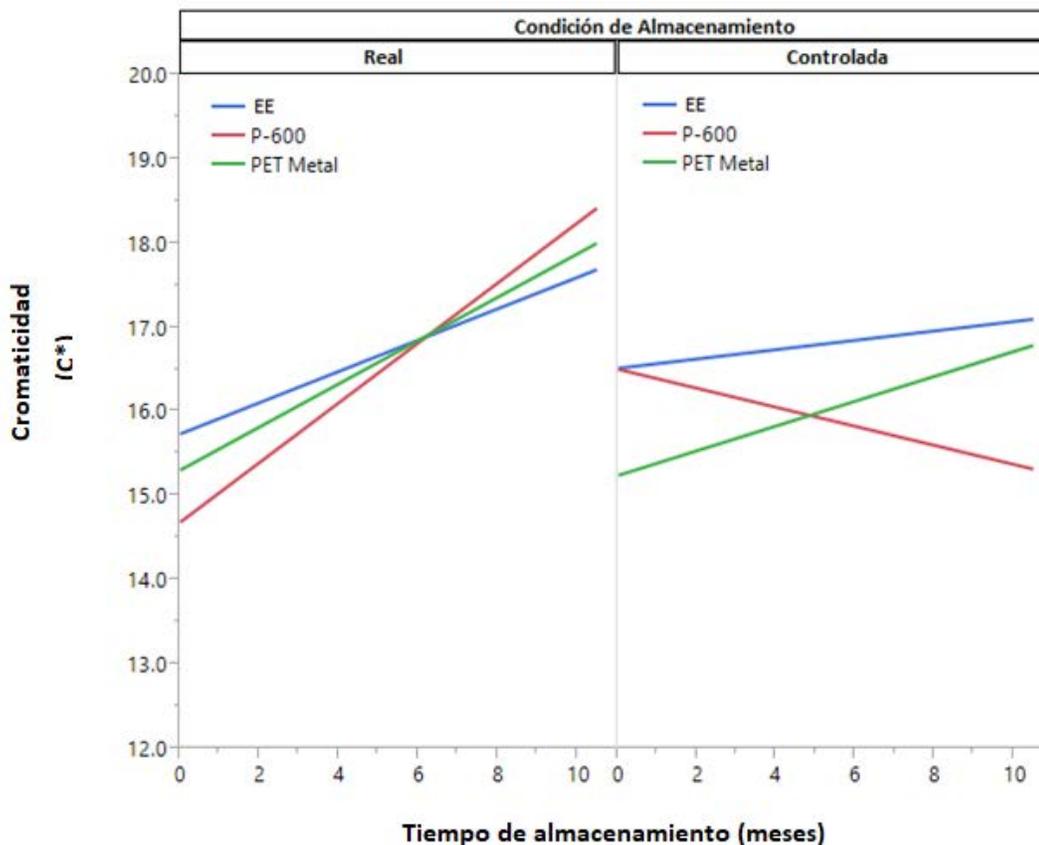
Para la variable luminosidad (L\*) se obtuvo que los factores simples que presentaron diferencias significativas fueron el tipo de empaque (p= 0,0002) y el bloque (p≤0,0001). El empaque PET Metal fue significativamente diferente con respecto a los empaques EE y P-600. Asimismo, se obtuvo que el bloque 1 fue diferente con respecto a los bloques 2 y 3. Los resultados mencionados se muestran en la figura 11.



**Figura 11.** Variación de la luminosidad (L\*) de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque (a) y bloque (b). Se reportan con letras distintas la presencia de diferencias significativas con un 95 % de confianza en los valores de luminosidad.

Para la cromaticidad ( $C^*$ ) se obtuvo que el bloque ( $p \leq 0,0001$ ), tiempo de almacenamiento ( $p \leq 0,0001$ ), tipo de empaque ( $p=0,0031$ ) y condición de almacenamiento ( $p=0,0137$ ) presentaron diferencias significativas como factores simples. Al aplicar la prueba de Tukey se obtuvo que los tres bloques fueron diferentes entre sí, siendo el bloque 1 el de la mayor cromaticidad. De igual manera, al analizar la interacción entre factores, se obtuvo que para la cromaticidad, hubo diferencias significativas para el tiempo de almacenamiento y condición de almacenamiento ( $p \leq 0,0001$ ); y tiempo, tipo de empaque y condición de almacenamiento ( $p=0.0007$ ). Esta última interacción triple se encuentra representada mediante la figura 12.

Para las condiciones de almacenamiento reales, la cromaticidad, al inicio del tiempo de almacenamiento en el empaque PET Metal fue menor, pero para el final del almacenamiento fue la mayor. Mientras que en el empaque EE inició con la mayor cromaticidad y al final del almacenamiento fue la menor. En general, se observó que la cromaticidad aumentó, lo que no ocurrió con la condición controlada, donde el empaque P-600 disminuyó. Pero, en los otros dos empaques hubo un aumento de cromaticidad al aumentar el tiempo, aunque no tan pronunciado como con las condiciones reales, es decir el color se hizo más puro (menos mezclado con grises).

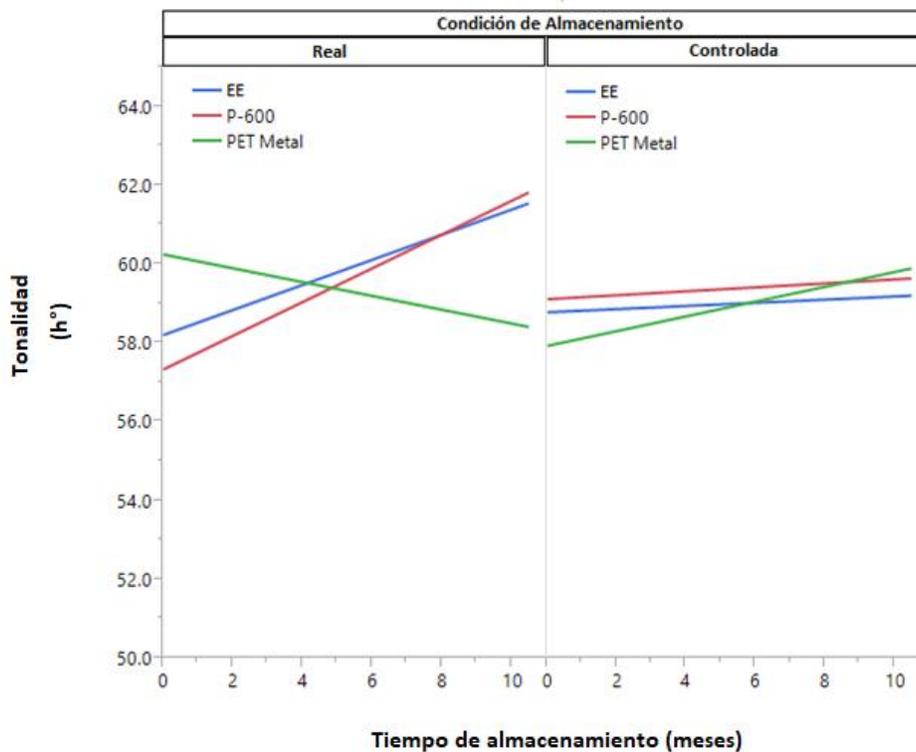


**Figura 12.** Variación de la cromaticidad ( $C^*$ ) de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento.

Para la variable tono ( $h^\circ$ ) se obtuvo diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento ( $p = 0,0004$ ) y el bloque ( $p < 0,0001$ ) como factores simples, siendo el bloque dos el que presentó mayor pérdida de tonalidad, seguido por el 2 y 1. Mientras que las interacciones entre factores que presentaron diferencias significativas fueron el tiempo de almacenamiento y tipo de empaque ( $p=0,0436$ ); y el tipo de empaque, tiempo de almacenamiento y condición de almacenamiento ( $p= 0,0002$ ). Esta última interacción triple se encuentra representada mediante la figura 13.

En las condiciones controladas, el empaque PET Metal mantuvo un color más cercano al rojo conforme avanzó el tiempo de almacenamiento, caso contrario a los otros dos empaques. Además, el empaque PET Metal en condiciones reales permitió una mayor

velocidad de pérdida de la tonalidad que los otros dos empaques, yendo hacia un color menos rojo. Siendo el cambio de tonalidad menor en la condición de almacenamiento controlado.

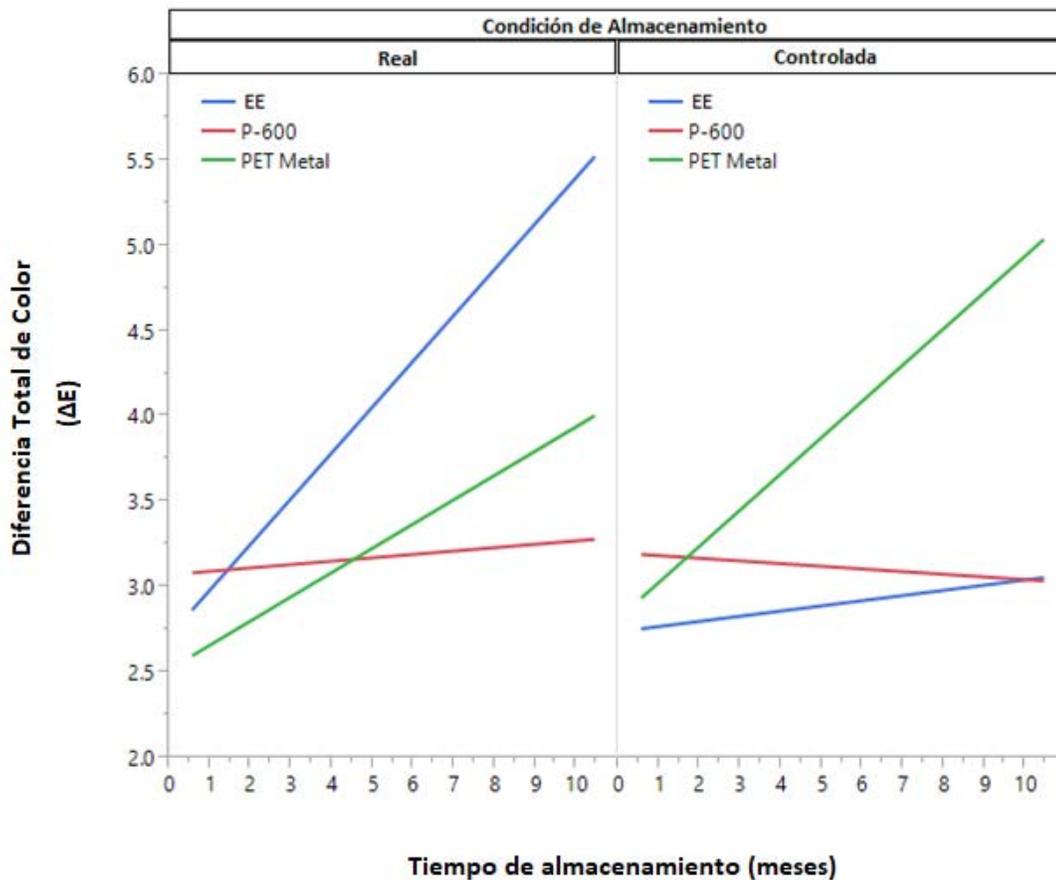


**Figura 13.** Variación de la tonalidad ( $h^\circ$ ) de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento.

Por lo tanto, con base en lo mencionado con anterioridad se obtuvo que la luminosidad ( $L^*$ ) y la tonalidad ( $h^\circ$ ) de la broza de café deshidratada fueron menores en el empaque PET Metal y en el bloque dos. Mientras que la pureza del color (cromaticidad) se mantuvo similar en los tres empaques, pero fue ligeramente menor en las condiciones controladas con respecto a las condiciones actuales. Además, los tres parámetros evaluados ( $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $C^*$ ) evidenciaron una disminución conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento.

Ahora bien, para la diferencia total de color ( $\Delta E$ ) a nivel instrumental, se obtuvo que el bloque ( $p=0,0002$ ), tiempo de almacenamiento ( $p<0,0001$ ) y tipo de empaque ( $p=0,0096$ )

presentaron diferencias significativas como factores simples. Además, se obtuvieron diferencias significativas entre la interacción de los siguientes factores: tiempo de almacenamiento \* tipo de empaque ( $p=0,0075$ ), tipo de empaque \* condición de almacenamiento ( $p= <0,0001$ ) y tiempo de almacenamiento \* tipo de empaque \* condición de almacenamiento ( $p= 0,0332$ ). Esta última interacción triple se encuentra representada mediante la figura 14.



**Figura 14.** Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) a nivel instrumental de la broza de café deshidratada en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento.

Las variaciones de color ocurrieron en las condiciones controladas para el empaque EE, y las menores para el empaque P-600. Mientras que en condiciones controladas la

diferencia total de color fue mayor en el empaque PET Metal y los empaques restantes variaron poco.

Adicionalmente, al analizar las regresiones lineales según condición y tiempo de almacenamiento para la cromaticidad ( $C^*$ ), tonalidad ( $h^\circ$ ) y diferencia total de color ( $\Delta E$ ) como variables respuesta, se obtuvo que a nivel general las condiciones controladas fueron las que permitieron la menor pérdida de cada variable. Dicha aseveración se efectúa con base en las pendientes expuestas por medio del cuadro XVI, las cuales son menores para las condiciones controladas y los tres tipos de empaque analizados. Es decir, un aumento de temperatura, aunque sea por un tiempo corto, afectó el color de la broza de café.

**Cuadro XVI.** Pendiente e intercepto obtenidos mediante regresión lineal de la variación de la cromaticidad ( $C^*$ ), la tonalidad ( $h^\circ$ ) y diferencia total de color ( $\Delta E$ ) a nivel instrumental en función del tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento para la broza de café deshidratada.

Variable respuesta	Tipo de Empaque	Condición de Almacenamiento			
		Real		Controlada	
		Pendiente	Intercepto	Pendiente	Intercepto
Cromaticidad ( $C^*$ )	EE	0,1857	15,74	0,0554	16,52
	P-600	0,3549	14,69	-0,1129	16,51
	PET Metal	0,2565	15,31	0,1470	15,25
Tonalidad ( $h^\circ$ )	EE	0,3179	58,21	0,0399	58,79
	P-600	0,4278	57,33	0,0499	59,12
	PET Metal	-0,1751	60,25	0,1871	57,94
Diferencia total de color instrumental ( $\Delta E$ )	EE	0,2684	2,72	0,0303	2,73
	P-600	0,01978	3,08	-0,0157	3,23
	PET Metal	0,1421	2,52	0,2122	2,82

#### 5.2.4 Evaluación de la inocuidad de la broza de café

Por medio del cuadro XVII se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de *Salmonella* sp. en las muestras de broza de café deshidratada recién generada, es decir, con

cero meses de almacenamiento. El análisis previo al proceso de almacenamiento se efectuó con el objetivo de determinar la inocuidad del alimento y, a su vez, establecer si la broza podía ser sometida a estudio por medio de paneles sensoriales.

**Cuadro XVII.** Análisis de *Salmonella* sp. en broza de café deshidratada con cero meses de almacenamiento y en tres diferentes fechas de recolección (bloques).

Técnica Microbiológica	Tiempo de Almacenamiento	Bloque (fecha de recolección)	Resultados	Límite máximo permitido <sup>1</sup>
Ausencia/ Presencia <i>Salmonella</i> sp.	Cero meses	1	Ausencia	Ausencia/25 g
		2	Ausencia	
		3	Ausencia	

Fuente: (RTCA, 2009)<sup>1</sup>

Con base en el cuadro XVII se obtiene que la broza de café deshidratada se encuentra exenta de *Salmonella* sp. para los tres bloques (fechas de recolección de cosecha) analizados. Por lo tanto, sí se cumple con la normativa estipulada por el Reglamento Centroamericano (2009) en cuanto a que debe haber ausencia de dicho patógeno para poder ser consumido sin causar enfermedad. Además, en la sección 6.3 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de coliformes fecales, por lo que con base en dichos resultados se concluyó que la broza podía ser sometida a análisis sensoriales mediante el uso de las metodologías previamente determinadas.

### 5.2.5 Variaciones en el color y sabor por método sensorial

En el cuadro XVIII y XIX se muestran los valores obtenidos de la diferencia percibida ( $d'$ ) para el sabor y color, respectivamente, de la broza de café deshidratada analizada con cero meses de almacenamiento, en comparación con 2, 4, 6 y 8 meses de almacenamiento según condiciones de almacenamiento y tipo de empaque utilizado. Para las muestras en las que no se reporta el valor de  $d'$  prima se debe a que dicho valor no fue posible calcularlo debido a que la proporción de aciertos fue menor a 0,5 (probabilidad = 1/2) que es la probabilidad que se obtiene de acertar al azar para la prueba 2-AFC (Roessler *et al.*, 1978), y es el valor  $d'= 0$ .

**Cuadro XVIII.** Valores de d' (d-prima) y probabilidades exactas ( $\alpha$ ) obtenidas para el análisis de las variaciones en el sabor durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada mediante pruebas de diferenciación 2-AFC con 30 jueces.

