

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

Proyecto presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**Valorización de la pulpa de café (*Coffea arabica*) mediante la extracción de ácidos
hidroxicinámicos y clorogénicos**

Johan Jiménez Arias

Carné: B03214

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

Diciembre del 2016

TRIBUNAL EXAMINADOR

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

Elaborado por: Johan Jiménez Arias

Aprobado por:



M. Sc. Laura Arroyo Esquivel

Presidente del Tribunal



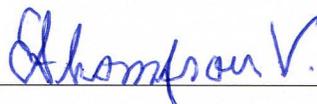
Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal

Directora del Proyecto



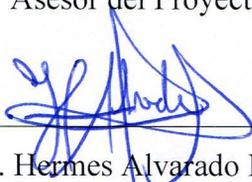
Dr. Fabrice Vaillant Barka

Asesor del Proyecto



Ing. Eduardo Thompson Vicente

Asesor del Proyecto



M. Sc. Hermes Alvarado Montero

Profesor Designado

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

El presente documento posee confidencialidad parcial con respecto a los preparados enzimáticos empleados, y todo aspecto relevante relacionado con estos y su uso (marca, nombre comercial, dosis).

DEDICATORIA

A mi papá, mi mamá y mis hermanas

A mi novia y mis amigos

“Eso es la investigación, es abrir una puerta sin saber qué hay del otro lado, podemos plantear hipótesis, pero no sabemos realmente que hay”

Ana Mercedes Pérez Carvajal.

AGRADECIMIENTOS

A mi papá y mi mamá, porque sin ellos no estaría aquí ni sería lo que soy, por su amor y por todo.

A mis hermanas Nicole y Mariana, por existir, su amor y porque me enseñan a ser mejor ser humano.

A Maria, por su afecto, su compañía, su apoyo, su ayuda y su paciencia, entre otros.

A mi padrino, por ser mi segundo papá y estar siempre ahí.

A mis amigos “BDM” porque sin ellos estos últimos años de universidad simplemente no hubiesen sido lo que fueron, innumerables experiencias llenas siempre de risas.

A la profe Ana Mercedes, por sus consejos llenos de sabiduría al final de cada reunión.

Al profe Thompson, por su ayuda incondicional y sus interesantes conversaciones.

A Fabrice por sus aportes en el desarrollo del proyecto.

A Camacho y Alonso, porque sin su ayuda con la recolección de la materia prima este proyecto nunca hubiese sido posible. Y por su gran ayuda a lo largo de la carrera.

A Vane y Ana por su ayuda como asistentes del asistente, por su espléndida labor determinando polifenoles y por su compañía y conversaciones.

A Graciela y Carolina, por su invaluable ayuda y apoyo. A Eduardo, por tener siempre esa actitud positiva e igualmente su invaluable ayuda y disposición. A Silvia, Randall y Deysi, por su apoyo en el trabajo en el laboratorio. Y a todos, por brindar un ambiente de trabajo excelente y aceptarnos a tesarios y asistentes con una sonrisa y disposición.

A Luis y Giova, por su ayuda en el trabajo en el laboratorio.

A los colaboradores del beneficio Coope-Unión, por su ayuda en la recolección de la materia prima.

A todo aquel que de una u otra forma se vio involucrado en el proyecto.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), a la Escuela de Tecnología de Alimentos y a la Universidad de Costa Rica.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| TRIBUNAL EXAMINADOR..... | ii |
| DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | vi |
| ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMEN | xv |
| I. JUSTIFICACIÓN..... | 1 |
| II. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1 Objetivo general | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 3 |
| III. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 3.1 Botánica, cultivo y procesamiento del café..... | 4 |
| 3.2 Uso de subproductos del procesamiento del café | 5 |
| 3.3 Compuestos funcionales presentes en el café | 7 |
| 3.4 Enzimas endógenas de la pulpa del café | 10 |
| 3.5 Dióxido de azufre (SO ₂) y sulfitos | 12 |
| 3.6 Extracción de compuestos funcionales | 14 |
| 3.7 Cuantificación de los ácidos hidroxycinámicos y clorogénicos | 15 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 4.1 Localización del proyecto | 17 |
| 4.2 Materia prima..... | 17 |
| 4.3 Equipos..... | 17 |
| 4.4 Pruebas definitivas | 19 |