Tiempos comparados (meses)	Bloque	EE		PET Metal		P-600	
		Real	Controlada	Real	Controlada	Real	Controlada
<b>0 vs 2</b>	1	0,25 (0,585)	1,82 ( <0,001)	0,47 (0,200)	0,51 (0,362)	1,35 ( <0,001)	0,47 (0,200)
<b>0 vs 4</b>		0,87 (0,016)	1,05 (0,005)	1,15 (0,005)	1,05 (0,005)	1,35 ( <0,001)	0,88 (0,016)
<b>0 vs 6</b>		1,82 ( <0,001)	1,60 ( <0,001)	2,66 ( <0,001)	0,75 (0,043)	0,47 (0,200)	0,11 (0,856)
<b>0 vs 8</b>		5,19 ( <0,001)	0,75 ( <0,001)	2,66 ( <0,001)	1,6 ( <0,001)	1,20 (0,001)	1,35 ( <0,001)
<b>0 vs 2</b>	2	1,82 ( <0,001)	1,50 (0,856)	0,11 (0,856)	0,11 (0,856)	0,63 (0,099)	0,11 (0,856)
<b>0 vs 4</b>		2,10 ( <0,001)	0,59 (0,099)	1,60 ( <0,001)	1,60 ( <0,001)	2,10 ( <0,001)	1,35 ( <0,001)
<b>0 vs 6</b>		2,09 ( <0,001)	1,82 ( <0,001)	2,66 ( <0,001)	2,09 ( <0,001)	2,09 ( <0,001)	2,66 ( <0,001)
<b>0 vs 8</b>		0,47 ( <0,001)	5,19 ( <0,001)	1,60 ( <0,001)	2,66 ( <0,001)	0,62(0,099)	1,35( <0,001)
<b>0 vs 2</b>	3	1,05 (0,005)	1,19 (0,001)	1,05 (0,005)	1,19 (0,001)	0,51 (0,200)	1,82 ( <0,001)
<b>0 vs 4</b>		1,60 ( <0,001)	2,09 (0,001)	0,11 (0,453)	0,11 (0,856)	1,05 ( <0,001)	1,05 (0,005)
<b>0 vs 6</b>		1,60 ( <0,001)	0,47 (0,200)	0,62 (0,099)	0,63 (0,099)	0,47 (0,200)	0,75(0,043)
<b>0 vs 8</b>		1,05 (0,005)	1,60 ( <0,001)	1,99 ( <0,001)	1,19 (0,001)	0,47 (0,200)	0,59 (0,099)

Nota: Valores entre paréntesis corresponden a las probabilidades exactas. Valores entre paréntesis y en negrita corresponden a las probabilidades exactas que presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Valores con casilla sombreada representan las muestras a diferentes tiempos de almacenamiento ( $t \neq 0$  meses) con mayor cantidad de aciertos que fueron identificadas como la del sabor más intenso (mayor conservación del sabor) en comparación con la muestra con cero meses almacenada a  $-40^\circ\text{C}$ .

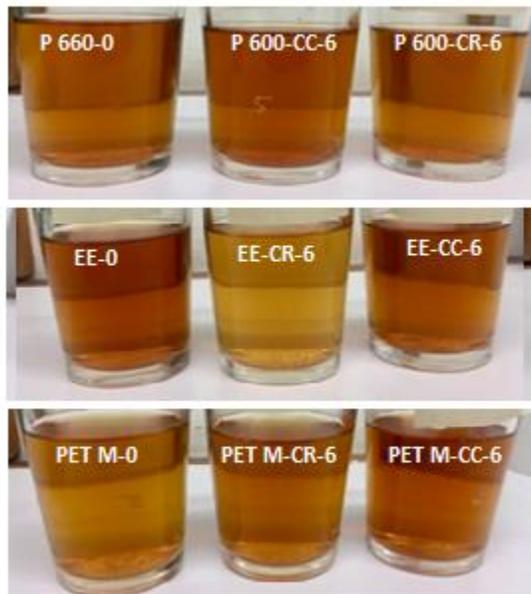
**Cuadro XIX.** Valores de d' (d prima) y probabilidades exactas ( $\alpha$ ) obtenidas para el análisis de las variaciones en el color durante el almacenamiento de la broza de café deshidratada mediante prueba 2-AFC.

Tiempo comparados (meses)	Bloque	EE		PET Metal		P-600	
		Real	Controlada	Real	Controlada	Real	Controlada
0 vs 2	1	2,66 (<0,001)	1,05 (0,005)	1,05 (0,005)	1,05 (0,005)	2,66 (<0,001)	2,66 (<0,001)
0 vs 4		2,66 (<0,001)	2,09 (<0,001)	0,63 (0,099)	2,66 (<0,001)	1,82 (<0,001)	1,19 (0,001)
0 vs 6		5,19 (<0,001)	0,47 (0,200)	5,19 (<0,001)	2,66 (<0,001)	1,32 (<0,001)	5,19 (<0,001)
0 vs 8		1,19 (0,001)	2,09 (<0,001)	0,00 (>0,856)	0,47 (0,200)	0,63 (0,099)	5,19 (<0,001)
0 vs 2	2	1,19 (0,001)	2,66 (<0,001)	1,19 (0,001)	5,19 (<0,001)	0,51 (0,362)	5,19 (<0,001)
0 vs 4		5,19 (<0,001)	5,19 (<0,001)	2,09 (<0,001)	0,11 (0,856)	5,19 (<0,001)	5,19 (<0,001)
0 vs 6		0,11 (0,856)	5,19 (<0,001)	0,47 (0,200)	0,62 (0,099)	0,36 (0,362)	5,19 (<0,001)
0 vs 8		5,19 (<0,001)	5,19 (<0,001)	2,66 (<0,001)	0,36 (0,362)	2,09 (<0,001)	0,75 (0,043)
0 vs 2	3	5,19 (<0,001)	1,82 (<0,001)	1,60 (<0,001)	5,19 (<0,001)	0,00 (>0,856)	5,19 (<0,001)
0 vs 4		5,19 (<0,001)	0,87 (0,016)	5,19 (<0,001)	1,15 (0,016)	0,75 (0,043)	5,19 (<0,001)
0 vs 6		5,19 (<0,001)	1,19 (0,001)	5,19 (<0,001)	5,19 (<0,001)	1,82 (<0,001)	2,09 (<0,001)
0 vs 8		2,66 (<0,001)	2,66 (<0,001)	0,36 (0,362)	1,35 (<0,001)	1,60 (<0,001)	2,66 (<0,001)

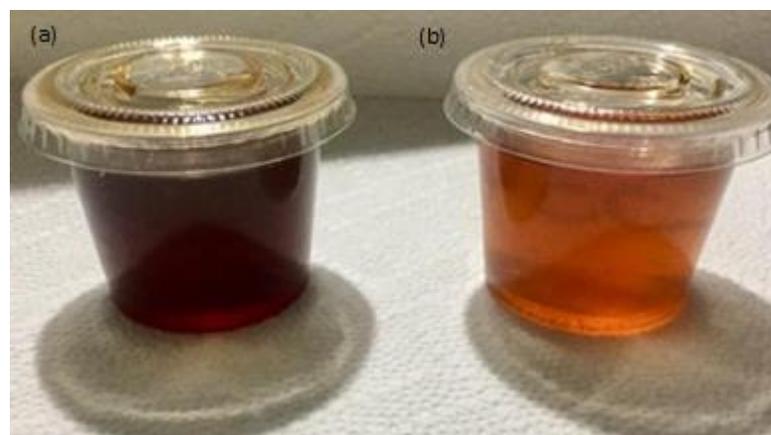
Nota: Valores entre paréntesis corresponden a las probabilidades exactas. Valores entre paréntesis y en negrita corresponden a las probabilidades exactas que presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Valores con casilla sombreada representan las muestras a diferentes tiempos de almacenamiento ( $t \neq 0$  meses) que fueron identificadas como la del atributo (color) más intenso en comparación con la muestra con cero meses almacenada a  $-40^{\circ}\text{C}$

De acuerdo con los resultados expuestos a través de los cuadros anteriores, se obtiene que, para los dos atributos evaluados, los panelistas lograron identificar, para la mitad de los casos, las muestras a diferentes tiempos de almacenamiento como las que poseían el atributo más intenso en sabor y con la coloración rojo-violeta más intensa. Dicho comportamiento no era lo esperado debido a que la muestra a cero meses de almacenamiento se conservó a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar que se generaran reacciones de degradación que afectarán el color y sabor de la broza, por lo que se esperaba que fuera identificada como la muestra con el atributo más intenso. No obstante, a través de los paneles sensoriales se pudo notar que la muestra a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  también se fue degradando conforme se aumentaba el tiempo de almacenamiento. Esto se puede atribuir a la posible presencia de enzimas, específicamente a la polifenoloxidasas (puede estar en forma latente o activa) la cual reacciona con los compuestos fenólicos y produce quinonas. Estos últimos compuestos son altamente reactivos por lo que pueden polimerizarse espontáneamente hasta formar pigmentos marrones no deseados asociados con la pérdida de calidad y pérdida nutricional debido a una disminución en la capacidad antioxidante. (Derardja *et al.*, 2017). Hernández & Briceño (2008) observaron que muestras de puré de aguacate almacenados en congelación ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y tratados con y sin aditivos, presentaron pérdida de atributos de color por un aumento de la concentración de la PPO en forma activa, lo cual fue atribuido a la transformación paulatina de la PPO latente a PPO activa. En la broza de café se realiza un proceso de inactivación; sin embargo, se requieren más estudios para entender este comportamiento.

En las figuras 15, 16 y 17 se muestran los colores obtenidos para las muestras de infusión de broza de café utilizadas durante la evaluación sensorial. Así como también, la degradación de color observada en la broza de café deshidratada para la muestra control (almacenada a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y las muestras con 6 meses de almacenamiento en condiciones reales y controladas.



**Figura 15.** Infusiones de broza de café deshidratada utilizadas para la evaluación sensorial del color y sabor durante cero meses de almacenamiento a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (P600-0, EE-0 y PET M-0) y seis meses de almacenamiento en condiciones controladas (CR-6) y condiciones reales (CC-6), para los 3 tipos de empaques.



**Figura 16.** Degradación del color observada en muestras de infusión de broza de café deshidratada previo (b) y posterior (a) a la evaluación sensorial.



**Figura 17.** Cambios en la coloración de la broza de café deshidratada almacenadas en empaque P-600 durante cero meses (a), diez meses en condiciones reales (b) y diez meses en condiciones controladas (c).

Ahora bien, al analizar, a nivel general los resultados, se observa en el cuadro XVIII y XIX que el valor  $d'$  de cada condición de almacenamiento fue mayor para el lote 2 (el que tenía mayor maduración). Además, el lote 3 fue el que presentó mayor escogencia de la muestra almacenada como la más intensa con los  $d'$  más bajos en cualquier condición. Aunado a ello, se pudo observar que los valores  $d'$  de los meses 2 y 4 fueron menores que la del mes 6, para cualquier condición. Y, los valores  $d'$  del empaque P-600 en condición controlada fueron los más pequeños y donde se escogió en mayor cantidad de veces la muestra congelada (el control de mes cero) como la más intensa.

Adicionalmente, con los valores de  $d'$  reportados en los cuadros XVIII y XIX, se observa que la mayoría no fueron cercanos o menores a uno, por lo que los estímulos no fueron confundibles. Es decir, la diferencia entre los estímulos fue notoria y, por ende, no era justificable continuar aplicando pruebas de discriminación a los 10 meses de almacenamiento (Worsch & Delscher, 2013). En casi la mitad de las comparaciones se escogió las muestras con diferentes tiempos de almacenamiento como las más fuertes en el color rojo-violeta, lo cual indicaba un deterioro de la muestra en congelación, que se consideraba que no iba a cambiar de color.

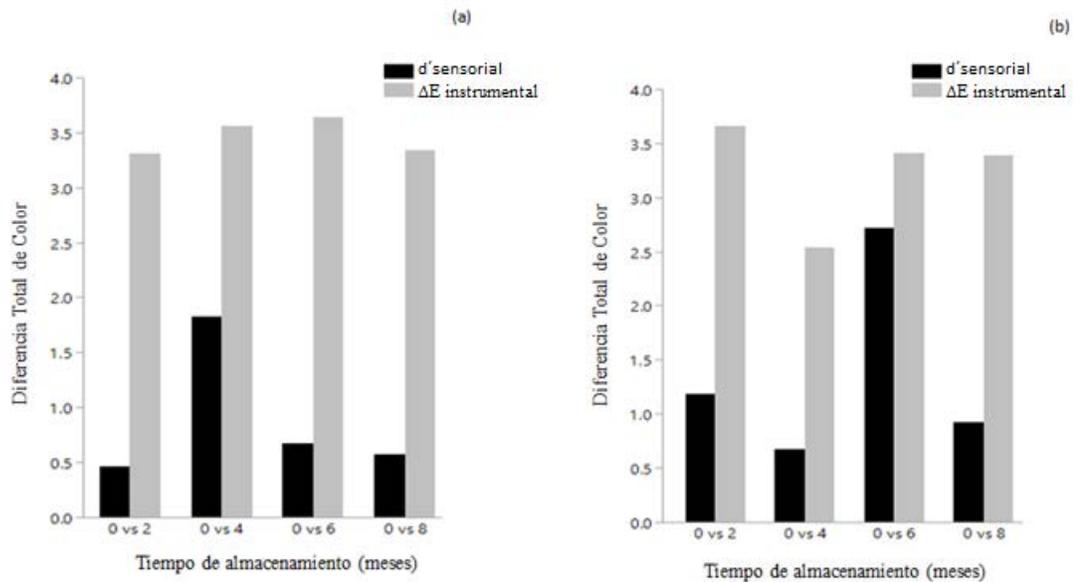
Es importante destacar que, en la evaluación del sabor, el empaque P-600, seguido por el PET Metal, fue el que presentó valores  $d'$  más bajos; sin embargo, la mayoría de dichos valores fueron mayores a uno. No obstante, en comparación con los otros empaques (EE y PET Metal), el empaque P-600 fue el que permitió una menor pérdida del sabor en la

broza de café (para el color, los tres empaques analizados reportaron valores de  $d'$  notoriamente altos, lo cual implicaba que ningún empaque permitió conservar adecuadamente los pigmentos responsables del color en la broza de café deshidratada). Adicionalmente, es importante destacar que es posible que la muestra a tiempo cero o inicial estuviera un poco deteriorada desde el inicio del estudio, por lo que se dicha degradación se aceleró con el almacenamiento.

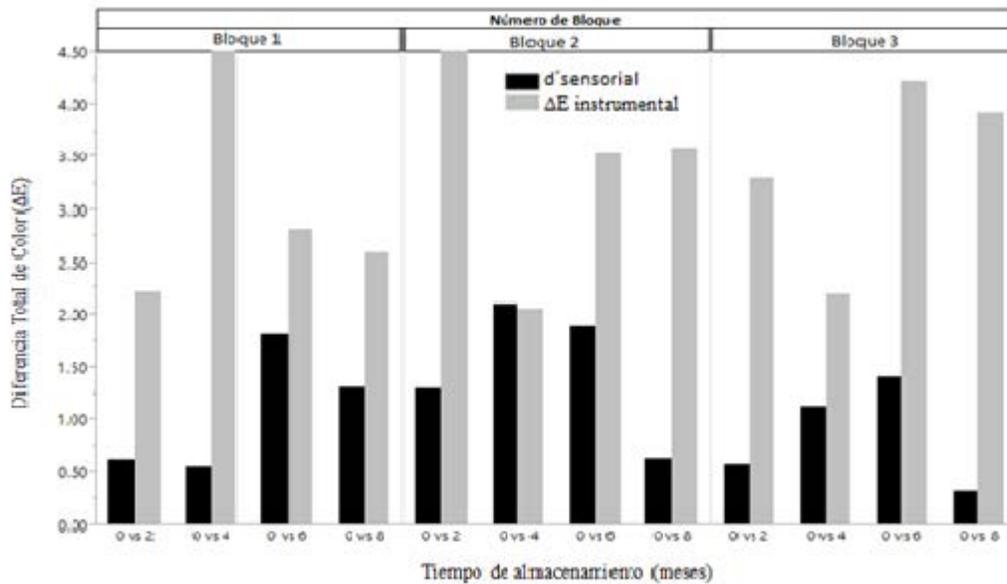
La condición controlada generó valores de  $d'$  menores (menos cambios) en la mayoría de los casos en comparación con las condiciones controlada para el empaque EE; mientras que en el empaque PET Metal las dos condiciones de almacenamiento deterioraron en bastante medida la broza. Interesantemente, para el empaque P-600 la condición real generó menos cambios sensoriales que la real. También los valores de  $d'$  fueron cercanos a 1 en este último caso a los 4 meses.