| | |
|--|----|
| Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café..... | 19 |
| Caracterización de la composición fisicoquímica de la pulpa de café | 24 |
| Evaluación de distintos métodos enzimáticos para la extracción de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café..... | 25 |
| Determinación de la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café adicionada con metabisulfito de sodio tras su procesamiento y almacenamiento en distintas condiciones..... | 36 |
| 4.5 Métodos de análisis fisicoquímicos | 39 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 42 |
| 5.1 Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café. | 42 |
| 5.2 Caracterización de la composición fisicoquímica de la pulpa de café..... | 52 |
| 5.3 Evaluación de distintos métodos enzimáticos para la extracción de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café | 56 |
| 5.4 Determinación de la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café adicionada con metabisulfito de sodio durante el almacenamiento a temperatura ambiente y procesamiento bajo dos distintas condiciones (empacado al vacío y secado con aire caliente) | 66 |
| VI. CONCLUSIONES | 71 |
| VII. RECOMENDACIONES | 72 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 73 |
| IX. ANEXO | 86 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro I. Equipos empleados para las distintas pruebas desarrolladas. | 17 |
| Cuadro I (Continuación). Equipos empleados para las distintas pruebas desarrolladas..... | 18 |
| Cuadro II. Gradiente de fase móvil empleado para el análisis de los compuestos de interés..... | 20 |
| Cuadro III. Fechas de recolección de pulpa de café empleada para el análisis de su composición..... | 24 |
| Cuadro IV. Características principales de los preparados enzimáticos empleados durante la maceración enzimática de la pulpa de café..... | 26 |
| Cuadro V. Imágenes de pulpa triturada mediante tres sistemas distintos para la selección del método de reducción de tamaño. | 26 |
| Cuadro VI. Tratamientos evaluados para la determinación del efecto del tratamiento enzimático sobre la extracción de los compuestos de interés en la pulpa de café. | 27 |
| Cuadro VII. Reactivos empleados para la evaluación espectrofotométrica de la actividad de la polifenoloxidasa endógena..... | 31 |
| Cuadro VIII. Tratamientos evaluados para la determinación del efecto del tratamiento enzimático sobre la extracción de los compuestos de interés en pulpa de café seca tratada con metabisulfito de sodio. | 34 |
| Cuadro IX. Parámetros obtenidos a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración de los compuestos evaluados. | 45 |
| Cuadro X. Límites de detección y cuantificación para los compuestos evaluados. | 46 |
| Cuadro XI. Contenido de compuestos de interés obtenidos tras la adición de distintos agentes precipitantes. | 47 |
| Cuadro XII. Porcentajes de recuperación promedio obtenidos para los compuestos de interés analizados mediante el método desarrollado..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Cuadro XIII. Porcentajes de recuperación recomendados para la validación de métodos de análisis | 49 |
| Cuadro XIV. Desviación estándar relativa obtenida para el contenido de los compuestos de interés presentes en el jugo y la pulpa seca. | 50 |
| Cuadro XV. Porcentajes de desviación estándar relativa recomendados para la validación de métodos de análisis | 51 |
| Cuadro XVI. Caracterización fisicoquímica de la pulpa de café recolectada a lo largo de la cosecha. | 53 |
| Cuadro XVI (Continuación). Caracterización fisicoquímica de la pulpa de café recolectada a lo largo de la cosecha. | 54 |
| Cuadro XVII. Parámetros obtenidos a partir del análisis de varianza para la degradación del C5Q y la formación de productos de la PPO. | 59 |
| Cuadro XVIII. Variación en el contenido del C5Q tras 70 min de maceración enzimática con Viscozym L de la pulpa adicionada con Na ₂ S ₂ O ₅ | 62 |
| Cuadro XIX. Variación en el contenido de C5Q presente en la pulpa de café tras la adición de 0,5 % de Na ₂ S ₂ O ₅ | 66 |
| Cuadro XX. Variación en el contenido de C5Q presente en la pulpa de café adicionada con 0,5 % de Na ₂ S ₂ O ₅ tras su procesamiento mediante dos distintas condiciones y su almacenamiento a temperatura ambiente durante 40 días. | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura del fruto de café | 4 |
| Figura 2. Estructuras de los principales ácidos hidroxicinámicos encontrados en el café. | 7 |
| Figura 3. Estructuras de los principales ácidos clorogénicos encontrados en el café..... | 8 |
| Figura 3 (Continuación). Estructuras de los principales ácidos clorogénicos encontrados en el café..... | 9 |
| Figura 4. Reacciones básicas catalizadas por la polifenoloxidasa..... | 11 |
| Figura 5. Mecanismos de reacción entre el ión sulfito y diversos grupos funcionales..... | 13 |
| Figura 6. Diagrama del proceso para la determinación del porcentaje de recuperación. | 23 |
| Figura 7. Diagrama del proceso de maceración enzimática sobre pulpa de café fresca para la extracción de los compuestos de interés. | 29 |
| Figura 8. Diagrama del proceso para la determinación de la actividad de la polifenoloxidasa endógena de la pulpa de café. | 32 |
| Figura 9. Diagrama del proceso de maceración enzimática sobre pulpa seca, adicionada con metabisulfito de sodio, para la extracción de los compuestos de interés..... | 35 |
| Figura 10. Diagrama del proceso para la determinación de la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico a lo largo del proceso de estabilización y almacenamiento de la pulpa..... | 37 |
| Figura 11. Cromatogramas de los patrones de FA, CA y C5Q analizados y sus respectivos tiempos de retención. | 42 |
| Figura 12. Curva de calibración para el ácido 5-cafeoilquínico..... | 43 |
| Figura 13. Curva de calibración para el ácido cafeico..... | 44 |
| Figura 14. Curva de calibración para el ácido ferúlico..... | 44 |
| Figura 15. Relación entre el tiempo de maceración enzimática y la variación promedio (n=2) en el contenido de C5Q..... | 57 |
| Figura 16. Relación entre el tiempo de maceración enzimática y la variación en la turbidez promedio (n=2) | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Absorbancias promedio del C5Q (n=3) (◆ pulpa adicionada con 0,5% de Na ₂ S ₂ O ₅ , ■ pulpa control) y absorbancias promedio de los productos de la PPO (n=3) (▲ pulpa control, ● pulpa adicionada con 0,5 % de Na ₂ S ₂ O ₅). | 60 |
| Figura 18. Efecto del metabisulfito de sodio sobre el pardeamiento de la pulpa de café..... | 61 |
| Figura 19. Cromatogramas asociados a una muestra control durante la maceración enzimática | 63 |
| Figura 20. Espectros de absorción asociados al C5Q (A) y al compuesto desconocido (B)..... | 64 |
| Figura 21. Cromatograma obtenido del análisis de un extracto de café verde con la identificación del ácido cafeico y distintos ácidos clorogénicos | 65 |
| Figura 22. Propuesta del proceso para la extracción de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos de la pulpa de café. | 68 |

ABREVIATURAS

| | | | |
|---------------|--|-----------------------|---------------------------------|
| ANDEVA | Análisis de varianza | mL | Mililitros |
| Conc | Concentración | s | Segundos |
| psi | Libras por pulgada cuadrada | rpm | Revoluciones por minuto |
| EGU | Unidades de endoglucanasa | SIS | Sólidos insolubles suspendidos |
| FBG | Unidades de β -glucanasa fúngica | SS | Sólidos solubles |
| g | Gravedad | T | Temperatura |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución | t | Tiempo |
| h | Horas | P | Presión |
| ppm | Partes por millón | ° C | Grados Celsius |
| min | Minutos | ° | Grados |
| msnm | Metros sobre nivel del mar | % | Porcentaje |
| g | Gramos | nm | Nanómetros |
| NTU | Unidades nefelométricas de turbidez | PPO | Polifenoloxidasa |
| ORAC | Capacidad de absorción de radicales de oxígeno | PVP | Polivinilpirrolidona |
| p | Probabilidad | C5Q | Ácido 5-cafeoilquínico |
| PECTU | Unidades enzimáticas de pectinasa | C3Q | Ácido 3-cafeoilquínico |
| H | Humedad | C4Q | Ácido 4-cafeoilquínico |
| kHz | kilohertz | FA | Ácido ferúlico |
| pH | Potencial de hidronio | CA | Ácido caféico |
| mM | Milimolar | LD | Límite de detección |
| BS | Base seca | LQ | Límite de cuantificación |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico | p_{fa} | Probabilidad de falta de ajuste |
| | | TE | Equivalentes de Trolox |

RESUMEN

Se desarrolló un método de análisis cromatográfico para la cuantificación del contenido de dos ácidos hidroxicinámicos, ácido cafeico (CA) y ácido ferúlico (FA) y un ácido clorogénico, el ácido 5-cafeoilquínico (C5Q), presentes en los extractos líquidos obtenidos de la pulpa de café, para lo cual se evaluaron distintos agentes precipitantes para la remoción de material coloidal, definiéndose como más adecuado el cloruro de sodio (40 g/L). Se determinaron los límites de detección, 2,36; 2,25 y 2,18 ppm, y los límites de cuantificación, 7,88; 7,49 y 7,27 ppm, para los patrones de C5Q, CA y FA respectivamente. Finalmente se determinaron los parámetros de recuperación, obteniéndose valores de $(93,6 \pm 5,8) \%$, $(92,2 \pm 5,2) \%$ y $(89,3 \pm 4,3) \%$ respectivamente, así como la precisión para el ácido 5-cafeoilquínico, siendo de 1,31 % de acuerdo con la desviación estándar relativa.

Se caracterizó de manera fisicoquímica la pulpa de café recolectada en cinco momentos distintos de la cosecha, sin obtenerse patrones comunes en las distintas variables analizadas a lo largo de la cosecha, evidenciándose de esta manera una amplia variabilidad en la composición de la pulpa de café obtenida como subproducto del beneficiado. A pesar de lo anterior, la mayoría de los promedios obtenidos para las variables evaluadas presentan concordancia con información reportada en la literatura.

Se evaluó el efecto de tres preparados enzimáticos comerciales (C, V y U) sobre la liberación del ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café fresca, obteniéndose una degradación de dicho compuesto a lo largo de la maceración enzimática. Tras evaluar la actividad de la polifenoloxidasas endógena en la pulpa fresca, se evidencia la actividad de dicha enzima como una de las principales causas de la degradación del ácido 5-cafeoilquínico.