#### **5.2.6 Relación entre las diferencias de color perceptibles obtenidas mediante método instrumental y sensorial**

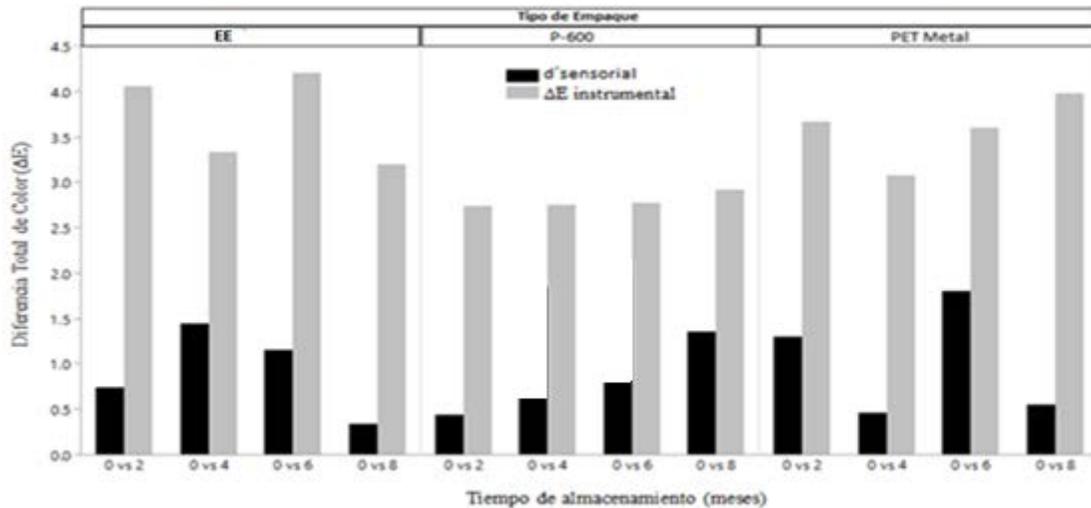
Por medio de las figuras 18, 19 y 20 se muestra la diferencia total de color obtenida por métodos sensoriales ( $d'$ ) e instrumentales ( $\Delta E$ ), según condiciones de almacenamiento, tipo de empaque y bloque respectivamente. La diferencia sensorial se obtuvo mediante el uso de los valores  $d'$  ( $d'$ -prima) obtenidos por medio de pruebas 2-AFC para color con 30 panelistas y 2 colas.



**Figura 18.** Comparación de la diferencia total de color obtenido por método sensorial ( $d'$ ) e instrumental ( $\Delta E$ ) de la broza de café deshidratada almacenada en condiciones reales (a) y en condiciones controladas (b).



**Figura 19.** Diferencia total de color obtenido por método sensorial ( $d'$ ) e instrumental ( $\Delta E$ ) de la broza de café deshidratada almacenada en diferentes tipos de empaque.



**Figura 20.** Diferencia total de color obtenido por método sensorial ( $d'$ ) e instrumental de la broza de café deshidratada correspondiente a cada fecha de recolección de cosecha (bloque).

Con base en las figuras 18,19 y 20 se observa que la diferencia total de color medido a nivel instrumental fue distinto y mayor con respecto al obtenido por medio de métodos sensoriales. Esto se debe a que la percepción de color es única para cada individuo y, por ende, lo es su capacidad para identificar variaciones en el color. En el caso de los métodos instrumentales, se efectúan correcciones según iluminación y respuesta visual humana. Es decir, se logra relacionar los términos subjetivos con los objetivos (Mac Dougall, 2002). Además por su propia naturaleza, el instrumento capta variaciones pequeñas que generan estas diferencias, mientras que el ser humano integra todos los parámetros de color captando menores cambios. Esta comparación es importante para demostrar que tomar en cuenta solamente la variación instrumental no implica que el ser humano la vaya a percibir.

En general, se puede ver que en las condiciones controladas, en el empaque P-600 y en el bloque 2 se dieron las mayores variaciones de color sensoriales, lo cual podría indicar que la muestra almacenada cambió más que la muestra en congelación.

### **5.2.7 Condiciones de almacenamiento y tipo de empaque seleccionado para la mayor conservación de los compuestos fenólicos**

Con base en los resultados expuestos con anterioridad se considera que las condiciones reales de almacenamiento fueron más favorables para la conservación de cianidina 3-o-rutinosido y ácido clorogénico, en conjunto con los demás parámetros evaluados. No obstante, se requiere implementar métodos que permitan estabilizar la temperatura en el almacén para evitar que temperaturas altas que se dan por variaciones intrínsecas de la zona afecten de manera significativa la estructura de los empaques (propiedades de barrera) y, por ende, las condiciones de la broza de café deshidratada. Esto debido a que a partir del mes cinco se evidenció mayor deterioro en las muestras, lo cual pudo estar relacionado principalmente con las condiciones de procesamiento y no de almacenamiento de la broza de café deshidratada. Esto si se toma en consideración la posible presencia de reactivación de enzimas con capacidad de deteriorar el producto.

Aunado a ello, se considera que el empaque P-600 tuvo un mejor desempeño en la conservación de las características de interés analizadas (variables respuesta) a lo largo del estudio de almacenamiento. No obstante, el empaque EE, tuvo un desempeño efectivo y comparable con el empaque P-600. Es por lo que se recomienda realizar pruebas de producción de bolsas, según dimensiones requeridas por el proveedor, para determinar si el empaque P-600 con un tamaño de bolsa mayor se ve afectado estructuralmente. Esto último tomando en consideración que al aumentar el tamaño de la bolsa se está incrementando el área superficial, lo cual a su vez puede ir en detrimento de las propiedades de barrera del empaque.

### **5.3 Determinación de la estabilidad microbiológica de la broza de café deshidratada en función de las variaciones de la temperatura y tipo de empaque**

Como parte del estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada, se procedió a efectuar tres análisis microbiológicos para determinar si a lo largo del periodo y condiciones de almacenamiento se generó una disminución de la calidad microbiológica de la broza. Para ello se efectuó análisis de recuentos totales de mohos y levaduras, recuento de coliformes totales y coliformes fecales a la broza con cero y diez meses de almacenamiento, con el fin de determinar el crecimiento logarítmico de dichos microorganismos.

En el caso específico de los coliformes fecales, no se observó crecimiento en placa a los cero y diez meses de almacenamiento, para los tres bloques de cosecha y los tres tipos de empaque analizados. A partir de este resultado no se realizó la determinación del crecimiento logarítmico para dicho análisis. Motivo por el cual en el cuadro A.11 (sección 9.10 de los anexos) se puede notar que se reportó el resultado como <10 UFC coliformes fecales /g de muestra debido a la sensibilidad del método. Esto es lo que se espera en un alimento para consumo humano inocuo, ya que indica que no hay contaminación fecal.

Ahora bien, en el cuadro A.12 (sección 9.10 de los anexos) se detallan los crecimientos logarítmicos (Log UFC/g) de mohos y levaduras y coliformes totales en función de la condición de almacenamiento (CR o CC), tipo de empaque (EE, P-600 y PET Metal) y el bloque (1, 2 y 3), al cual pertenece la cosecha de broza de café deshidratada. Por medio del análisis estadístico de dichos resultados se obtuvo que para el crecimiento logarítmico de mohos y levaduras (Log UFC/g) no se presentaron diferencias significativas para el bloque ( $p = 0,2883$ ), tipo de empaque ( $p = 0,2711$ ), condición de almacenamiento ( $p = 0,2950$ ), tiempo ( $p = 0,2540$ ) ni para la interacción entre el tipo de empaque y condición de almacenamiento ( $p = 0,3831$ ). Esto indica que el empaque no afectó el crecimiento de mohos y levaduras, al igual que no afectó la condición de almacenamiento y tampoco hubo aumento significativo durante los en 10 meses de almacenamiento. Mientras que para el crecimiento logarítmico de coliformes totales (Log UFC/g), se obtuvo que únicamente la condición de almacenamiento como factor simple generó diferencias significativas ( $p =$

0,0107). La condición controlada fue la que presentó un promedio de crecimiento mayor (0,22 Log UFC/g) en comparación con la condición real (0,16 Log UFC/g).

El comportamiento obtenido en cuanto a la influencia de la condición de almacenamiento se pudo deber a que en la sección 5.2 del presente estudio se demostró que la broza de café almacenada en condiciones controladas presentó mayores pérdidas en la concentración de ácidos clorogénicos. Dichos ácidos son los que han demostrado tener actividad antimicrobiana sobre cierto tipo de bacterias, como por ejemplo *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Lou *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2011). De igual manera, se ha reportado actividad antifúngica y antimicotoxigénica de los ácidos clorogénicos, en donde destacan los resultados positivos en la reducción de cepas de *Aspergillus* sp. y en ocratoxina A (Suárez *et al.*, 2013).

No obstante, se debe destacar que en el caso de las bacterias, el potencial antimicrobiano de los ácidos clorogénicos es menor sobre las bacterias gram negativas (como por ejemplo *Salmonella* sp. y coliformes) en comparación con las gram positivas. Pero en ambos tipos de bacterias, el efecto antimicrobiano se atribuye a cambios irreversibles en la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria, lo cual ocasiona muerte celular por la pérdida del potencial de dicha membrana (Lou *et al.*, 2011; Chaves & Esquivel, 2019). Este último aspecto pudo ser un motivo por el cual a lo largo del estudio de almacenamiento sí se obtuvieron crecimientos logarítmicos pequeños, aun cuando es un alimento que fue previamente deshidratado y producido en condiciones que contemplan el empleo de factores ( $a_w$ , % H<sub>2</sub>O, entre otros) que limitan la proliferación de los microorganismos.

En cuanto a los materiales de empaques utilizados, no presentaron diferencias significativas para los crecimientos logarítmicos de las dos variables respuestas de interés. No obstante, a pesar de que dicha diferencia no era significativa para ambas variables, se pudo notar que el empaque que presentó menor crecimiento fue el P-600, seguido por el EE y por último PET Metal. Dichos resultados se pueden asociar con los reportados en la sección 6.1 del presente estudio, en el cual se concluye que el empaque P-600 era el que poseía las mejores propiedades de barrera.

## 6. CONCLUSIONES

Debido a las características de los empaques, el P-600, P-800 y EE requirieron condiciones similares (temperatura, tiempo e impulso eléctrico) para la obtención del sellado correcto, a diferencia del PET Metal y el Kraft Metalizado.

La velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) y el coeficiente de permeabilidad (P) disminuyó conforme se aumentó la temperatura (de 23 °C a 35 °C), debido a la estructura de los empaques.

El empaque P-600 demostró tener, para las dos temperaturas analizadas, una resistencia física más eficiente hacia el paso de las moléculas de agua capaces de difundirse a través de sus polímeros.

Los empaques P-600 y PET Metal demostraron tener las mejores propiedades de barrera (VTVA y P) para las dos temperaturas analizadas (23 °C y 35 °C), buenas características de sellabilidad e impedimento total al paso de la luz.

Las condiciones reales permitieron la menor degradación de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g muestra) y ácido clorogénico (mg/g de muestra) en comparación con las condiciones controladas. Además, el bloque dos (cosecha en estado maduro), reportó las concentraciones iniciales (tiempo cero meses de almacenamiento) más altas de los dos compuestos analizados.

El tipo de empaque no generó diferencias significativas en la degradación de cianidina 3-o-rutinosido, pero el empaque EE permitió la mayor conservación de ácido clorogénico.

El comportamiento de la degradación de cianidina 3-o-rutinosido y ácido clorogénico varió durante los diez meses de almacenamiento, pero para todas las condiciones y empaques al final del almacenamiento se llegó a concentraciones similares y bajas, por lo que se podría atribuir dichas variaciones a las propiedades de barrera de cada empaque y a la posible reactivación de la enzima polifenoloxidasasa (PPO) la cual genera modificaciones estructurales en los compuestos.

La degradación de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido siguió una cinética de primer orden para la temperatura de 25 °C (primeros seis meses de almacenamiento) y 22 °C (últimos tres meses de almacenamiento).

Las constantes de degradación (k) de cianidina 3-o-rutinosido y ácido clorogénico aumentaron conforme se incrementó la temperatura de almacenamiento, mientras que el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) disminuyó.

La humedad y actividad del agua de la broza de café deshidratada aumentó a lo largo del estudio de almacenamiento, y fue mayor en las condiciones controladas y menor en el empaque P-600.

Los tres parámetros evaluados a nivel de color instrumental ( $L^*$ ,  $h^\circ$  y  $C^*$ ) evidenciaron una disminución conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento, siendo menor el aumento en el empaque PET Metal y en el bloque dos o cosecha pico.

El análisis de color y sabor por método sensorial (2-AFC) demostró que los panelistas identificaron, en la mayoría de las pruebas, la muestra a diferentes tiempos de almacenamiento como la que poseía el atributo más intenso. Ya que la muestra de broza de café deshidratada a cero meses de almacenamiento (almacenada a -40 °C), presentó también reacciones de degradación del color y sabor, asociado posiblemente a la presencia de enzimas.

Los valores de  $d'$  (diferencia percibida entre dos estímulos) obtenidos en el análisis sensorial, evidenció que conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento la diferencia en sabor y color se incrementaba. No obstante, los empaques P-600 y PET Metal fueron los que presentaron los menores valores  $d'$ .

La diferencia total de color medido a nivel instrumental fue significativamente mayor con respecto al obtenido por métodos sensoriales, ya que el instrumento solamente capta pequeñas diferencias.

A nivel microbiológico se obtuvo que la broza de café deshidratada se encontraba exenta de *Salmonella* sp. y coliformes fecales.

Los empaques analizados no presentaron diferencias significativas en el crecimiento logarítmico (Log UFC/g) de mohos y levaduras, y coliformes totales. No obstante, el

crecimiento logarítmico de coliformes totales fue mayor en condiciones controladas de almacenamiento.

Las condiciones de almacenamiento reales en conjunto con el empaque P-600, son los que permitieron la mayor conservación de cianidina 3-o-rutinosido y ácido clorogénico, y las demás variables evaluadas (color, sabor, humedad y  $a_w$ ).

## 7. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de degradación de compuestos con capacidad antioxidante utilizando el empaque EE y un recubrimiento superficial con papel Kraft, con el fin de determinar si dicho recubrimiento posee un efecto positivo que a su vez implique menores costos económicos.

Se recomienda implementar cambios estructurales en el almacén que permitan amortiguar variaciones altas de temperaturas en el almacén, como por ejemplo: productos para aislar paredes o techos que reducen la temperatura hasta 4 °C y reducen los costos de climatización de ambientes cerrados, uso de pintura térmica, uso de pintura convencional para el techo y paredes con colores que reflejen la luz (ej: color blanco, celeste), entre otros.

Realizar pruebas de formación de bolsas con el empaque P-600, pero con las dimensiones requeridas por el proveedor de broza de café deshidratada, con el fin de determinar los costos reales de producción y las características físicas de desempeño del empaque.

Efectuar estudios de la variación de compuestos fenólicos durante el almacenamiento en empaques biodegradables, con el fin de reducir el impacto ambiental que posee la generación de desechos plásticos.

Efectuar análisis de ciandina 3-o-rutinosido y ácido clorogénico para cada fecha de cosecha, con el objetivo de desarrollar fichas técnicas que contemplen las variaciones reales de la concentración de cada compuesto según estado de madurez de la broza de café deshidratada.

Realizar espectrometría de masas para identificar con precisión el tipo de ácido clorogénico y antocianina presente en la broza de café deshidratada, así como también los productos formados por el proceso de degradación de la muestra.

Mejorar las condiciones de producción de broza de café deshidratada con el fin de asegurar la inactivación de las enzimas que pueden degradar el producto, así como investigar otro tipo de reacciones que ocurren en alimentos altos en azúcares y polifenoles.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ADENDORF. 2012. Equipos y suministros para la industria: Medidores de transparencia y opacidad. Internet. <http://www.adendorf.net/medidor-de-transparencia-opacidad-p-395.html> Recuperado el 28 de mayo 2019
- AGOSTÓN, G. 2013. Color theory and its application in art and design. EEUU, Springer.
- AGUILAR, C. 2007. Determinación de la permeabilidad de aromas a través de films plásticos utilizados para envases de alimentos. Tesis Licenciatura. Universidad de Chile, Chile.
- AGUILAR, L. & HERRERA, L. 2009. Separación de polietileno y poliamida de una película coextruida con ambos polímeros. Tesis Licenciatura. Universidad EAFIT, Colombia.
- AL DHABI, N., PONMURUGAN, K. & JEGANATHAN, P. 2017. Development and validation of ultrasound assisted solid liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34(1):206-213.
- ALAVI, S., THOMAS, S., SANDEEP, K., NANDAKUMAR, K., VARGHESE, J. & YARAGALLA, S. 2014. *Polymers for Packaging Applications*. EEUU, CRC Press.
- ANANINGSIH, V., SHARMA, A. & ZHOU, W. 2011. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50 (1): 469-479.
- ANGULO, O. & O'MAHONY, M. 2009. Aplicación del modelo de Thurstone a las pruebas sensoriales de diferencia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(4): 349-355.
- ARRELLANO, M. 2009. Estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxcinámicos obtenidos en la pulpa de café. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Izatalpa, México.