Se valoró el efecto de la adición de 0,5 % m/m de metabisulfito de sodio sobre la inactivación de la polifenoloxidasas endógena en la pulpa fresca, comprobándose su efectividad. Una vez establecida la efectividad del metabisulfito de sodio para la inactivación enzimática, se evaluó nuevamente el efecto del tratamiento enzimático, en este caso sobre pulpa seca previamente sulfitada, obteniéndose una reducción del ácido 5-cafeoilquínico, asociada probablemente a la isomerización de dicho compuesto.

Finalmente se determinó la efectividad de la adición de metabisulfito de sodio sobre pulpa de café fresca para evitar la degradación del ácido 5-cafeoilquínico a lo largo del almacenamiento a temperatura ambiente en dos condiciones distintas (empacado al vacío y secado con aire caliente), demostrándose una menor degradación con la adición de metabisulfito, indistintamente de su método de almacenamiento. Adicionalmente no se obtuvieron diferencias entre los efectos de ambos métodos de almacenamiento sobre la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico.

I. JUSTIFICACIÓN

El café corresponde al producto agrícola tropical más comercializado a nivel mundial, plantándose en más de 70 países, donde alcanza valores de producción de cerca de 8,5 millones de toneladas de café verde en 2014, según la Organización Internacional del Café (ICO, 2015). En el caso de Costa Rica, el café representa el 12,3 % de las exportaciones del sector agrícola, con un valor asociado de 305 millones de dólares, ubicándose en el tercer lugar precedido del banano y la piña, para el periodo 2012-2013 de acuerdo con la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (2014), lo cual demuestra la importancia de dicho producto tanto a nivel nacional como internacional.

El café como producto terminado es obtenido a partir de las semillas tostadas y molidas de los frutos de la planta, de manera que el procesamiento del café, o beneficiado, involucra la remoción de las capas superficiales del fruto, por lo que a causa de su estructura, las porciones actualmente no aprovechables representan más del 50% del mismo (Esquivel & Jiménez, 2012). Además, si se considera el residuo obtenido tras la preparación de la infusión, tanto el procesamiento como el consumo de café implica la generación de gran cantidad de subproductos. Esto, aunado a la elevada producción resulta en un importante impacto ambiental, considerando que dichos subproductos son normalmente empleados como fertilizante orgánico, a pesar de la elevada demanda de oxígeno requerida para su descomposición, debida al alto contenido de compuestos fenólicos, cafeína y taninos (Mussato *et al.*, 2011).

En las últimas décadas se han realizado gran cantidad de investigaciones sobre el contenido de compuestos con propiedades funcionales presentes en el café, tanto para la bebida obtenida por extracción, como para el grano verde; además de haberse estudiado la variación en su composición generada por la localización geográfica de los cultivos, los distintos grados de tueste del grano e inclusive la manera de preparación de la bebida (Delgado *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Cämmerer & Kroh, 2006; Farah *et al.*, 2006; Parras *et al.*, 2007; Sánchez, 2007; Fujioka & Shibamoto, 2008; López & de Peña, 2008; Moon *et al.*, 2009; Sacchetti *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2010; Liu & Kitts, 2011).

Los compuestos con propiedades funcionales han presentado un importante auge desde la década de los años 90, dando origen desde entonces a una de las tendencias más importantes de la industria alimentaria, los alimentos funcionales, los cuales poseen beneficios a la salud más allá de su valor nutricional, característica que se presenta de forma natural o tras la incorporación de compuestos funcionales (Galland, 2014).

De acuerdo con investigaciones recientes sobre la composición y presencia de compuestos con propiedades funcionales en las demás porciones no aprovechadas del fruto de café, se resalta la necesidad de investigación dirigida a ser la base para el desarrollo de procesos industriales que permitan la valorización de estos subproductos.

En la composición de la pulpa de café, la cual es actualmente un subproducto del procesamiento, resaltan cantidades apreciables de compuestos como ácidos clorogénicos, ácidos hidroxicinámicos y cafeína (Murthy & Naidu, 2012). Los ácidos clorogénicos son compuestos fenólicos reconocidos por su capacidad antioxidante, la cual ha sido ampliamente estudiada ya que se ha visto que posee efectos en la prevención de diabetes, arteriosclerosis y cáncer, volviéndolos de gran interés para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica (Sánchez *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2011).

Según Murugan *et al.* (2012), el uso de subproductos de la industria alimentaria para la obtención de compuestos funcionales y nutraceuticos corresponde a un prometedor campo industrial, y su aplicación permitiría la generación de una mayor gama de alimentos funcionales y novedosos. En dicha línea, el uso de enzimas juega un papel primordial, debido a que estas son normalmente empleadas ya sea para la extracción de compuestos funcionales, o para su obtención tras la transformación de los subproductos (Bhat & Sukumaran, 2012).

Finalmente, considerando los resultados encontrados por Martínez y Duvnjak (2006) y Bolaños (2015) sobre la degradación de los ácidos clorogénicos producto de la actividad de la enzima polifenoloxidasas, se encuentra la necesidad de buscar pretratamientos sobre la pulpa de café que permitan la inactivación de las enzimas endógenas, además de disminuir la carga microbiana, para reducir la degradación de los compuestos de interés en una etapa posterior de extracción.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Explorar las condiciones básicas necesarias para la obtención y cuantificación de un extracto de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos a partir de la pulpa de café.

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un método de análisis para la cuantificación de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café.
- Caracterizar la composición fisicoquímica de la pulpa de café para determinar su viabilidad en distintos tiempos de cosecha.
- Evaluar la aplicación de distintos métodos enzimáticos para la extracción de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café.
- Determinar la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café adicionada con metabisulfito de sodio durante el almacenamiento a temperatura ambiente y procesamiento bajo dos distintas condiciones (empacado al vacío y secado con aire caliente).

III. MARCO TEÓRICO

El cultivo del café ha formado parte esencial del desarrollo de Costa Rica modelando, desde su introducción a finales del siglo XVIII, aspectos culturales, económicos, agrícolas y sociales, entre otros (ICAFFE, 2016). Es incluso en la actualidad, uno de los principales productos agrícolas cultivados y comercializados, lo cual demuestra su gran importancia para el país.

3.1 Botánica, cultivo y procesamiento del café

El café como producto terminado es obtenido a partir de las semillas tostadas y molidas de los frutos de la planta proveniente de la familia *Rubiaceae*, género *Coffea* y especies *C. arabica* y *C. canephora* principalmente, además de *C. liberica* (Shyam & Chandrasekaran, 2012). Los frutos, como se observa en la figura 1, se encuentran formados por el pericarpio, que se divide en cáscara (epicarpio), pulpa y mucílago (mesocarpio), y el pergamino (endocarpio), el cual cubre cada una de las dos semillas (endospermos) por separado, al igual que una cuarta capa conocida como piel plateada (espermodermo); y finalmente en el interior de cada una de las semillas se encuentra el germen o embrión (Shyam & Chandrasekaran, 2012).

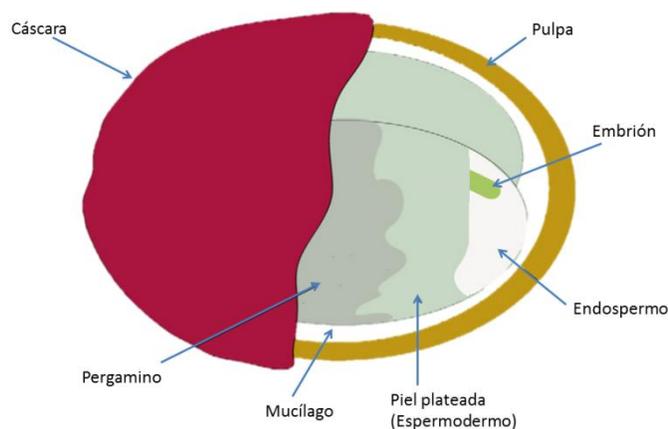


Figura 1. Estructura del fruto de café (adaptado de Esquivel & Jiménez, 2012).

El cultivo del café se desarrolla principalmente en zonas de suelo fértil de entre 500 y 1700 msnm, con precipitaciones entre los 1000 y 3000 mm anuales (ICAFE, 2011). Su cosecha varía según la latitud y altitud del cultivo, y comprende los meses entre diciembre y febrero para plantaciones ubicadas al norte del Ecuador, y de mayo a agosto en las zonas al sur del Ecuador; para ambas épocas de cosecha la maduración de los frutos se ve postergada conforme mayor sea la altitud del cultivo (Lara, 2005; Belitz *et al.*, 2009). Tras la cosecha, realizada manual o mecánicamente, tiene lugar el beneficiado.

El procesamiento del café o beneficiado, involucra la remoción de las capas superficiales del fruto, lo cual puede realizarse a través de dos metodologías: el procesamiento seco y el húmedo. El procesamiento seco requiere del secado al sol de los frutos enteros hasta alcanzar la humedad que permita la separación del pergamino; en ciertos casos este método involucra el apilamiento de los frutos para propiciar la fermentación de la pulpa, este es el procedimiento usualmente empleado en Brasil (Belitz *et al.*, 2009). Por otro lado, en el resto de América y África suele emplearse el procesamiento húmedo, en el cual los frutos son despulpados removiéndose de esta forma la cáscara y pulpa, posteriormente son expuestos a fermentación o tratados mecánicamente con el objetivo de remover el mucílago; y finalmente, los granos son secados al sol o mediante secadores con aire caliente y almacenados hasta su requerimiento, momento en el que se remueve el pergamino (Belitz *et al.*, 2009).

3.2 Uso de subproductos del procesamiento del café

Esquivel y Jiménez (2012), recabaron información sobre posibles formas de valorizar los subproductos de café, entre las cuales mencionan la posibilidad de extracción de compuestos encontrados en la cáscara y la pulpa, para uso alimentario y farmacéutico, como lo son la cafeína, los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, antocianidinas y antocianinas. Se han desarrollado además potenciales usos para ambos subproductos mediante fermentación en estado sólido, permitiendo la producción de hongos comestibles, enzimas, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos, cuya viabilidad responde al contenido de carbohidratos fermentables presentes (Pandey *et al.*, 2000). Otras investigaciones han

empleado la cáscara y pulpa como fuentes de xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa tras la hidrólisis mediante el tratamiento con ácidos diluidos o vapor (Pandey *et al.*, 2000).

La eliminación o disminución de compuestos fenólicos presentes en la cáscara y la pulpa, mediante fermentación, ha sido analizada con el fin de potenciar el uso de dichos subproductos para alimentación animal; sin embargo, se ha visto que si bien los resultados son exitosos, los métodos empleados no resultan viables económicamente (Pandey *et al.*, 2000). Otros usos tradicionales como la producción de biogás y el compostaje han sido evaluados, obteniéndose resultados positivos (Pandey *et al.*, 2000).

Cinzia *et al.* (2004) encontraron que la capa adherida al grano, conocida como piel plateada, puede considerarse como una importante fuente de fibra dietética, con actividad prebiótica e inclusive antioxidante debido a los compuestos de Maillard generados durante el tostado. Además, se ha comprobado que dicho subproducto puede ser empleado como medio de cultivo de microorganismos como: *Aspergillus japonicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* y *Kluyveromyces fragilis* en fermentaciones en estado sólido (Mussato *et al.*, 2011).

Los residuos sólidos producto de la elaboración de la infusión, así como los granos tostados que no cumplen con los requerimientos de calidad, han sido valorados como una posible fuente de compuestos bioactivos, tras encontrarse actividad antioxidante y antiinflamatoria en dichos productos (Esquivel & Jiménez, 2012). Sin embargo, estos subproductos suelen ser empleados como fuente calórica en la misma industria o desechados al ambiente, a pesar del impacto que ello representa (Mussato *et al.*, 2011). Al igual que en el caso de la pulpa, este subproducto no debería de ser empleado para alimentación animal, debido a la elevada presencia de lignina y otros factores antifisiológicos y antinutricionales (Mussato *et al.*, 2011).

En cuanto al mucílago, este normalmente experimenta fermentación durante el beneficiado, tanto mediante el método seco como el húmedo (Belitz *et al.*, 2009), lo cual podría justificar la poca información relacionada con su aprovechamiento; sin embargo, con el fin de incrementar la producción, actualmente es común el uso de equipos que remueven

dicho mucílago de manera mecánica, convirtiéndose de esta forma en un subproducto más que manejar en la industria del café, por lo cual se vuelve relevante la búsqueda de alternativas para su tratamiento.

3.3 Compuestos funcionales presentes en el café

Los compuestos funcionales son aquellos presentes en ciertos alimentos que proveen efectos importantes sobre el bienestar y la salud o que disminuyen el riesgo de algunas enfermedades, siendo algunos de los principales compuestos funcionales los terpenoides, metabolitos fenólicos y alcaloides u otros compuestos nitrogenados (Dillard & German, 2000).

Según Murthy y Naidu (2012), en la composición de la pulpa de café, rica en carbohidratos, proteínas y minerales, resaltan además cantidades apreciables de compuestos como ácidos clorogénicos e hidroxicinámicos (< 2,6 % BS) y cafeína (1,3 % BS). El ácido cafeico corresponde a uno de los principales ácidos hidroxicinámicos presentes en el café, además de los ácidos ferúlico y cumárico, cuyas estructuras se muestran en la figura 2. Estos han sido reconocidos como compuestos de alto valor funcional por sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes (Torres *et al.*, 2011).



Figura 2. Estructuras de los principales ácidos hidroxicinámicos encontrados en el café.

En tejidos vegetales es común encontrar los ácidos hidroxicinámicos formando conjugados hidrosolubles junto con el ácido quínico, lo cual da origen a una familia de

ésteres comúnmente denominados como ácidos clorogénicos (Torres *et al.*, 2011; Clifford, 1999). Según Clifford (1999), el término ácido clorogénico suele ser utilizado comercialmente para identificar al ácido 5-cafeoilquínico, por lo que es usual que en la literatura se incurra en dicha confusión. Adicionalmente, es posible encontrar publicaciones en las que se emplea de manera generalizada el concepto de ácidos hidroxicinámicos para incluir a los ácidos clorogénicos (Mullen *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011).