- AWADA, H., BOUATMANE, M. & DANEAULT, C. 2015. High strength paper production based on esterification of thermomechanical pulp fibers in the presence of poly (vinyl alcohol). *Heliyon*. 1-9.
- BADUI, D. 2013. *Química de los Alimentos*. Pearson Educación: México.
- BAGACHI, D., BAGACHI, M., STOHS, S., DAS, S., RAY, S., KUSZYNSKI, C., JOSHI, S., PRUESS, H. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 142(2):187-198.
- BARAHUIE, F., SAIFULLAH, B., DORNANI, D., FAKURAZI, S., KARTHIVASHAN, G., HUSSEIN, M. & ELFGHI, F., 2017. Graphene oxide as nanocarrier for controlled release and targeted delivery of an anticancer active agent, chlorogenic acid. *Science Engineering*. 74(1):177-185.
- BARBOSA, G.V., FONTANA, A.J., SCHMIDT, S:J. & LABUZA, T.P. 2008. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Institute of Food Technologists. s.l. Institute of Food Technologists Series.
- BARRENA, R. & SÁNCHEZ, M. 2004. El consumidor ante los alimentos de nueva generación: alimentos funcionales y alimentos transgénicos. *Revista Estudios Agrícolas y Pesqueros*, 204(1): 95-113.
- BASTOS, C. & ALVES, R. 2004. Métodos para análisis de ácido clorogénico. *Universidad Río de Janeiro*. 27(4): 587-592.
- BERK, Z., 2009. *Food process engineering and technology*. Amsterdam. Elsevier.
- BIBEK, R. & ARUN, B. 2013. *Fundamental Food Microbiology*. EEUU, CRC Press.
- BLINOVA, L., SIROTIK, M., BARTOSOVÁ, A. & SOLDÁN, M. 2017. Utilization of waste from coffee production. *Slovak University of Technology in Bratislava*. 25(40):91-101.
- BOLAÑOS, M. 2015. Estudio exploratorio de la actividad de tres enzimas endógenas y su efecto sobre las antocianinas presentes en la broza de café. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

- BONDENSSON, E. 2015. A nutritional analysis on the by-product coffee husk and potential utilization in food production. Tesis Licenciatura. Universidad de Agricultura de Suecia, Suecia.
- BRAND, D., PANDEY, A., ROUSSOS, S. & SOCCOL, C. 2000. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using solid state fermentation system. *Enzyme Microbial Technology*. 27(2):127-133.
- BRODIN, I. 2009. Chemical properties and thermal behavior of kraft lignins. Tesis Licenciatura. KTH Royal Institute of Technology, Suecia.
- BUENAVENTURA, C. & CASTAÑO, J. 2002. Influencia de la altitud en la calidad de la bebida de muestra de café procedente del ecotopo 206B en Colombia. *Cenicafé*, 53 (2) 119- 131.
- BUNTIC, A., PAVLOVIC, M., ANTONOVIC, D., SILER-MARINKOVIC, S. & DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S. 2016. Utilization of spent coffee grounds for isolation and stabilization of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 cellulase by immobilization. *Heliyon*. 2(8):1-13.
- BUTZKE, C., VOGT, E. & CHACÓN, L. 2012. Effects of heat exposure on wine quality during transport and storage. *Journal of Wine Research*, 23(1):15-25.
- CABANES, J., ESCRIBANO, J., GANDIA, F., GARCÍA, F. & JIMÉNEZ, M. 2007. Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina), molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55 (1): 10446–10451.
- CAIVANO, J. & BUERA, M. 2012. Color in food: Technological and Psychophysical aspects. EEUU, CRC Press.
- CASTAÑO, J., MILENA, I., RODRÍGUEZ, D. & LOZANO, A. 2004. Análisis comparativo de tres estructuras de empaque para café tostado. *Cenicafé*, 55(4): 277-301.

- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2017. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). INTERNET: <https://www.cdc.gov/ncezid/what-we-do/our-topics/foodborne-disease.html>  
Recuperado el 19 de marzo del 2019.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2019. *Salmonella* sp.. INTERNET: <https://www.cdc.gov/salmonella/> Recuperado el 19 de marzo del 2019.
- CHAVES, C. & ESQUIVEL, P. 2019. Ácidos clorogénicos presentes en el café: Capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía Mesoamericana*, 30 (1):299-311.
- CIPRIANI, C. 2016. Efecto Del empaque en el contenido de humedad final para dos tipos de manzanas deshidratadas en almacenamiento controlado. Tesis Ingeniería. Universidad San Ignacio de Loyola, Perú.
- CITAA. 2015. Extracción de polifenoles. Método P-SA-Q\_017. Universidad de Costa Rica, San José.
- CITAb. 2016. Determinación de polifenoles por HPLC. Método P-SA-MQ-044. Universidad de Costa Rica, San José.
- CITAc. 2015. Determinación de la actividad del agua con equipo Aqualab, 4TE. Método P-SA-MQ-041. Universidad de Costa Rica, San José.
- COCCA, M., LORENZO, M., MALINCONICO, M. & FREZZA, V. 2011. Influence of crystal polymorphism on mechanical and barrier properties of poly(l-lactic acid). *European Polymer Journal*. 47(5):1073–1080.
- CORRADINI, D., EKSTEEN, E., EKSTEEN, R., SCHOENMAKERS, P. & MILLER, N. 2011. *Handbook of HPLC*. EEUU, CRC Press.
- CORRY, J., CURTIS G. & BAIRD, R. 2011. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. EEUU, Royal Society of Chemistry.
- DECAZY, F., AVELINO, J., GUYOT, B., PERRIOT, J., PINEDA, D. & CILAS, C. 2003. Quality of different Honduran Coffees in relation to several environments. *Journal of Food Science*, 68 (1): 236-240.

- DERARDJA, A., PRETZLER, M., KAMPATSIKAS, I., BARKAT, M. & ROMPEL, A. 2017. Purification and Characterization of Latent Polyphenol oxidase from apricot. (*Prunus armeniaca L.*). Jorunal Agriculture and Food Chemistry.65(37):8203-8212.
- DOMÍNGUEZ, J., ROMÁN, A., PRIETO, F. & ACEVEDO, O. 2012. Sistema de notación Munsell y CIELab como herramienta para evaluación de color en suelos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3(1): 141-155.
- DUARTE, L., PEREIRA, A. & FARAH, A. 2010. Chlorogenic acid and other relevant compounds in Brazilian coffees processes by semi dry and wet post harvesting methods. Food Chemistry, 118 (3)851-858.
- DUNNO, K., COOKSEY, K., GERARD, P., THOMAS, R. & WHITESIDE, W. 2016. The effects of transportation hazards on shelf life of packaged potato chips. Elseiver. 8(1): 9-13.
- ENNIS, D. & JESINOKA, V. 2011. The Power of sensory discrmination methos revisted. Journal of Sensory Studies. 26(1):371-381.
- ERKMEN, O. & BOZOGLU, F. 2016. Food Microbiology: Principles intro practice. Vol.2. Turkey, Wiley, S.A.
- ESPINOZA, A., CARDONA, E., MÉNDEZ, J., CAÑIZARES, A. & BUONAFINA, A. 2008. Efecto del empaque, temperatura y tiempo de almacenamiento sobre características físicas de frutos de Parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*). Instituto de Investigaciones Agrícolas de Venezuela, 21(1):55-63.
- ESQUIVEL, P. & JIMÉNEZ, V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by products. Food Research International, 46 (2): 486-495.
- ETHERTON, K., LEFEVRE, M., BEECHER, G., GROSS, M., KEEN, C. & ETHERTON, T. 2004. Bioactive compounds in nutrition and health research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. Annual Review Nutrition. 24(1):511-538.

- EVAL AMERICAS. 2009. Technical Bulletin No. 110: Gas barrier properties of resins. Internet. [www.evalamricas.com](http://www.evalamricas.com). Recuperado el 28 de mayo 2019.
- FARAH, A. 2012. Coffea: Emerging health effects and disease prevention. Jhon Wiley & Sons Inc, EEUU.
- FARFÁN, A., ROJAS, A., VARGAS, F., VARGAS, L. 2016. Mecanismo de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Revista Chilena de Infectología. 33(4):438-450.
- FARMER, N. 2013. Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG) Markets, Materials and Technologies. Cambridge. Woodhead Publishing.
- FARMER, N. 2013. Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG) Markets, Materials and Technologies. Cambridge. Woodhead Publishing
- FAVELA, E., HUERTA, E., ROUSSOS, F., OLIVARES, G., NAVA, G., VINIEGRA, G. & GUTIÉRREZ, M. 2004. Producción de Enzimas a partir de pulpa de café y su aplicación en el beneficio húmedo. Primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. México.
- FDAa. 2001. Bacteriological Analytical Manual: Yeast, molds and micotoxins. INTERNET: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm> Consultado el 16 de febrero de 2018.
- FDAb. 2002. Bacteriological Analytical Manual: Enumeration of Escherichia Coli and the coliform bacteria. 4 edición. INTERNET: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm> Consultado el 16 de febrero de 2018.
- FDAc. 2007. Bacteriological Analytical Manual: *Salmonella sp.* 8 edición. INTERNET: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>. Consultado el 16 de febrero de 2018.

- FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. 2010. Comportamiento de la industria cafetera colombiana. INTERNET. [https://www.federaciondecafeteros.org/static/files/2010\\_Comportamiento.pdf](https://www.federaciondecafeteros.org/static/files/2010_Comportamiento.pdf) recuperado el 24 de abril del 2019.
- FERNÁNDEZ, A., MELLO, F., THODE, F., CARPES, R., HONÓRIO, J., MARQUES, M., FELZENSZWALB., I. & FERRZA, E. 2017. Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health. *Ecotoxicol Environ.* 141(1):30-36.
- FLORES, E. & FLORES, E. 2018. Estabilidad de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante de bebidas de maíz morado (*Zea mays* L.) y uña de gato (*Uncaria tomentosa* sp.). *Información Tecnológica.* 29(2):175-182.
- GALOTTO, M., ULLOA, P. & HERNÁNDEZ, D., FERNANDEZ, F., MARTÍN, R., GAVAR, R. & GUARDA, A. 2008. Mechanical and thermal behaviour of flexible food packaging polymeric films materials under high pressure/temperature treatments. *Packaging Technology and Science.* 21(5): 297–308.
- GARCÍA, C. & QUINTERO G. 2008. Contenido de ácidos clorogénicos en granos de café *Coffea arabica* y *C. canephora*, según el desarrollo del fruto. *Cenicafé.* 59(1):7-25.
- GAUTHIER. L., BONNIN, M., MARCHEGAY, G., PINSON, L., DUCOS, C., FORGET, F. & ATANASOVA, V. 2016. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: new insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal Food of Microbiology.* 221(1):61-68.
- GEETRUI, M., BOSMANS, J. & DELCOUR, T. 2016. NMR Relaxation Studies of Cereal Products, *Modern Magnetic Resonance.* 1(18):34.
- GEREMU, M., BEKELE, Y. & SUALEH, A. 2016. Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea Arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 3(25):2-6

- GIL, J., MURATONA, S., YACANTO, P., SOTERAS, E., ABACA, C. & SUSTERSIC, M. 2013. Water Adsorption and Desorption Isotherms on non-Fat Dry Milk. *Avances en Ciencias e Ingeniería* 4 (1):51-59.
- GILES, H., WAGNER, J. & MOUNT, E. 2014. *Extrusion: The Definitive Processing Guid and Handbook*. EEUU, Elsevier.
- GÓMEZ, C. 2011. *Caracterización de las propiedades de sellado de empaques flexibles*. España, EAE.
- GOODWIN, D., & YOUNG, D. 2011. *Share protective packaging for distribution*. Lancaster, PA: DEStech Publications, Inc. 1(3): 196-230.
- GRUMEZESCU, A. 2016. *Food Packaging: Nanotechnology in the agri-food industry*. Vol 7. Amsterdam, Academic Press.
- GULRAJANI, M. 2010. *Color Measurement: Principles, advances and industrial applications*. Elsevier, EEUU.
- GUZMÁN, M., ORTEGA, A. & ANAYA, C. 2010. Piranoantocianinas: modificaciones estructurales de antocianinas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 1(4): 84-95
- HAYES, R. 2013. *Food Microbiology and Hygiene*. EEUU, Springer Science & Business Media.
- HERNÁNDEZ, E. & BRICEÑO, L. 2008. Evaluación enzimática durante el almacenamiento en congelación del puré de de palta (*Psersea americana Mill*) Var. Hass. *UNALM*. 7(4): 24-34.
- HINO, A., ADACHI, H., ENOMOTO, M., FURUKI, K., SHIGETOH, Y., OHTSUKA, M., KUMAGE, S., HORAI, Y., JALALDIN, A., SATOH, A. & IMAIZUMI, T. 2016. Habitual coffee but not green tea consumption in inversely associated with metabolic syndrome. *Diabetes Research Clinic Practice*. 76(3): 383-389.
- HUNTER LAB. 2008. *Applications Note: CIE L\*a\*b\* Color Scale*. HunterLab, 8(7): 1-4.

- IBAÑEZ, F. & BARCINA, Y. 2001. Análisis sensorial de alimentos: métodos y aplicaciones. España: Springer Ibérica.
- JACUINDE, J., VLLEGAS, I., RAMIREZ, S., RIVERA, F., CALDERÓN, G., PELAYO, C. & PÉREZ, L. 2006. Antocianinas totales, color y capacidad antioxidante entre frutos de Litchi almacenados en dos diferentes empaque a 7°C. Biotecnología y bioingeniería, Universidad de México.
- JANISSEN, B., & HUYNH, T. 2018. Chemical composition and value –adding applications of coffee industry by products. Resources, Conservation and Recycling. 128(1): 110-117.
- JANISSEN, B., & HUYNH, T. 2018. Chemical composition and value –adding applications of coffee industry by products. Resources, Conservation and Recycling. 128(1): 110-117.
- JIMÉNEZ, N., ALFARO, I., THOMPSON, E., ACOSTA, O. & JIMÉNEZ, J. 2017. Manual de laboratorio. Operaciones Unitarias en el Procesamiento de Alimentos II. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- KARKULAND, A., MOOR, U., SANDELL, M., KARALAINEN, R. 2014. The impact of harvesting, storage and processing factor on health-promoting phytochemicals in berries and fruits. Journal Processes, 2 (1): 596-624.
- KASSU, Y. 2010. Chemical composition and In vitro digestibility of coffee pulp and coffee husk ensiles with grass (*Hyperchennia hirta*) and effective microorganism (EM). Tesis. Maestría en Ciencias en Agricultura y Producción Animal. Jimma University. Etiopia
- KELLER, P. & KOUZES, R. 2017. Water Vapor Permeation in Plastics. EEUU, PacificNorthwest Laboratory.
- KERRY, J. 2012. Aluminium foil packaging. Packaging Technology. 18(4):163-177.
- KILCAST, D. 2010. Sensory analysis for food and beverage quality control: A practical guide. EEUU, Elsevier.

- KIM, A. 2016. Investigation of high- barrier materials development for long shelf-life dairy based products with enhanced properties. Tesis Maestria. Lund University, Suecia.
- KUMAR, S., SWAPNA, T. & SABU, A. 2018. Coffee Husk: A potential agro-industrial residue for bioprocess. Singapore, Springer. 97- 109.
- KUSOKI, M., ASUERO, A., TRONCOSOS, A., MANCINI, F. & FETT, J. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Revista Brasileña Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 25(1): 726–732.
- LAGARÓN, J. 2011. Multifunctional and nano-reinforced polymers for food packaging. EEUU, Elsevier.
- LALEH, G., FRYDOONAR, H., HEIDARY, R., JAMEEI, R. & ZARE, S. 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments on four berberis species. *Pakistan Journal and Nutrition*. 5(1):90-92.
- LAWLESS H, HEYMANN H. 2010. Sensory evaluation of food: Principles and Practices. USA: Springer Science & Business Media.
- LAWLESS, H. & HEYMANN, H. 2010. Sensory evaluation of food: Principles and Practices. USA, Springer Science & Business Media.
- LAWNGOSKI, H. 2017. Shelf Life of Packed Food and Packing Funtionality. Testing and Quality Assurance. CRC Press.
- LÓPEZ, C. & GALLEGOS, R. 2014. Determinación del contenido de ácido clorogénico por espectroscopia UV-VIS en hojas secas y verdes de *cercopia peltata* (guarumo) en árboles silvestres de 10,15 y 20 m de altura en la reserva natural de laguna de apoyo, Masaya. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Nicaragua.
- LOU, Z., WANG, H., ZHU, S., MA, C. & WANG, Z. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science*, 76(6): 398-403.