De acuerdo con varios autores (Torres *et al.*, 2011; Esquivel & Jiménez, 2012; Murthy & Naidu, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014), el ácido 5-cafeoilquínico (C5Q) corresponde al principal ácido clorogénico presente en la pulpa de café. La figura 3 muestra la estructura del C5Q, así como de los otros ácidos clorogénicos encontrados en el café según Mullen *et al.* (2011); entre paréntesis se presentan las abreviaturas comúnmente empleadas.

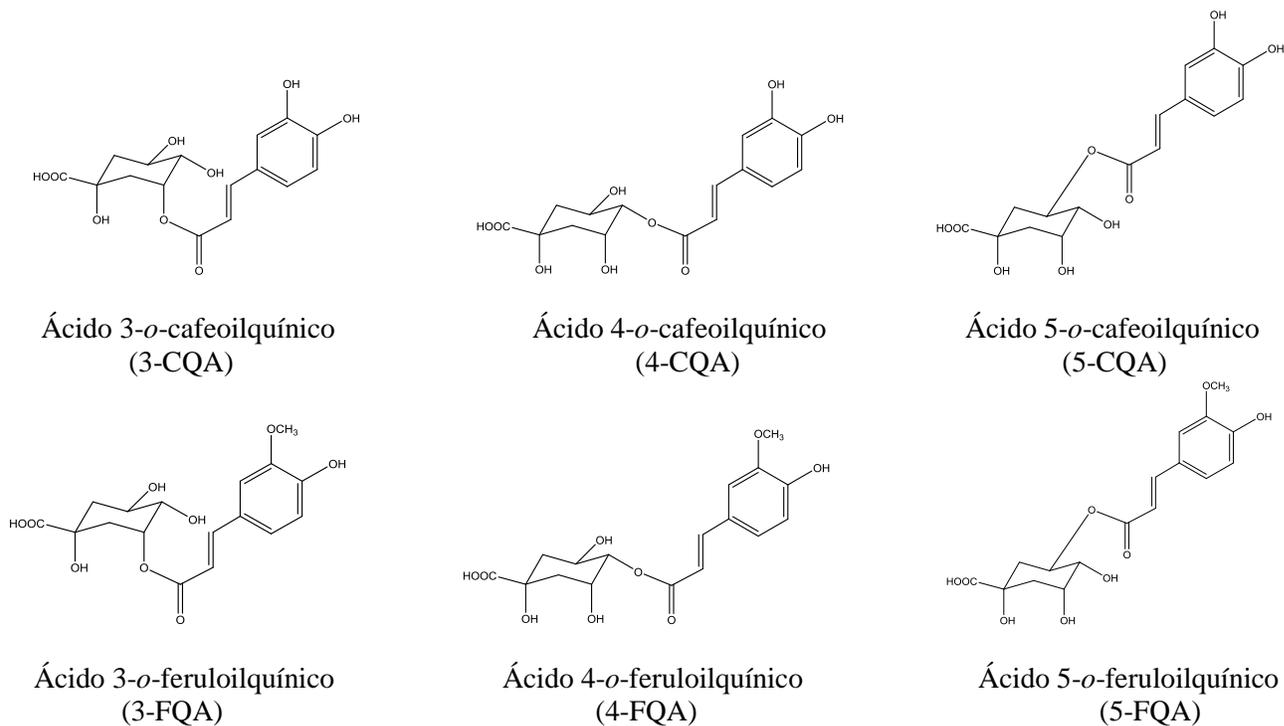
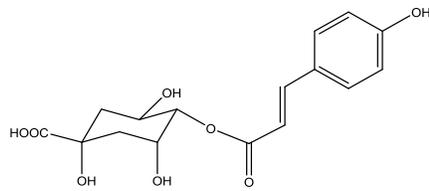
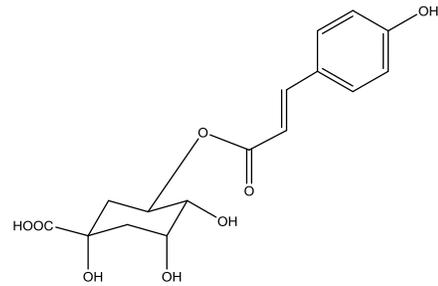


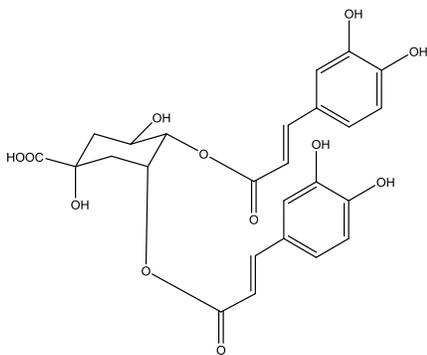
Figura 3. Estructuras de los principales ácidos clorogénicos encontrados en el café.



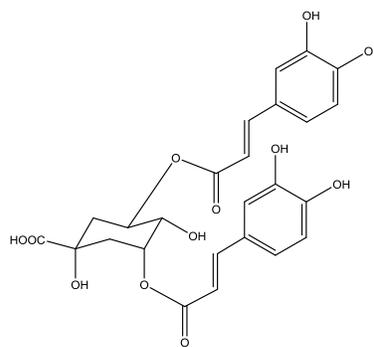
Ácido 4-*o-p*-cumaroilquínico
(4-*p*CoQA)



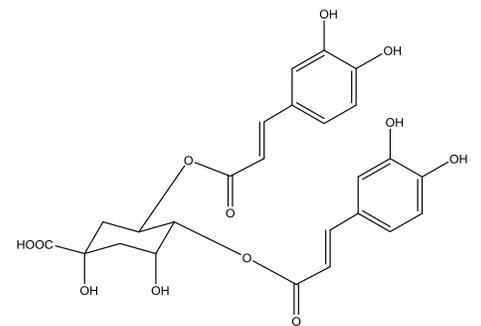
Ácido 5-*o-p*-cumaroilquínico
(5-*p*CoQA)



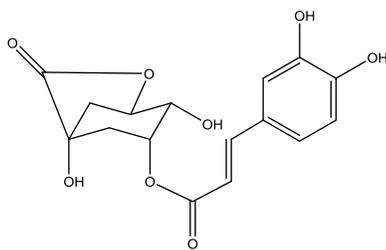
Ácido 3,4-*o*-dicafeoilquínico
(3,4-diCQA)



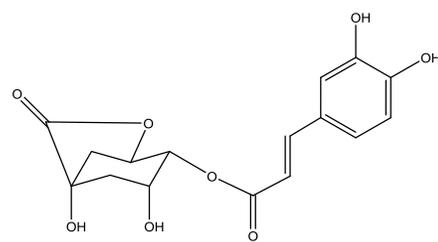
Ácido 3,5-*o*-dicafeoilquínico
(3,5-diCQA)



Ácido 4,5-*o*-dicafeoilquínico
(4,5-diCQA)



Ácido 3-*o*-cafeoilquínico lactona
(3-CQL)



Ácido 4-*o*-cafeoilquínico lactona
(4-CQL)

Figura 3 (Continuación). Estructuras de los principales ácidos clorogénicos encontrados en el café.

Los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos son compuestos fenólicos encontrados además en manzanas, peras, tomates, berenjena y otras frutas y vegetales, y son reconocidos como compuestos capaces de controlar la presión arterial tras proteger la enzima que sintetiza el óxido nítrico, el cual relaja las paredes arteriales (Galland, 2014). Sin embargo, la principal función atribuida a dichos compuestos es su capacidad antioxidante, la cual ha sido ampliamente estudiada dado que posee efectos en la prevención de diabetes, arteriosclerosis y cáncer (Sánchez *et al.*, 2005).

A pesar de los efectos benéficos sobre la salud, tanto los ácidos hidroxicinámicos como los clorogénicos poseen el inconveniente de ser sensibles a una variedad de factores, lo cual sin duda complica su extracción, y por ende su potencial uso como aditivos con propiedades funcionales. Entre algunos de los factores que se ha evidenciado que provocan la degradación de estos compuestos se encuentran altas temperaturas (Moon *et al.*, 2009; Budryn *et al.*, 2013), valores de pH alcalinos (Narita & Inouye, 2013), biotransformación por parte de bacterias u hongos (Bel-Rhliid *et al.*, 2013; Gauthier *et al.*, 2016), así como la acción enzimática (Robinson, 2000; Martinez & Duvnjak, 2006).

3.4 Enzimas endógenas de la pulpa del café

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores en reacciones bioquímicas, por lo que permiten disminuir la energía requerida para que estas reacciones se lleven a cabo en condiciones en las que normalmente no se desarrollarían o requerirían de largos periodos para ocurrir (Bayindirli, 2010). Una característica importante de estas proteínas corresponde a su especificidad, es decir la limitación de reaccionar únicamente con ciertos sustratos debido a la conformación de su sitio activo al cual se une el sustrato; dicho sitio activo es resultado de la estructura tridimensional, por lo que esta es entonces una característica esencial para la actividad de una enzima puesto que define su funcionamiento (Bayindirli, 2010).

Entre las enzimas presentes de forma natural en la pulpa de café, sobresale la polifenoloxidasas (PPO) como una de las enzimas de importante actividad (Bolaños, 2015).

Esta enzima, también llamada monofenol oxidasa y *o*-difenol oxidasa, desarrolla su actividad sobre dos tipos de sustratos, los monohidroxifenoles, los cuales son hidroxilados en posición *orto* con respecto al grupo hidroxilo original, y los *o*-dihidroxifenoles, sobre los cuales se lleva a cabo la oxidación a *orto*-benzoquinonas. La figura 4 muestra las reacciones básicas que experimentan estos sustratos (Bolaños, 2015).

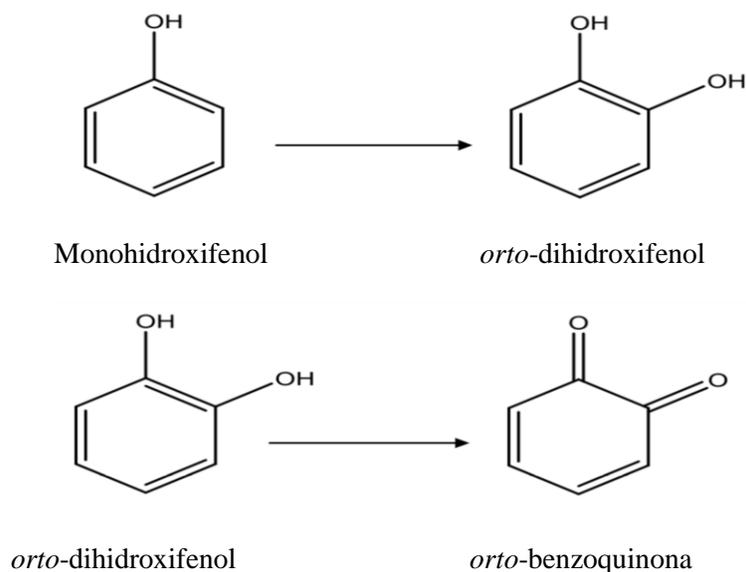


Figura 4. Reacciones básicas catalizadas por la polifenoloxidasasa.

Las *orto*-benzoquinonas obtenidas en las primeras etapas de actividad de la polifenoloxidasasa reaccionan posteriormente entre sí o con otros compuestos fenólicos o proteínas presentes, mediante reacciones de polimerización, lo cual lleva a la formación de compuestos de mayor tamaño llamados melanoidinas o taninos, de coloración marrón y responsables del pardeamiento enzimático de ciertas frutas y vegetales (Ramírez & Virador, 2002).

En el caso del fruto de café, entre los principales precursores del pardeamiento enzimático se encuentran el C3Q, C4Q y C5Q, los cuales corresponden a los polifenoles encontrados en mayor contenido (Robinson, 2000). Específicamente Mazzafera &

Robinson (2000) evidenciaron que la polifenoloxidasas endógena presenta preferencia al ácido 5-cafeoilquinico sobre otros sustratos evaluados.

Debido al efecto negativo de la polifenoloxidasas sobre los ácidos hidroxicinámicos, es necesaria su inactivación previo a la extracción de estos ácidos. La inactivación enzimática normalmente es lograda mediante la desnaturalización, lo cual corresponde a un cambio en la estructura tridimensional que altera el sitio activo de la proteína, causada normalmente por la aplicación de calor, alteraciones en el pH, la fuerza iónica o polaridad del medio, y de forma más novedosa la aplicación de altas presiones, ultrasonido y campos eléctricos pulsados (van Boekel, 2008; Bayindirli, 2010).

Entre las técnicas normalmente aplicadas en la industria alimentaria para la inactivación enzimática se encuentran la adición de ácidos orgánicos para reducir el pH o la aplicación de procesos de escaldado, siendo este último el más empleado (Bayindirli, 2010). Sin embargo, en pulpa de café se ha evidenciado la actividad de la enzima polifenoloxidasas a temperaturas superiores a los 70 °C, lo cual demuestra la elevada resistencia de dicha enzima al tratamiento térmico, resultando en la necesidad de costosas operaciones de escaldado (Bolaños, 2015).

3.5 Dióxido de azufre (SO₂) y sulfitos

El dióxido de azufre y sus derivados han sido ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos, antioxidantes, inhibidores de enzimas e inclusive inhibidores del pardeamiento no enzimático, y son empleados principalmente en vinos, frutas y vegetales e inclusive en productos cárnicos (Davidson, 2001). Entre las sales aprobadas para su uso se encuentran el sulfito de potasio (K₂SO₃), sulfito de sodio (Na₂SO₃), bisulfito de potasio (KHSO₃), bisulfito de sodio (NaHSO₃), metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅) y metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅), las cuales debido a los equilibrios establecidos entre los distintos compuestos logran transformarse dando origen a una u otra especie dependiendo del pH del medio (Davidson, 2001).

La figura 5 muestra los principales mecanismos de reacción por medio de los cuales interactúa el ión sulfito con los distintos grupos funcionales presentes en los alimentos. En todos los casos la reacción ocurre mediante un ataque nucleofílico por parte del ión, dando origen a la formación de enlaces covalentes C-S y S-S (Wedzicha, 2000).