- LOUGH, W. & WAINER, I. 2012 High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice. Netherlands, Springer.
- LOUIS, R. & STEWART, G. 2013. Water Activity: Influences on food quality. EEUU, Academic Press.
- MAC ADAM, D. 2013. Color Measurement: Theme and Variations. EEUU, Springer.
- MAC DOUGALL, D. 2002. Colour in food: Improving quality. EEUU, CRC Press.
- MACHADO, E., RODRIGUEZ, R., TEIXEIRA, J. & MUSSATTO, S. 2012. Growth of fungal strains on Coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochemical Engineering Journal*. 60(1):87-90.
- MARÍN, C. & PUERTA, G. 2008. Contenido de ácido clorogénico en granos de *Coffea Arábica* y *Coffea Canephora*, según el desarrollo del fruto. *Cenicafé*. 59 (1): 7-28.
- MARTÍNEZ, J., ROJAS, S., BORDA, G. & MEDINA, M. 2011. Estabilidad de Antocianinas en Jugo y Concentrado de Agraz (*Vaccinium meridionale* Sw.). *Revista Facultad Agronómica Medellín*, 64(1): 6015-6022.
- MARTÍNEZ, M., JIMÉNEZ, A., GARCÍA, L., ALMELA, L., GARCÍA, L., MARISCAL, M. & MURCIA, M. 2011. Assessment of antimicrobial activity of coffee brewed in three different ways from different origins. *European Food and Research and Technology*, 233(3): 497-505.
- MIKAMI, Y. & YAMZAWA, T. 2015. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Science*. 139(1):69-74.
- MONTAÑA, E. 2013. Estudio del comportamiento físico y mecánico de una película coextruida de tres capas LLDPE y HDPE-Nylon 6,6-LLDPE como aplicación de empaque al vacío para la empresa Polietilenos del Valle SA. Tesis Licenciatura. Universidad San Buenaventura, Colombia.
- MORA, N. 2008. Agrocadena del Café. Ministerios de Agricultura y Ganadería Dirección Regional Huetar Norte, Costa Rica. (<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9314.pdf>)

- MOREAU, Y., ARRENADNO, Y., GAIME, J. & ROUSSOS, S. 2003. Dietary Utilisation of Protein and Energy from Fresh and Ensiled Coffee Pulp by the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Brazilian Archives of Biology and technology*, 46(2).63-78.
- MORTEN,C., MEILGAARD, B., CARR, T. & VANCE, C.2008. *Sensory Evaluation Techniques*. USA: CRC Press.
- MRKI'C, S., GALIC, K. & IVANKOVIC, M. 2007. Effect of temperature and mechanical stress on barrier properties of polymeric films used for food packaging. *Journal of Plastic Film and Sheeting*. 23(3):239-256.
- MURTHY, P. & NAIDU, M. 2010a. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Applied Sciences Journal*. 8(2):199-205.
- MURTHY, P. & NAIDU, M. 2012b. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. 5(3): 897-903.
- MURTHY, P., MANJUATHA, M., SULOCHANNAMA, G. & MADHAVA, N. 2012. Extraction, characterization and bioactivity of coffee anthocyanins. *European Journal of Biological Sciences*, 4(1)8-16.
- MUSSATTO, S., MACHADO, E., MARTINS, S., TEIXEIRA, J. 2011. Production, composition and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Technology*, 4(1):661-672.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). 2019. Cyanidine 3-o-rutinoside. INTERNET: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanidin-3-rutinoside>. Recuperado el 19 de marzo del 2019.
- NGO, N. & PHAN, H. 2016. Screening of fungal strains grown in solid-state culture for production of pectinase from coffee husk. *International Journal of Advanced Science*. 6(3):273-276.

- O'MAHONY M. 1995. Who told you the triangle test was simple?. Universidad de California: Department of Food Science and Technology. 6 (1): 227-236.
- OCla. 2019. Word Coffee Consumption, Londres. INTERNET: <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>. Recuperado el 19 de marzo del 2019.
- OCib. 2019. Total production by all exporting countries, Londres. INTERNET: <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. Recuperado el 19 de marzo del 2019.
- OLIVAS, R. 2008. Comparación y evaluación de las pruebas de diferencia dúo-trío, triangular, ABX e igual diferente. México: Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos de la Universidad de las Américas. 2(1): 66-67.
- OLKHOV, A., VLASOV, S., IORDANSKII, A., ZAIKOV, G. & LOBO, V. 2003. Water transport, structure features and mechanical behavior of biodegradable PHB/PVA blends. Journal of Applied Polymer Science. 90 (6): 1471–1476.
- ORDOÑEZ, L., VÁZQUEZ, L., ARBONES, E. & ROMERO, M. 2009. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. Food Chemistry, 129 (1): 146-149.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL CAFÉ (OIC). 2005. INTERNET. <http://www.ico.org/documents/ed1967c.pdf>. Consultado el 10 de setiembre de 2017.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2015. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. INTERNET: [https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/fergreport/es/](https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/es/) Recuperado el 19 de marzo del 2019.
- ORTÍZ, M., REZA, M., CHEW, R. & MEZA, J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. Biotecnia, México, 13 (1): 15-22.
- PAINE, F. 2012. The Packaging Users Handbook. EEUU, Springer Science & Business Media.

- PANDEY, A., SOCCOL, CR., NIGAN, P., BRAND, D., MOHAN, R. & ROUSSOS, S.,  
Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses.  
Biochemical Engineering. 6(1):153-162.
- PARRIOT, D. 2012. A practical guide to HPLC detection. EEUU, Academic Press.
- PATAY, E., SALI, N., KOSZEGI, T., CSEPREGI, R., LILLA, V., NEMETH, S.,  
NEMETH, T. & PAPP, N. 2016. Antioxidant potential, tannin and polyphenol  
contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. Asian Pacific Journal of  
Tropical Medicine. 9(4):366-371
- PATRAS, A., BRUNTON, N., O'DONNELL, C. & TIWARI, B. 2010. Effect of thermal  
processing on anthocyanin stability in foods: mechanism and kinetics of  
degradation. Food Science and Technology. 21(1):3-11.
- PEDRAZA, J., PEREIRA, N., SOTO, Z., HERNÁNDEZ, E. & VILLAREAL, C. 2014.  
Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su  
detección. Salud Uninorte Barranquilla. 30(1):73-94.
- PÉREZ, R. 2017. Comunicación oral: temperaturas de almacenamiento. Costa Rica.
- PODOLAK, R. & BLACK, D. 2017. Control of *Salmonella* and other bacterial pathogens  
in low moisture foods. EEUU, John Wiley & Sons Ltd.
- PORRINI, M. & RISO, P. 2008. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in  
food: a critical appraisal. NMCD. 18(19):647-650.
- PROTHON, F. & AHRNE, L. 2004. Application of the Guggenheim, Anderson and de Boer  
model to correlate water activity and moisture content during osmotic dehydration  
of apples. Journal of Food Engineering. 61 (1): 467-470.
- PUERTAS, M., RIVERA, F., VILLEGAS, P., ROJANO, B. & PELAEZ, C. 2012.  
Comparación entre el estado de madurez del fruto de café (*Coffea arábica* L.),  
contenido de antocianinas y su capacidad antioxidante. Revista Cubana de Plantas  
Medicinales. 17(4): 360-367.

- QUINTANA, J., CORNEJO, F. & RIGAIL, A. 2007. Análisis y diseño de empaques flexibles para alimentos. *Revista Tecnológica ESPOL*, 20(1): 11-18.
- QUIRÓS, M. 2014. Condiciones de extracción de un pigmento rojo a partir de la broza de café. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- RAMÍREZ, J. 1988. Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 43(1):135-144.
- RATHINAVELU, R. & GRAZIOSI, G. 2005. Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización Internacional del Café, Italia.
- RAVISHANKAR, R. & JAMUNA, B. 2014. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials, science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances in. *Microbiology Series*. 3(1):197-209.
- REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO (RTCA). 2009. Alimentos: Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos. RTCA 67.04.50:08. Internet. [http://www.comex.go.cr/media/3480/279\\_anex-243-rtca-67-04-50-08-microbio-may-09.pdf](http://www.comex.go.cr/media/3480/279_anex-243-rtca-67-04-50-08-microbio-may-09.pdf)
- RETTIG, M. & HEN, A. 2014. El color en los alimentos un criterios de calidad medible. *Agro Sur*. 42(2): 39-47.
- RIBEIRO, D., RODRÍGUEZ, N., ZAMBRANO, D. & LÓPEZ, J. 2014. Management and Utilization of wastes from coffee processing. In Schawn, R. & Fleet, G., eds. *Cocoa and Coffee Fermentations*. CRC Press, Boca R, 545-563.
- RIVERA, S. 2015. Estudio de las condiciones de limpieza-desinfección, escaldado y secado de la broza de café, en una minipyme para la conservación de la mayor actividad antioxidante. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- ROBSON, N. 2000. Principales materiales plásticos para la manufactura de envases y embalajes. *Centro de Comercio Internacional*. 99(19):55-64.
- RODRÍGUEZ, V. 2008. Bases de la alimentación humana. España: Netbiblo, S.L.

- ROESSLER, E., PANGBORN, R., SIDEL, J. & STONE, H. 1978. Expanded statistical tables for estimating significance in pair-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. *Journal of food science*, 43(1): 940-943.
- ROJANO, B., ZAPATA, C. & CORTES, F. 2012. Estabilidad de antocianinas y valores de capacidad de absorbancia de radicales oxígeno (ORAC) de extractos acuosos de corozo (*Bactris guineensis*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17(3):244-255.
- SAAVEDRA, J., CORDOVA, A., GÁLVEZ, L., QUESADA, C. & NAVARRO, R. 2013. Principal component analysis as an exploration tool for kinetic modeling of food quality: A case study of a dried apple cluster snack. *Journal of Food Engineering*. 119(1): 229-235.
- SANGERLAUB, A., SCHMID, M. & MULLER, K. 2018. Comparison of water vapour transmission rates of monolayer films determined by water vapour sorption and permeation experiments. *Food Packaging and Shelf Life*. 17(1):80-84.
- SANTOS-BUELGA, C. & SCALBERT, A. 2000. Proanthocyanidins and tannin like compounds nature occurrence dietary and effects on nutrition and health. *Journal of Science Food Agriculture*. 80(7):1094-1117.
- SARKAR, D. & SHETTY, K. 2014. Metabolic Stimulation of Plant Phenolic for Food Preservation and Health. *Food Science and Technology*. 5(1):1-19.
- SÁYAGO, S. & GOÑI, I. 2010. *Hibiscus sabdarriffa L*: Fuente de fibra antioxidante. *Universidad de Nutrición y Salud Gastrointestinal*, 60(1): 79-86.
- SEDÓ, P. 2001. El mercado de los alimentos funcionales y los nuevos retos para la educación alimentaria-nutricional. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 11(20): 18-25.
- SHETTY, K. & MC CUE, P. 2003. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of system biology and biotechnological approaches. *Food Biotechnology*. 17(1):67.70.

- SIRACUSA, V.2012. Food Packaging Permeability Behavior: A Report. International Journal of Polymer Science. 2(1):1-11
- SOARES, M., CHRISTEN, P., PANDEY, A. & SOCCOL, C. 2000. Fruity flavor production by *Ceratocysy fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. Process Biochemistry. 35(8):857-861.
- SOMWANGTHANAROJ, A., TANTIVIWATTANAWONGSA, M. & WIWUT, T. 2012. Mechanical and gas barrier properties of Nylon 6/Clay nanocomposite blown films. Engineering Journal. 16(2):95-103.
- SOTO, D., WITTIG, E., GUERRERO, L., GARRIDO, F. & FUENZALIDA, R. 2006. Alimentos funcionales: Comportamiento del consumidor chileno. Revista Chilena de Nutrición, 33(1): 43-54.
- SUÁREZ, M., TAILLEFER, W., LÓPEZ, E., GONZÁLEZ, O., VILLENUEVE, P., FIGUEROA, M. 2013. Antibacterial activity and antifungal and anti mycotoxigenic activities against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus* of green coffee chlorogenic acids and deodecyl chlorogenates. Journal of Food Safety, 33(3): 360-368.
- SUI, X., BARY, S. & ZHOU, W. 2016. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. Food Chemistry, 192 (1): 516-524.
- TEREFE, N., HANG, Y., KNOERZER, K., BUCKOW, R. & VERTEEG, C. 2010. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 11(1):52-60.
- THOMAS, S. & VISAKH, P. 2011. Handbook of Engineering and Speciality Thermoplastics: Polyethers and Polyesters. EEUU, Scrivener Publishing LLC.
- THOMAS, S., NINAN, N., MOHAN, S. & FRANCIS, E. 2012. Natural polymers, biopolymers, biomaterials and their composites, blends and IPNs. EEUU, CRC Press.

- TIMMERMANN, E., CHIRIFE, J. & IGLESIAS, H. 2001. Water sorption isotherms of food and foodstuffs: BET or GAB parameters. *Journal of Food Engineering*. 48 (1):19- 31.
- TOBÓN, S., AGUDELO, R. & GUTIÉRREZ, L. 2017. Patógenos e indicadores microbiólogos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 35(2):236-247.
- TORRES, Y. & RUÍZ, J. 2015. Cinética de la degradación de compuestos fenoles y antocianinas en una bebida funcional a base de arándano azul (*Vaccinium corymbosum L.*). *Ciencia, Tecnología e Innovación*. 2(2): 7-12.
- TREJOS, L., GÓMEZ, F., MORALES, V., MARÍN, T., CASTAÑEDO, O. & PASTELIN, M. 2018. Concentración de macronutrientes y micronutrientes en granos de café (*Coffea sp.*) de diferentes orígenes. Universidad de Veracruz, México. *Revista Agro productividad*. 11 (4):19-24
- TREVITT, J., KAWA, K., JALALI, A. & LARSEN, C. 2009. Differential effects of adenosine antagonists in two models of parkinsonian tremor. *Pharmacology Biochemical Behavior*. 94(1):24-29.
- TRUGO, L. 1984. Chlorogenic acid composition of instant coffee. *PubliMed*.109(3):263-266.
- TSAO, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2(1):131-146.
- UMILE, G. & CIRILLO, G. 2016. *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment*. EEUU, Wiley.
- URREA, D., EIM, V., ROSELLÓ, C. & SIMAL, S. 2012. Modelos cinéticos de degradación de carotenoides, polifenoles y actividad antioxidante durante el secado convectivo de zanahoria (*Daucus carota V. Nantesa*). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 21 (27): 73.99.

- VALENZUELA, A. & MAÍZ, A. 2006. El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral. *Revista Chilena de Nutrición*, 33 (12): 311-342.
- VARGAS, S. 2009. Obtención de un extracto de broza de café con propiedades nutraceuticas. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- VELÁZQUEZ, M., MATA, G. & SAVOIE, J. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(3):201-207.
- VILLALTA, K. 2016. Estudio de la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza de café (*Coffea Arabica*) para su aplicación como ingrediente colorante en alimentos. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- WAACK, R., ALEX, N., FRISCH, H., STANNETT, V. & SZWARC, M. 1955. Permeability of Polymer Films to Gases and Vapors. *Industrial and Engineering Chemistry*. 47 (12): 2524-2527.
- WEI, S., LIN, Y., LIAO, M., ZHOU, H. & LI, Y. 2012. Characterization and antioxidative properties of condensed tannins from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *Journal of Applied Polymer Science*. 124(3):2463-2472.
- WICKLUND, T., ROSENFELD, H., MARTINSEN, B., SUNDFOR, M. TOR, PER LEA., BLOMHOFT, R. & HAFFNER, K. 2005. Antioxidant capacity and color of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Science Directa, Elsevier*. 38(1): 387-391.
- WOLDESEMBET, A., WOLDEYES, B. & SINGH B. 2016. Bio-ethanol production from wet coffee processing waste. *Springer Plus*. 5(1): 1-7.
- WORSCH, T. & DELCHER, R. 2013. A practical guideline for discrimination testing combining both the proportion of discriminators and Thurstonian approaches. *Journal of Sensory Studies*. 28(5):396-404.

- WROLSTAD, R., DURST, R. & LEE, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*. 16(1):423-428.
- YEMENICIOGLU, A., OZKAN, M., VELIOGLU, S. & CEMEROGLU, B. 1998. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from fresh pinto beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research and Technology*. 206 (1): 294–296.
- ZAMORA, M. 2009. Determinación de ácidos clorogénicos, ácido caféico, cafeína, polifenoles totales y actividad antioxidante de tres variedades de café (*Coffea arabica L.*). Tesis Ingeniería. Universidad Agraria Nacional de la Selva, Perú.
- ZAPATA, L., CASTAGINI, J., QUINTERO, C., CARLIER, E., JIMENEZ, M. & CABRERA, C. 2016. Estabilidad de antocianinas durante el almacenamiento de jugos d arándanos. *Revista Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. 23(3):173-183.
- ZARO, M. 2014. Análisis de factores que afectan la acumulación, distribución y estabilidad de antioxidantes de naturaleza fenólica en berenjena (*Solanum melongena L.*). Tesis Doctorado. Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- ZHOU, Y., RUAN, Z., ZHOU, L., SHU, X., SUN, X., MI, S., YANG, Y. & YON, Y. 2016. Chlorogenic acid ameliorates endotoxin-induced liver injury by promoting mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemical and Biophysical research communications*. 469(4): 1083-1089.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Fichas técnicas de los empaques evaluados

**Cuadro A.1** Ficha técnica de la bolsa PET Metalizada utilizada para el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada.