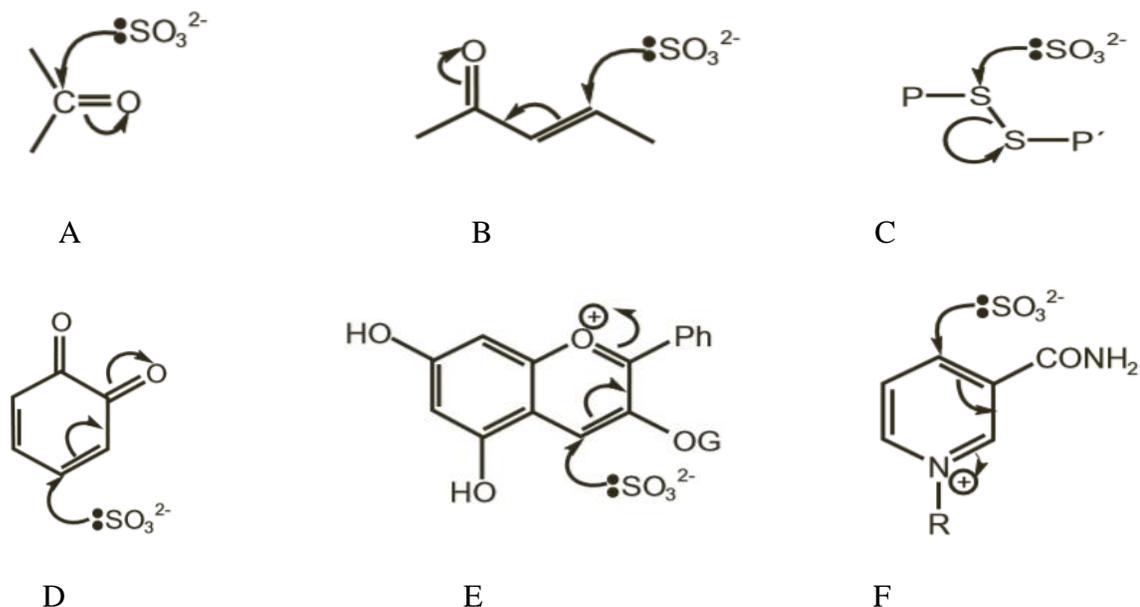


Figura 5. Mecanismos de reacción entre el ión sulfito y diversos grupos funcionales: (A) Ataque nucleofílico a un carbonilo, (B) Adición a un carbonilo α , β -insaturado, (C) Ruptura de un enlace disulfuro, (D) Adición a una *ortho*-benzoquinona, (E) Adición a una porción de antocianina, (F) Adición a una porción de nicotinamida (adaptado de Wedzicha, 2000).

A partir de lo mostrado en la figura 5, es posible identificar potenciales mecanismos por medio de los cuales el ión sulfito genera su efecto inhibitor sobre las enzimas, como por ejemplo la ruptura de enlaces disulfuro (ilustrado en la reacción C), adición a coenzimas (ilustrado en la reacción F), reacción con sustratos (ilustrado en la reacción B). Adicionalmente, es posible observar el efecto reductor sobre productos de oxidación de enzimas como la polifenoloxidasas (ilustrado en la reacción D) (Wedzicha, 2000).

3.6 Extracción de compuestos funcionales

Los compuestos funcionales o bioactivos, suelen ser obtenidos mediante síntesis microbiana o su extracción a partir de matrices en las cuales se encuentran inmersos. En cuanto a la extracción, esta suele ser desarrollada mediante técnicas convencionales tales como la extracción por Soxhlet, maceración o hidrodestilación. Sin embargo, aspectos como los tiempos de extracción extensos, el requerimiento de disolventes con alta pureza, bajas selectividades durante la extracción, descomposición de compuestos termosensibles y finalmente la necesidad de remover grandes cantidades de disolvente han impulsado el desarrollo de nuevas técnicas de extracción no convencionales como la extracción asistida con ultrasonido, el uso de enzimas, microondas, campos eléctricos pulsados, fluidos supercríticos y la extracción con líquidos presurizados (Azmir *et al.*, 2013).

La aplicación de tratamientos enzimáticos permite aumentar la recuperación de compuestos de interés tras la degradación de las paredes celulares (Azmir *et al.*, 2013), lo cual es especialmente importante para la extracción de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la pulpa de café. Estos compuestos se encuentran normalmente asociados a polisacáridos de las paredes celulares, cuya composición resulta rica en celulosa, lignina, pectina y hemicelulosa con contenidos de 63 %, 17,5 %, 6,5 % y 2,3 % de la masa seca respectivamente (Torres *et al.*, 2011; Murthy & Naidu, 2012).

El empleo de enzimas resulta además una buena alternativa para la obtención de ácidos hidroxicinámicos debido a que estos suelen degradarse tras la aplicación de métodos químicos como severos tratamientos ácidos o alcalinos (Stalikas, 2007). Adicionalmente, el uso de preparados enzimáticos para la extracción de compuestos bioactivos representa una alternativa de menor impacto ambiental, debido al uso de agua como disolvente en lugar de compuestos orgánicos, como sucede en los métodos tradicionales.

Para asegurar la efectividad de un tratamiento enzimático es necesario contemplar ciertos factores como la composición y concentración del preparado enzimático, el tamaño de partícula del material vegetal, la relación sólido-líquido, la temperatura del proceso, la presencia de agitación, así como el tiempo de hidrólisis (Azmir *et al.*, 2013).

3.7 Cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos

De acuerdo con Kuhnert *et al.* (2012), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) corresponde a una de las principales y más confiables herramientas empleadas para el análisis de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, debido entre otras razones a la posibilidad de identificación de los compuestos mediante sus tiempos de retención y la posibilidad de contrastar contra información existente.

La HPLC consiste en una técnica de separación y cuantificación de compuestos mediante la interacción entre los compuestos presentes en la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria inerte. Para esto, un volumen de la muestra es inyectado en el equipo y posteriormente arrastrado a lo largo de la columna por la fase móvil, donde a medida que la muestra fluye a través de la columna cromatográfica, los distintos compuestos presentes en la muestra interactúan con los compuestos presentes en la columna, de modo que dependiendo de la afinidad entre ambos, estos se retienen en mayor o menor medida al flujo de la fase móvil (Bayne & Carlin, 2010).

Los compuestos que presentan muy poca afinidad a la fase estacionaria son arrastrados fácilmente por la fase móvil, llegando rápidamente al detector del equipo, mientras que aquellos más afines a la fase estacionaria son arrastrados con mayor dificultad, por lo que tardan más en llegar al detector. El tiempo requerido por un compuesto para atravesar la columna cromatográfica y llegar al detector es conocido como tiempo de retención, e idealmente cada compuesto en la muestra presenta un tiempo de retención distinto, lo cual permite su separación y finalmente su cuantificación al llegar al detector (Bayne & Carlin, 2010).

La preparación o tratamiento de la muestra corresponde a una de las etapas cruciales en el análisis por HPLC, la cual se estima que contribuye con el 30% de las fuentes de error, además de ser la etapa que más tiempo consume con cerca de dos tercios del tiempo de análisis. Debido a esto, la preparación de la muestra idealmente debe ser simple y rápida, poseer una alta eficiencia de extracción, presentar pocos pasos para reducir la posibilidad

de pérdidas, emplear la mínima cantidad de disolvente y presentar un bajo costo en cuanto a reactivos y equipos requeridos (Papadoyanis & Samanidou, 2009).