<b>BARRERAS PELICULAS PARA EMPAQUE FLEXIBLE</b>		
<b>TIPO DE BARRERA</b>		
<b>NOMBRE PELICULA Y GROSOR</b>	<b>TRASMISION OXIGENO</b>	<b>TRANSMISION VAPOR DE AGUA</b>
	<b>OTR</b>	<b>WVTR</b>
	<b>CC/M2/24 H / 22°C, 0%HR</b>	<b>G/M2/24 H / 38°C, 90% HR</b>
PET TRANSP DE 12 MICRAS	100	40
PET METAL DE 12 MICRAS	1,2	1

<b>CC/M2/24 H / 22°C, 0%HR</b>	Centímetros cúbicos/metro cuadrado/24horas a temperatura 22 grados con 0% hum relativa
<b>G/M2/24 H / 38°C, 90% HR</b>	Gramos/metro cuadrado/24 horas a temperatura 38 grados con 90% hum relativa

**QUIMIFARMA**  
SOLUCIONES FARMACÉUTICAS

## BOLSAS P600

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**  
Definir las condiciones generales y las características que debe cumplir las BOBINAS de la ref. P-600, esta especificación define las características técnicas que ofrece QUIMIFARMA en el producto terminado.

**2. CONDICIONES GENERALES.**

ESTRUCTURA	P600
PRESENTACIÓN	BOBINAS
	BOLSAS
	LINER
	TAPAS
PRODUCTO A EMPACAR	MEDICAMENTOS COSMÉTICOS ALIMENTOS • Carbonados • Pasteurizados AGROQUÍMICOS

**3. TIPO DE PROCESO.**

LAMINACIÓN 1 PASO	Se une el Polietileno con un foil de Aluminio.
LAMINACIÓN 2 PASO	Se une la anterior laminación con el Poliester impreso.
CORTE	Se corta en Bobinas.

**3.1 COEXTRUSIÓN.**  
La coextrusión es de un polietileno de baja densidad conformado por varias resinas. Esta película de polietileno esta formada por dos capas, una capa externa y una capa interna.  
La capa interna es la que va a estar en contacto con el producto y la que da las características de sellado.

La capa externa es la que se une con la película de Aluminio, esta capa posee resinas con un mayor punto de fusión lo que hace que la capa sea más termoestable, a su vez tiene un tratamiento tipo corona.

### 3.2 LAMINACIÓN.

Es el proceso por medio del cual se unen la película de Aluminio y el polietileno en un primer proceso y posteriormente esta se une con el poliester por medio de un adhesivo.

### 3.3 CORTE.

En este proceso se hace el corte del número de repeticiones que trae el rollo, cada secuencia va a originar una bobina para la correcta disposición en la máquina elaboradora de bolsas.

## 4. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

### 4.1 POLIESTER.

Es una resina de la base del tereftalato de polietileno dando origen a un film termoplástico con características estables térmica y químicamente convirtiendo a esta película ideal para empaques flexibles.

### TRANSMISIÓN DE OXÍGENO

Norma ASTM D 3985-81  
300 c.c / m<sup>2</sup>.dia a 1 atm, 0 % H.R, 23 °C.

### TRANSMISIÓN DE VAPOR DE AGUA.

Norma ASTM D1249-90  
0.1 g/m<sup>2</sup>.dia a 38 °C, 90 % H.R.

### 4.2 ADHESIVO

Es un prepolímero de dos componentes en emulsión con resinas de Poliester Uretano en una concentración de 50 % en sólidos. Los componentes de este adhesivo cumplen con la regulación de la F.D.A. No 21 CFR 175.105 para empaque farmacéuticos y alimenticios.

**Figura A.1** Ficha técnica de la bolsa P-600 utilizada para el estudio de almacenamiento de la de broza de café deshidratada.

#### **POLIESTER METALIZADO:**

*Película de apariencia metalizada, alto brillo espectacular que garantiza una muy alta barrera a la luz U.V. Altísima barrera al vapor de agua y a una gran variedad de aromas, alta barrera al oxígeno. Excelentes propiedades de deslizamiento en máquinas de alta velocidad horizontales y verticales. Aguante temperaturas extremas sin perder su apariencia física.*

#### **COEXTRUCCION CON ADITIVO U.V.**

*El polietileno coextruido blanco con aditivo U.V. de baja densidad con resinas homopolímeros y hexenos en fase gaseosa dando características muy estables en impermeabilidad y transmisión de gases.*

*Esta combinación es apta para estar en contacto con productos alimenticios, farmacéuticos, ya que cumplen con las regulaciones de la F.D.A. No.177.1520*

*Esta película permite sellar a temperaturas bajas, aumentando la fuerza de selle y permitiendo una buena hermeticidad del producto.*

**NOTA ESPECIAL.** *La unión del pet met mas el pigmento blanco con aditivo ha logrado reemplazar la película de foil en un 100%, ya que el aditivo UV tiene una efectividad sobre la disipación de la radiación ultravioleta durante doce (12) meses, conservando así las propiedades físico químicas del producto envasado, ya sea alimentos, cosméticos, farmacéuticos, Agroquímico, veterinarios, etc.*

#### **CONDICIONES DE SELLE:**

<i>Temperatura promedio</i>	<i>120-180 C</i>
<i>Presión</i>	<i>40 - 60 PSI</i>
<i>Tiempo</i>	<i>1/2 segundo</i>

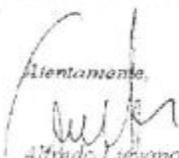
#### **PARA OBTENER UNA OPTIMA SELLABILIDAD DEPENDE DE VARIABLES COMO:**

- 1. Temperatura.*
- 2. Presión ejercida y duración de la operación.*
- 3. Forma y estado de morduzas.*

#### **NOTA:**

*Debido al descalibre que presentan las películas plásticas trabajamos con un rango mas o menos del 10 % dada por los proveedores.*

**ESTA ESTRUCTURA POSEE CARACTERISTICAS DEL EXLENTE BARRERA AL OXIGENO, HUMEDAD TRANSMISION DE GASES Y AL VAPOR DE AGUA.**

*Atentamente,*  
  
*Alfredo Lizcano*  
*Departamento técnico.*

**Figura A.2** Ficha técnica de la bolsa P-800 utilizada para el estudio de almacenamiento de broza de café deshidratada.

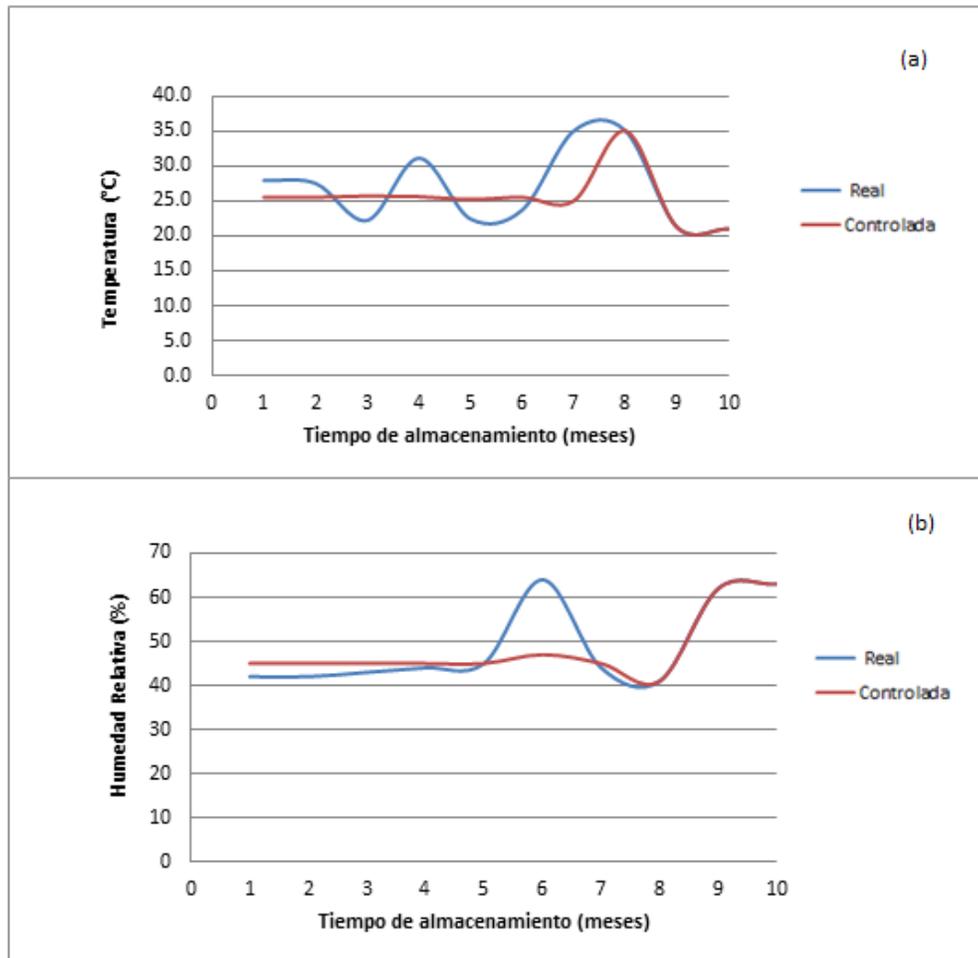
## 9.2 Características reportadas por los proveedores de los cinco empaques evaluados

**Cuadro A2.** Composición del material, tipo de estructura y principales características reportadas en las correspondientes fichas técnicas para los cinco empaques analizadas.

Empaque	Composición del Material	Características
EE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Confidencial</li> </ul>	Grosor: 155 $\mu\text{m}$ Ausencia de válvula Ausencia de barrera a luz UV Gramaje: 144 $\pm 10$ g/m <sup>2</sup>
PET metal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Polipropileno (PP) laminado de 25 <math>\mu\text{m}</math>.</li> <li>Polietileno de tereftalato (PET) metalizado de 12 <math>\mu\text{m}</math>.</li> <li>Polietileno (PE) de 67 <math>\mu\text{m}</math> (capa sellante)</li> </ul>	Grosor: 105 $\mu\text{m}$ Ausencia de válvula Barrera a luz UV Gramaje: no reportado
Kraft metalizado	<ul style="list-style-type: none"> <li>Papel Kraft</li> <li>Polietileno</li> <li>Aluminio.</li> </ul>	Grosor: 150 $\mu\text{m}$ Ausencia de válvula Barrera a luz UV Gramaje: no reportado
P-600	<ul style="list-style-type: none"> <li>Polietileno de tereftalato (PET)</li> <li>Adhesivo</li> <li>Polietileno (PE) coextruido de baja densidad.</li> <li>Aluminio de temple blando</li> </ul>	Grosor: 110 $\mu\text{m}$ Ausencia de válvula Barrera a luz UV Gramaje: 112 $\pm 10$ g/m <sup>2</sup> Zipper superior
P-800	<ul style="list-style-type: none"> <li>Polietileno de tereftalato (PET)</li> <li>Tinta</li> <li>Adhesivo</li> <li>Polietileno de tereftalato metalizado (PET metalizado)</li> <li>Adhesivo</li> <li>Coextruido con aditivo UV blanco de baja densidad.</li> </ul>	Grosor: 60 $\mu\text{m}$ Ausencia de válvula Ausencia de barrera a luz UV Gramaje: no reportado

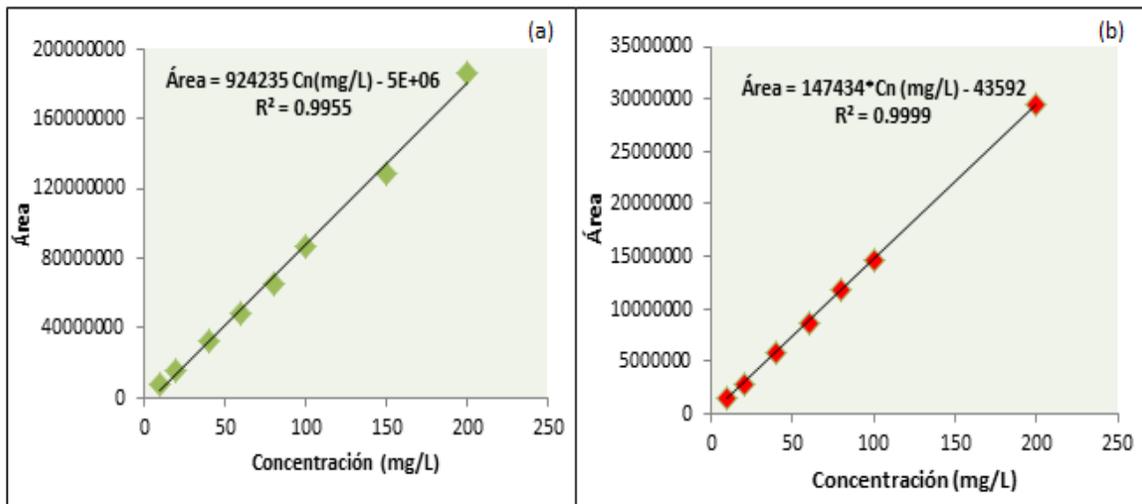
Nota: Datos proporcionados en las correspondientes fichas técnicas.

### 9.3 Temperaturas y humedades relativas obtenidas durante el estudio de almacenamiento:



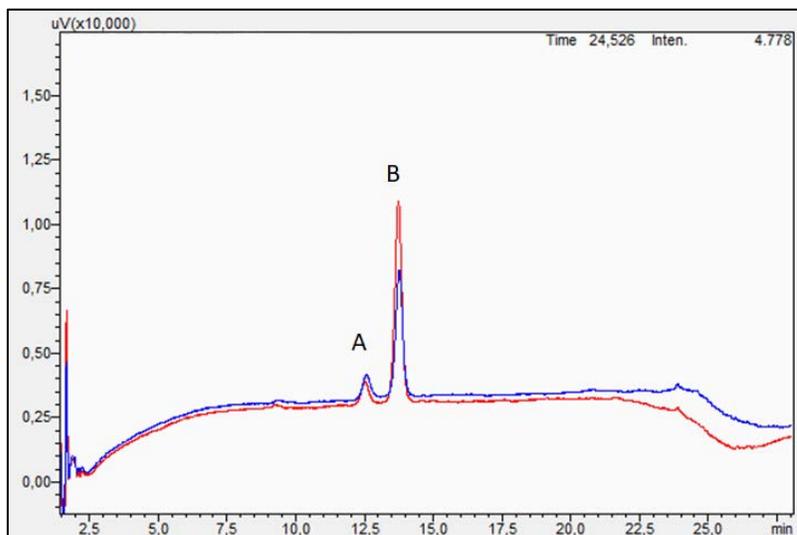
**Figura A.3** Temperaturas (a) y humedades relativas (b) según mes y condición de almacenamiento (real y controlada) obtenidas durante el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada.

#### 9.4 Curvas de calibración obtenidas por medio de HPLC

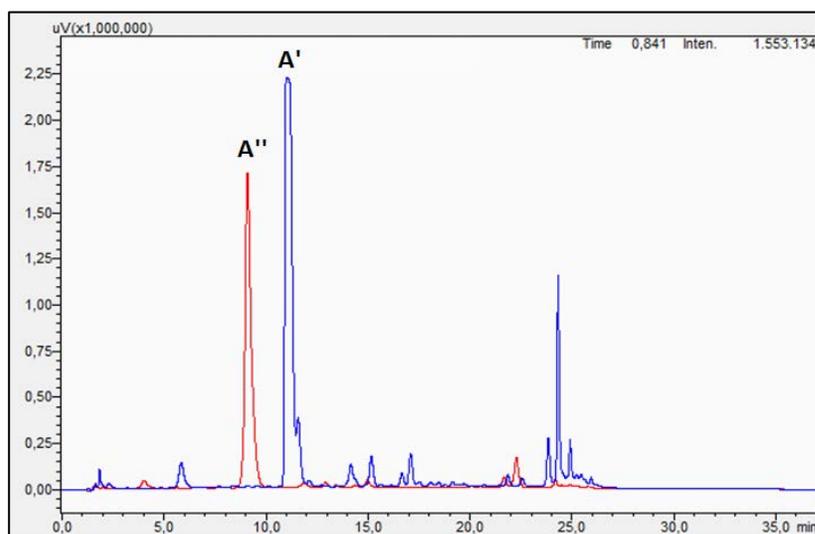


**Figura A.4.** Curva de calibración efectuada en HPLC para ácido clorogénico (a) y cianidina 3-o-rutinosido (b) a una longitud de onda de 327 y 512 nm, respectivamente.

## 9.5 Cromatogramas obtenidas por HPLC de muestras de broza de café enriquecidas con estándares analíticos



**Figura A.5.** Superposición de cromatogramas de muestras de broza de café deshidratada con enriquecimiento de cianidina 3-o-rutinosido (línea roja, señal B) y sin enriquecimiento (línea azul, señal A), analizados a  $\lambda=512$  nm.



**Figura A.6** Superposición de cromatogramas de muestras de broza de café deshidratada con enriquecimiento de ácido clorogénico (línea azul, señal A') y sin enriquecimiento (línea roja, señal A''), analizados a  $\lambda=327$  nm.

## 9.6 Evaluación del método para la determinación de la concentración de cianidina 3-o-rutinósido y ácido clorogénico por HPLC

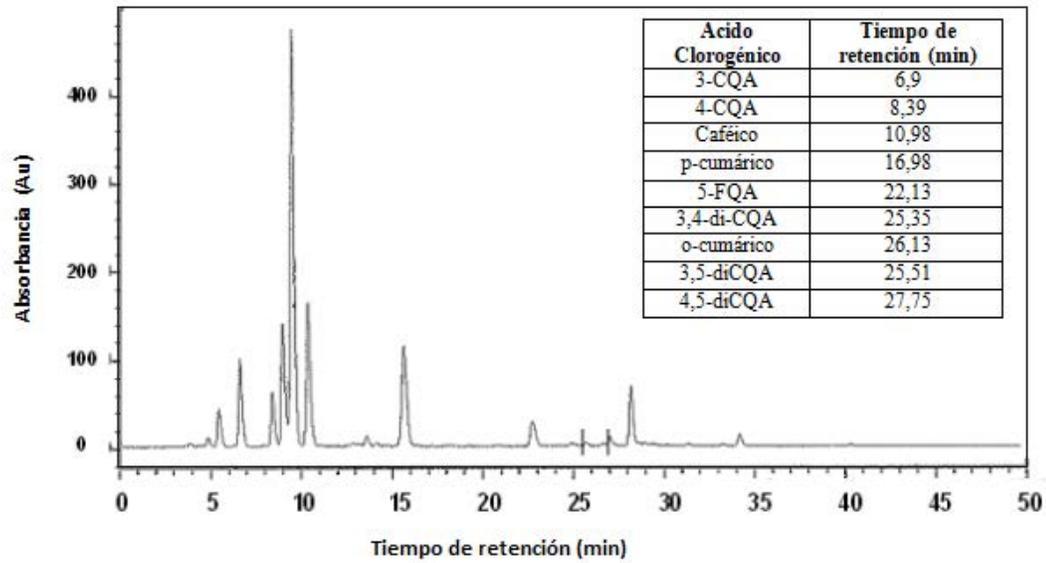
**Cuadro A3.** Límite de detección y cuantificación obtenidos experimentalmente para la concentración de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido mediante HPLC.

Parámetro	Valor (mg/L)	
	Ácido clorogénico	Cianidina 3-o-rutinosido
Límite de detección (LD)	2,02	0,23
Límite de cuantificación (LC)	6,73	0,78

**Cuadro A4** Análisis de regresión lineal de las curvas de calibración obtenidas para el ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido utilizados como estándares analíticos.

Parámetro	Patrón de referencia	
	Ácido clorogénico	Cianidina 3-o-rutinosido
p modelo	< 0,0001	< 0,0001
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0,9955	0,9999
Coefficiente de determinación ajustado ( $r^2$ ajustado)	0,9947	0,9998
Pendiente ( $\frac{\text{Área}}{\text{mg}}$ )	924234	147434
Incertidumbre pendiente ( $\frac{\text{Área}}{\text{mg}}$ )	25425	644
Intercepto (Área)	-4729928	-43592
Incertidumbre intercepto (Área)	2614610	60717
Ecuación	$A=924235 \cdot C_n \text{ (mg/L)} - 4729928$	$A=147434 \cdot C_n \text{ (mg/L)} - 43592$

**9.7. Cromatograma de los ácidos clorogénicos reportados para muestra de café *Coffea Arabica* mediante HPLC:**



**Figura A.7** Cromatograma obtenido mediante HPLC de los tiempo de retención según orden de elución de los ácidos clorogénicos presentes en café *Coffea arábica* (García & Quintana, 2008).

**9.8 Concentración de ácido clorogénico y cianidina 3-o-rutinosido en el estudio de almacenamiento de la broza de café deshidratada:**

**Cuadro A.5** Concentración de ácido clorogénico (mg/g) obtenida por HPLC a  $\lambda= 327$  nm de la broza de café deshidratada según bloque, tiempo de almacenamiento en meses, tipo de empaque y condición de almacenamiento.

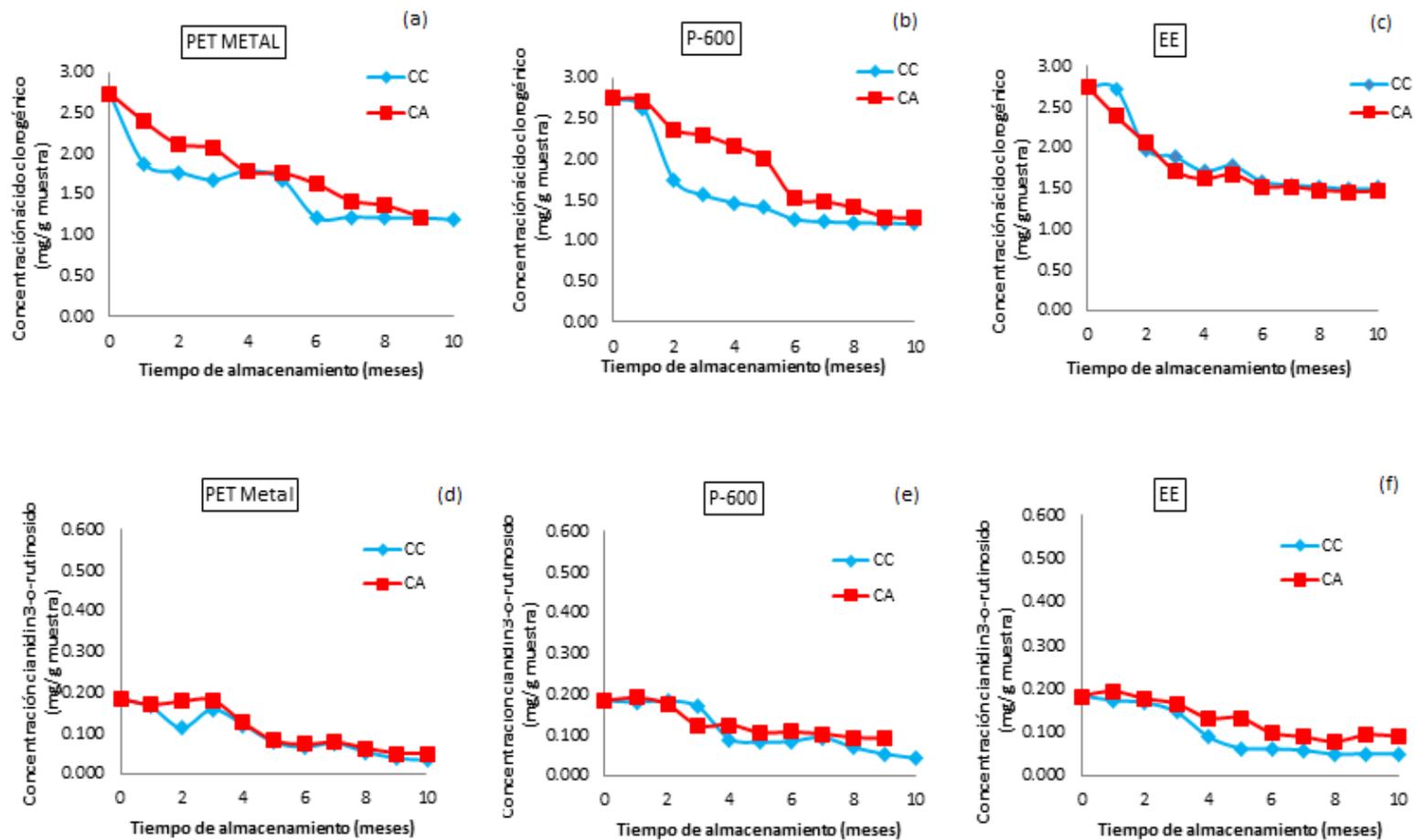
Tiempo almacenamiento (meses)	Concentración Ácido Clorogénico (mg/g muestra)																	
	Bloque 1						Bloque 2						Bloque 3					
	CC			CR			CC			CR			CC			CR		
	P-600	PETMetal	EE	P-600	PETMetal	EE	P-600	PETMetal	EE	P-600	PETMetal	EE	P-600	PETMetal	EE	P-600	PETMetal	EE
0	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	2.44	2.44	2.44	2.44	2.44	2.44
1	2.62	1.89	2.72	2.72	2.40	2.38	2.59	2.94	2.47	2.85	2.18	2.65	1.88	2.28	2.13	2.16	2.21	2.15
2	1.75	1.78	1.99	2.37	2.12	2.06	1.92	1.88	1.69	2.12	1.86	2.32	1.79	1.89	2.00	2.12	1.83	2.09
3	1.56	1.68	1.89	2.30	2.07	1.72	1.80	1.91	1.61	2.12	1.69	1.90	1.57	1.81	1.97	2.01	1.83	2.02
4	1.47	1.79	1.71	2.17	1.78	1.62	1.65	1.82	1.73	1.87	1.67	1.88	1.63	1.72	1.62	1.85	1.72	1.58
5	1.40	1.69	1.78	2.01	1.77	1.67	1.64	1.81	1.66	1.96	1.63	1.96	1.57	1.57	1.57	1.61	1.55	1.73
6	1.27	1.22	1.59	1.52	1.63	1.53	1.57	1.72	1.59	1.80	1.59	1.72	1.42	1.43	1.45	1.47	1.56	1.67
7	1.23	1.22	1.54	1.49	1.42	1.52	1.55	1.66	1.56	1.77	1.60	1.63	1.33	1.27	1.08	1.37	1.38	1.67
8	1.22	1.21	1.52	1.41	1.36	1.48	1.53	1.55	1.57	1.66	1.40	1.61	1.28	1.15	1.08	1.33	1.30	1.50
9	1.22	1.21	1.49	1.30	1.23	1.46	1.44	1.50	1.54	1.53	1.38	1.58	1.19	1.11	1.18	1.23	1.28	1.40
10	1.21	1.19	1.50	1.28	1.22	1.47	1.42	1.48	1.51	1.50	1.37	1.56	1.20	1.09	1.17	1.21	1.25	1.39

**Nota:** CC= condiciones controladas; CA= Condiciones reales.

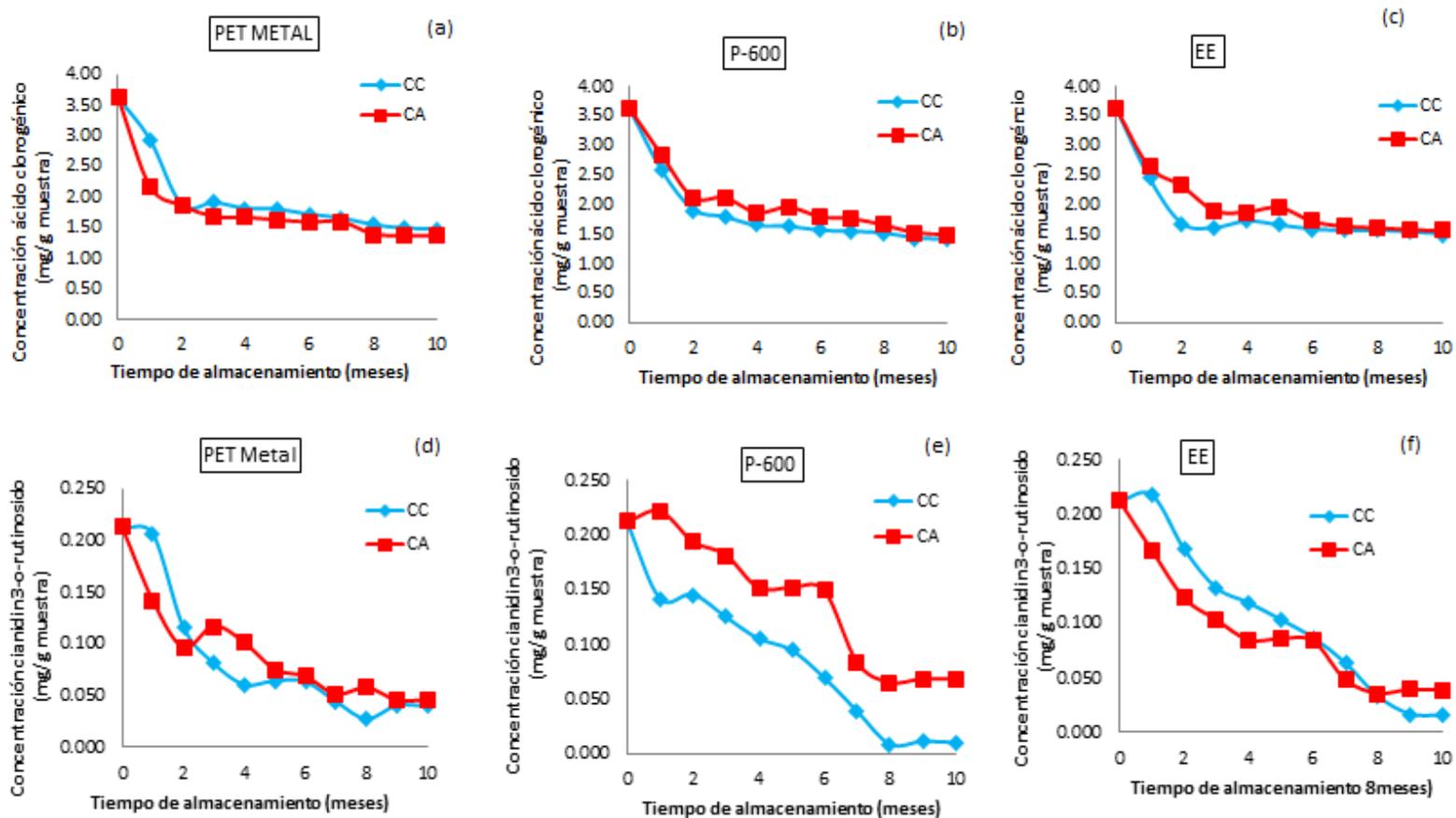
**Cuadro A.6** Concentración de cianidina 3-o-rutinosido (mg/g) obtenida por HPLC a  $\lambda = 512$  nm de la broza de café deshidratada según bloque, tiempo de almacenamiento en meses, tipo de empaque y condición de almacenamiento.

□ Tiempo almacenamiento (meses)	Concentración cianidina 3-o-rutinosido (mg/g muestra)																	
	Bloque 1						Bloque 2						Bloque 3					
	CC			CR			CC			CR			CC			CR		
	P-600	PET Metal	EE	P-600	PET Metal	EE	P-600	PET Metal	EE	P-600	PET Metal	EE	P-600	PET Metal	EE	P-600	PET Metal	EE
0	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
1	0.18	0.16	0.17	0.19	0.17	0.19	0.40	0.48	0.51	0.42	0.50	0.50	0.14	0.21	0.22	0.22	0.14	0.17
2	0.18	0.11	0.17	0.18	0.18	0.18	0.40	0.45	0.46	0.41	0.44	0.49	0.15	0.12	0.17	0.19	0.10	0.12
3	0.17	0.16	0.15	0.12	0.18	0.17	0.41	0.41	0.38	0.40	0.40	0.42	0.13	0.08	0.13	0.18	0.12	0.10
4	0.09	0.12	0.09	0.13	0.13	0.13	0.38	0.38	0.36	0.39	0.39	0.40	0.11	0.06	0.12	0.15	0.10	0.09
5	0.08	0.08	0.06	0.11	0.08	0.13	0.37	0.39	0.33	0.39	0.43	0.38	0.09	0.06	0.10	0.15	0.08	0.09
6	0.09	0.07	0.06	0.11	0.07	0.10	0.32	0.37	0.27	0.36	0.38	0.36	0.07	0.06	0.09	0.15	0.07	0.08
7	0.09	0.08	0.06	0.10	0.08	0.09	0.22	0.31	0.21	0.32	0.31	0.29	0.04	0.04	0.06	0.08	0.05	0.05
8	0.07	0.05	0.05	0.09	0.06	0.08	0.19	0.27	0.17	0.26	0.28	0.20	0.01	0.03	0.03	0.07	0.06	0.04
9	0.05	0.04	0.05	0.09	0.05	0.09	0.17	0.24	0.16	0.24	0.26	0.18	0.01	0.04	0.02	0.07	0.05	0.04
10	0.04	0.03	0.05	0.08	0.05	0.09	0.17	0.23	0.16	0.24	0.26	0.18	0.01	0.04	0.02	0.07	0.05	0.04

Nota: CC= condiciones controladas; CR= Condiciones reales.



**Figura A.8** Variación del contenido de ácido clorogénico (a, b, c) y cianidina 3-o-rutinosido (d, e, f) en función del tipo de empaque, tiempo y condición de almacenamiento (CC y CR) de la broza de café deshidratada correspondiente al bloque uno.



**Figura A.9** Variación del contenido de ácido clorogénico (a, b, c) y cianidina 3-o-rutinosido (d, e, f) en función del tipo de empaque, tiempo y condición de almacenamiento (CC y CR) de la broza de café deshidratada correspondiente al bloque tres

## 9.9 Datos obtenidos mediante pruebas sensoriales

**Cuadro A.7** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del sabor en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones controladas para los respectivos bloques y tipos de empaque.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del sabor más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
			Muestra control	Muestra almacenada					
1	0-B1 vs B1-EE (par 1)	2		X	27	<0,001	0,90	1,82	Hay diferencias significativas
		4		X	23	0.005	0,77	1,05	Hay diferencias significativas
		6		X	26	<0,001	0,87	1,60	Hay diferencias significativas
		8	X		21	0,043	0,70	0,75	Hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-PET Metal (par 2)	2	X		18	0,362	0.60	0,51	No hay diferencias significativas
		4	X		23	0.005	0,77	1,05	Hay diferencias significativas
		6		X	21	0.043	0.70	0.75	Hay diferencias significativas
		8		X	26	<0,001	0.87	1.60	Hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-P600 (par 3)	2		X	19	0.200	0.63	0.47	No hay diferencias significativas
		4	X		22	0,016	0.733	0,88	Hay diferencias significativas
		6		X	16	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas
		8	X		25	<0,001	0.83	1.35	Hay diferencias significativas
2	0-B2 vs B2-EE (par 1)	2	X		16	0,856	0,53	1,50	No hay diferencias significativas
		4	X		20	0,099	0,66	0,59	No hay diferencias significativas
		6		X	27	<0,001	0.90	1.82	Hay diferencias significativas
		8	X		30	<0,001	1,00	5,19	Hay diferencias significativas
	0-B2 vs B2-PET Metal (par 2)	2	X		26	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas
		4		X	26	<0,001	0.87	1.60	Hay diferencias significativas
		6		X	28	<0,001	0.93	2.09	Hay diferencias significativas
		8		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
	0-B2 vs B2-P600 (par3)	2	X		16	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas
		4	X		25	<0,001	0.83	1.35	Hay diferencias significativas
		6		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
		8	X		25	<0,001	0.83	1.35	Hay diferencias significativas

<sup>1</sup>Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores. <sup>2</sup>Ennis, 1993( $\alpha=0,05$ ). <sup>3</sup>Resultado con base en mínimo de aciertos para  $\alpha=0,05$  (Ennis, 2013).

**Continuación Cuadro A.7** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas para la evaluación del sabor en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones controladas para los respectivos bloques y tipo de empaque.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Mes de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del sabor más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
			Muestra control	Muestra almacenada					
3	0-B3 vs B3-EE (par 1)	2	X		24	0,001	0.80	1.19	Hay diferencias significativas
		4		X	28	-	0.93	2.09	Hay diferencias significativas
		6		X	19	0.200	0.63	0.47	No hay diferencias significativas
		8	X		26	<0,001	0.87	1.60	Hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-PET Metal (par 2)	2	X		24	0,001	0.80	1.19	Hay diferencias significativas
		4		X	16	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas
		6		X	20	0.099	0.67	0.63	No hay diferencias significativas
		8	X		24	0,001	0.80	1.19	Hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-P-600 (par 3)	2	X		27	<0,001	0.90	1.82	Hay diferencias significativas
		4	X		23	0.005	0,77	1,05	Hay diferencias significativas
		6	X		21	0.043	0.70	0.75	Hay diferencias significativas
		8	X		20	0,099	0,66	0,59	No hay diferencias significativas

<sup>1</sup>Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores. <sup>2</sup>Ennis, 1993( $\alpha=0,05$ ). <sup>3</sup>Resultado con base en mínimo de aciertos para  $\alpha=0,05$  (Ennis, 2013)

**Cuadro A.8** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del sabor en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones reales para los respectivos bloques y tipos de empaque. Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del sabor más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
			Muestra control	Muestra almacenada					
1	0-B1 vs B1-EE (par 4)	2		X	17	0.585	0.57	0.25	No hay diferencias significativas
		4		X	22	0.016	0.73	0.87	Hay diferencias significativas
		6		X	27	<0,001	0.90	1.82	Hay diferencias significativas
		8	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-PET Metal (par 5)	2	X		19	0,200	0.63	0,47	No hay diferencias significativas
		4	X		23	0,005	0.77	1,15	Hay diferencias significativas
		6		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
		8		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-P600 (par 6)	2		X	25	<0,001	0.83	1.35	Hay diferencias significativas
		4	X		25	<0,001	0.83	1,35	Hay diferencias significativas
		6		X	19	0.200	0.63	0.47	No hay diferencias significativas
		8	X		24	0,001	0.80	1,20	Hay diferencias significativas
2	0-B2 vs B2-EE (par 4)	2		X	27	<0,001	0.90	1,82	Hay diferencias significativas
		4	X		28	<0,001	0.93	2,10	Hay diferencias significativas
		6		X	28	<0,001	0.93	2.09	Hay diferencias significativas
		8	X		19	<0,001	0.63	0,47	No hay diferencias significativas
	0-B2 vs B2-PET Metal (par 5)	2		X	16	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas
		4		X	26	<0,001	0.87	1.60	Hay diferencias significativas
		6		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
		8		X	26	<0,001	0.87	1.60	Hay diferencias significativas
	0-B2 vs B2-P600 (par 6)	2		X	20	0.099	0.67	0.63	No hay diferencias significativas
		4	X		28	<0,001	0.93	2,10	Hay diferencias significativas
		6		X	28	<0,001	0.93	2.09	Hay diferencias significativas
		8	X		20	0,099	0.67	0,62	No hay diferencias significativas

<sup>1</sup>Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores. <sup>2</sup>Ennis, 1993( $\alpha=0,05$ ). <sup>3</sup>Resultado con base en mínimo de aciertos para  $\alpha=0,05$  (Ennis, 2013)

**Continuación Cuadro A.8** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del sabor en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones reales para los respectivos bloques y tipos de empaque. Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del sabor más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
			Muestra control	Muestra almacenada					
3	0-B3 vs B3-EE (par 4)	2	X		23	0,005	0.77	1,05	Hay diferencias significativas
		4		X	26	<0,001	0.87	1,60	Hay diferencias significativas
		6	X		26	<0,001	0.87	1,60	Hay diferencias significativas
		8	X		23	0,005	0.77	1,05	Hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-PET Metal (par 5)	2	X		26	<0,001	0.87	1,05	Hay diferencias significativas
		4	X		16	0,856	0.453	0,11	No hay diferencias significativas
		6	X		20	0,099	0.67	0,62	Hay diferencias significativas
		8		X	28	<0,001	0.93	1,99	Hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-P600 (par 6)	2	X		18	0,200	0.60	0,51	No hay diferencias significativas
		4	X		23	<0,001	0.77	1,05	Hay diferencias significativas
		6		X	19	0.200	0.63	0.47	No hay diferencias significativas
		8	X		19	0.200	0.63	0.47	No hay diferencias significativas

<sup>1</sup>Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores. <sup>2</sup>Ennis, 1993( $\alpha=0,05$ ). <sup>3</sup>Resultado con base en mínimo de aciertos para  $\alpha=0,05$  (Ennis, 2013)

**Cuadro A.9** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del color en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones controladas para los respectivos bloques y tipos de empaque.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del color más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>	
			Muestra control	Muestra almacenada						
1	0-B1 vs B1-EE (par 1)	2	X		23	0,005	0,77	1,05	Hay diferencias significativas	
		4	X		28	<0,001	0,93	2,09	Hay diferencias significativas	
		6		X	19	0.200	0,63	0.47	No hay diferencias significativas	
		8		X	28	<0,001	0,93	2.09	Hay diferencias significativas	
	0-B1 vs B1-PET Metal (par 2)	2			X	23	0.005	0.77	1.05	Hay diferencias significativas
		4	X			29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas
		6	X			29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas
		8	X			19	0,200	0.63	0,47	No hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-P600 (par 3)	2	X			29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas
		4	X			24	0,001	0.80	1,19	Hay diferencias significativas
		6		X		30	<0,001	1.00	5.19	Hay diferencias significativas
		8		X		30	<0,001	1.00	5.19	Hay diferencias significativas
2	0-B2 vs B2-EE (par 1)	2		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas	
		4	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas	
		6		X	30	<0,001	1.00	5.19	Hay diferencias significativas	
		8	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas	
	0-B2 vs B2-PET Metal (par 2)	2		X	30	<0,001	1.00	5.19	Hay diferencias significativas	
		4		X	16	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas	
		6	X		20	0,099	0.67	0,62	No hay diferencias significativas	
		8		X	18	0.362	0.60	0.36	No hay diferencias significativas	

**Continuación Cuadro A.9** Grado de diferencia (d') obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del color en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones controladas para los respectivos bloques y tipos de empaque.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del color más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	d' Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
			Muestra control	Muestra almacenada					
3	0-B3 vs B3-EE (par 1)	2		X	27	<0,001	0.90	1.82	Hay diferencias significativas
		4		X	22	0.016	0.73	0.87	Hay diferencias significativas
		6		X	24	0.001	0.80	1.19	Hay diferencias significativas
		8	X		29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-PET Metal (par 2)	2	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		4	X		23	0,016	0.77	1,15	Hay diferencias significativas
		6		X	30	<0,001	1.00	5.19	Hay diferencias significativas
		8	X		25	<0,001	0.83	1,35	Hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-P600 (par 3)	2	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		4	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		6		X	28	<0,001	0.93	2.09	Hay diferencias significativas
		8	X		29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas

<sup>1</sup>Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores. <sup>2</sup>Ennis, 1993( $\alpha=0,05$ ). <sup>3</sup>Resultado con base en mínimo de aciertos para  $\alpha=0,05$  (Ennis, 2013)

**Cuadro A.10** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del color en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones reales para los respectivos bloques y tipos de empaque.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del color más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
			Muestra control	Muestra almacenada					
1	0-B1 vs B1-EE (par 4)	2	X		29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas
		4		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
		6	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		8	X		24	0,001	0.80	1,19	Hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-PET Metal (par 5)	2	X		23	0,005-	0.77	1,05	Hay diferencias significativas
		4		X	20	0.099	0.67	0.63	No hay diferencias significativas
		6		X	30	<0,001	1.00	5.19	Hay diferencias significativas
		8	X		15	>0,856	0.50	0.00	No hay diferencias significativas
	0-B1 vs B1-P600 (par 6)	2		X	29	<0,001	0.97	2.66	Hay diferencias significativas
		4	X		27	<0,001	0.90	1,82	Hay diferencias significativas
		6	X		25	<0,001	0.83	1,35	Hay diferencias significativas
		8		X	20	0.099	0.67	0.63	No hay diferencias significativas
2	0-B2 vs B2-EE (par 4)	2	X		24	0,001	0.80	1,19	Hay diferencias significativas
		4	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		6		X	16	0.856	0.53	0.11	No hay diferencias significativas
		8	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
	0-B2 vs B2-PET Metal (par 5)	2	X		24	0,001	0.80	1,19	Hay diferencias significativas
		4		X	28	<0,001	0.93	2,09	Hay diferencias significativas
		6		X	19	0.200	0.63	0,47	No hay diferencias significativas
		8			29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas

**Continuación Cuadro A.10** Grado de diferencia ( $d'$ ) obtenidos mediante prueba de diferenciación 2-AFC, 30 jueces, 2 colas, para la evaluación del color en muestras de broza de café deshidratadas y almacenada en condiciones reales para los respectivos bloques y tipos de empaque.

Número de BLOQUE	Muestra analizadas	Meses de almacenamiento	Muestras seleccionada como la del color más fuerte		Aciertos obtenidos <sup>1</sup>	Probabilidad exacta	Proporción de aciertos	$d'$ Ennis <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>	
			Muestra control	Muestra almacenada						
3	0-B3 vs B3-EE (par 4)	2	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas	
		4		X	30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas	
		6	X		30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas	
		8	X		29	<0,001	0.97	2,66	Hay diferencias significativas	
	0-B3 vs B3-PET Metal (par 5)	2			X	26	<0,001	0.87	1.60	Hay diferencias significativas
		4	X			30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		6	X			30	<0,001	1.00	5,19	Hay diferencias significativas
		8			X	18	0.362	0.60	0.36	No hay diferencias significativas
	0-B3 vs B3-P600 (par 6)	2			X	15	>0,856	0.50	0.00	No hay diferencias significativas
		4			X	21	0.043	0.70	0.75	Hay diferencias significativas
		6	X			27	<0,001	0.90	1,82	Hay diferencias significativas
		8			X	26	<0,001	0.87	1.6	Hay diferencias significativas

<sup>1</sup>Aciertos obtenidos corresponde a la categoría con mayor número de consumidores. <sup>2</sup>Ennis, 1993( $\alpha=0,05$ ). <sup>3</sup>Resultado con base en mínimo de aciertos para  $\alpha=0,05$  (Ennis, 2013)

### 9.10 Resultados microbiológicos:

**Cuadro A.11** Resultados obtenidos de los recuento totales de mohos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales en broza de café deshidratada almacenada según bloque, tipo de empaque, condición y tiempo de almacenamiento (cero y diez meses).

Bloque	Tipo de Empaque	Condición de Almacenamiento	Tiempo almacenamiento = 0 meses			Tiempo almacenamiento= 10 meses		
			Mohos y Levaduras (UFC/g)	Coliformes Totales (UFC/g)	Coliformes Fecales (UFC/g)	Mohos y Levaduras (UFC/g)	Coliformes Totales (UFC/g)	Coliformes Fecales (UFC/g)
1	EE	CR	1.50 x10 <sup>1</sup>	6.50 x10 <sup>1</sup>	<10	1.50x10 <sup>1</sup>	8.50 x10 <sup>1</sup>	<10
		CC				2.50 x10 <sup>1</sup>	1.10 x10 <sup>2</sup>	
	P-600	CR				2.50 x10 <sup>1</sup>	8.50 x10 <sup>1</sup>	
		CC				2.00 x10 <sup>1</sup>	1.10 x10 <sup>2</sup>	
	PET Metal	CR				2.00 x10 <sup>1</sup>	9.00 x10 <sup>1</sup>	
		CC				3.50 x10 <sup>1</sup>	9.50 x10 <sup>1</sup>	
2	EE	CR	1.50 x10 <sup>1</sup>	3.50 x10 <sup>1</sup>	<10	2.00 x10 <sup>1</sup>	4.50 x10 <sup>1</sup>	<10
		CC				2.00 x10 <sup>1</sup>	7.00 x10 <sup>1</sup>	
	P-600	CR				1.50 x10 <sup>1</sup>	<10	
		CC				2.00 x10 <sup>1</sup>	4.50 x10 <sup>1</sup>	
	PET Metal	CR				2.50 x10 <sup>1</sup>	5.50 x10 <sup>1</sup>	
		CC				3.00 x10 <sup>1</sup>	8.00 x10 <sup>1</sup>	
3	EE	CR	2.00 x10 <sup>1</sup>	8.50 x10 <sup>1</sup>	<10	3.50 x10 <sup>1</sup>	9.50 x10 <sup>1</sup>	<10
		CC				6.00 x10 <sup>1</sup>	1.10 x10 <sup>2</sup>	
	P-600	CR				3.50 x10 <sup>1</sup>	9.50 x10 <sup>1</sup>	
		CC				2.50 x10 <sup>1</sup>	1.10E x10 <sup>2</sup>	
	PET Metal	CR				4.00 x10 <sup>1</sup>	9.00 x10 <sup>1</sup>	
		CC				3.00 x10 <sup>1</sup>	1.10 x10 <sup>2</sup>	

Nota: CC= condiciones controladas; CR= Condiciones reales.

**Cuadro A.12** Crecimiento logarítmico del recuento de mohos y levaduras y recuento de coliformes totales obtenidos en función del bloque, tipo de empaque y condición de almacenamiento de la broza de café deshidratada.

Bloque	Tipo de Empaque	Condición de Almacenamiento	Crecimiento Logarítmico	
			Mohos y levaduras (Log UFC/g $\pm$ 0,12)	Coliformes Totales (Log UFC/g $\pm$ 0,09)
1	EE	CR	0,00	0,12
		CC	0,22	0,23
	P-600	CR	0,22	0,12
		CC	0,12	0,23
	PET Metal	CR	0,12	0,14
		CC	0,37	0,16
2	EE	CR	0,12	0,11
		CC	0,12	0,30
	P-600	CR	0,00	0,00
		CC	0,12	0,11
	PET Metal	CR	0,22	0,20
		CC	0,30	0,36
3	EE	CR	0,24	0,05
		CC	0,48	0,11
	P-600	CR	0,24	0,05
		CC	0,10	0,11
	PET Metal	CR	0,30	0,02
		CC	0,18	0,11

Nota: CR=condición real de almacenamiento; CC=condición controlada de almacenamiento.