Si bien existe una amplia información sobre el análisis de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos mediante HLPC, no se cuenta con una metodología estándar para el tratamiento de la muestra en cada uno de los análisis, por lo que la cantidad de variantes es innumerable. Entre estas es posible encontrar el uso de cartuchos para extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) con el objetivo de purificar las muestras previo al análisis, la evaporación hasta sequedad de los extractos obtenidos, la aplicación de ultrasonido o microondas durante la extracción, el empleo de distintos disolventes, así como variaciones en el pH del disolvente para la extracción, distintos tiempos y temperaturas de extracción e inclusive la aplicación de agentes para la remoción de material coloidal presente (Ky *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 2010; Upadhyay *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2014; Suarez *et al.*, 2014; Solís & Herrera, 2005; Monteiro & Farah, 2012).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del proyecto

La totalidad del proyecto se realizó en las instalaciones de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), ubicados en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Específicamente se utilizaron las instalaciones de la Planta Piloto, así como los laboratorios de Química del CITA y de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

4.2 Materia prima

Para el desarrollo del proyecto, se empleó pulpa de café obtenida de la mezcla de las operaciones de despulpado y desmucilaginado del Beneficio Coope Unión R.L., ubicado en Tres Ríos de Cartago. Dicha pulpa procedió de las cosechas de café cultivado entre 1300 y 1800 msnm de los años 2014, 2015 y 2016. Se consideró como un lote a la pulpa recolectada en una noche de procesamiento.

4.3 Equipos

El Cuadro I muestra los equipos empleados para el desarrollo del proyecto.

Cuadro I. Equipos empleados para las distintas pruebas desarrolladas.

| Equipo | Descripción |
|--------------------|---|
| Molino de tornillo | Marca: Hobart País de origen: Estados Unidos Modelo: 4812 Número de serie: 11-310-079 Número de activo: 039 (Fundación para la investigación Agroindustrial Alimentaria) Localización: Planta Piloto, CITA |
| Picadora Hobart | Marca: Hobart País de origen: Estados Unidos Modelo: 84186 Número de serie: 56-803-009 Número de activo: 107589 (Universidad de Costa Rica) Localización: Planta Piloto, CITA |

Cuadro I (Continuación). Equipos empleados para las distintas pruebas desarrolladas.

| | |
|--------------------------|---|
| Picadora Krämer Grebe | Marca: Krämer Grebe País de origen: Alemania Modelo: SM ZW Número de serie: 275/1001 Número de activo: 134390 (Universidad de Costa Rica) Localización: Planta Piloto, CITA |
| Prensa hidráulica | Marca: Carver País de Origen: Estados Unidos Modelo: 3351-0 Número de serie: 3351-0 Número de activo: 35147 (Universidad de Costa Rica) Localización: Laboratorio de Química, Escuela de Tecnología de Alimentos |
| Mezcladora | Marca: Hobart País de Origen: China Modelo: ES10 Número de serie: 31-1411-090 Número de activo: 228845 (Universidad de Costa Rica) Localización: Planta Piloto, CITA |
| Molino ciclón centrífugo | Marca: Retsch País de origen: Alemania Modelo: Cyclone Mill-Twister Número de serie: 1213260304I Número de activo: 336378 (Universidad de Costa Rica) Localización: Laboratorio de Química, CITA |
| Espectrofotómetro | Marca: Shimadzu País de origen: China Modelo: UV-1700 Número de serie: A11024236250 CS Número de activo: 225317 (Universidad de Costa Rica) Localización: Laboratorio de Química, CITA |
| Agitador | Marca: IKA País de Origen: Estados Unidos Modelo: EURO-ST 60 C S1 Número de serie: 03.421415 Número de activo: 367294 (Universidad de Costa Rica) Localización: Laboratorio de Química, Escuela de Tecnología de Alimentos |
| Secador Excalibur | Marca: Excalibur Products País de Origen: Estados Unidos Modelo: Excalibur Número de serie: 10907996 Número de activo: 285956 Localización: Laboratorio de Química, Escuela de Tecnología de Alimentos |

4.4 Pruebas definitivas

Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café.

Para la evaluación del efecto de las distintas pruebas realizadas a lo largo del proyecto, sobre el contenido de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico, se desarrolló un método de análisis para lo cual se contemplaron los aspectos detallados a continuación.

Equipo de cromatografía líquida

La cuantificación de los compuestos de interés se realizó mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) perteneciente al CITA, el cual se encontraba compuesto por:

- Horno Shimadzu CTO-20A para la columna cromatográfica.
- Inyector automático de muestras Shimadzu SIL-20A HT, controlado por módulo CBM- 20A.
- Bomba cuaternaria Shimadzu LC-20AT.
- Detector de arreglo de diodos PDA Shimadzu e integrador LC-Solutions.

Las condiciones de medición cromatográficas, se basaron en el protocolo interno “*Dosages des acides chlorogéniques isomères*” (CIRAD, s. f.) desarrollado para el análisis de café verde. Las condiciones consideradas corresponden a los siguientes aspectos:

- Columna: Uptisphere C18-ODB 5 μm (250 x 4,6) mm
- Temperatura del horno: 30 °C
- Flujo: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 10 μL
- Longitud de onda: 327 nm para la detección de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos
- Fase móvil: Modo de gradiente (ver Cuadro II)

Cuadro II. Gradiente de fase móvil empleado para el análisis de los compuestos de interés.

| Fase móvil | Tiempo (min) | | | | | |
|---------------------------------------|--------------|----|-----|-----|----|----|
| | 0 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 |
| Metanol | 5 | 75 | 100 | 100 | 5 | 5 |
| H ₃ PO ₄ (4 mM) | 95 | 25 | 0 | 0 | 95 | 95 |

Reactivos

Para el desarrollo del método de análisis, se emplearon patrones de ácido 5-cafeoilquínico (Sigma Aldrich, >95 %), ácido cafeico (Sigma Aldrich, >98 %) y ácido ferúlico (European Pharmacopoeia reference standard, 99,8 %), así como metanol (grado HPLC) y ácido fosfórico (grado reactivo, 85 % m/v).

Curvas de calibración

Para la determinación de la concentración de cada uno de los compuestos de interés presentes en los extractos analizados, se elaboraron curvas de calibración de cada uno de los compuestos con el objetivo de establecer las ecuaciones que permiten asociar la señal obtenida mediante los cromatogramas, con la concentración de los compuestos de interés presentes. Las curvas de calibración fueron definidas comprendiendo concentraciones de los compuestos de interés entre el rango de 2 ppm y 100 ppm.

Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Los límites de detección y cuantificación, se definieron según lo establecido por Shrivastava & Gupta (2011) mediante la regresión lineal de los pares de concentración y señal instrumental asociados a cada uno de los patrones empleados para la determinación de las curvas de calibración. Se consideraron las ecuaciones 1 y 2 para su determinación:

$$LD = 3 * \frac{S_b}{m} \quad (1)$$

$$LQ = 10 * \frac{S_b}{m} \quad (2)$$

Siendo S_b la incertidumbre del intercepto y m la pendiente de la curva de calibración.

Establecimiento del método de preparación de la muestra

Para cada una de las pruebas realizadas para el desarrollo del método de análisis se empleó pulpa de café cosechada en el año 2015, empacada en bolsas de polietileno de alta densidad y almacenada en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el análisis se contempló tanto la porción líquida obtenida de la pulpa tras su prensado, así como la porción sólida.

Para el análisis del sólido residual, la pulpa fue secada hasta una humedad cercana al 5 %, posteriormente se molió mediante un molino ciclón centrífugo (descrito en el Cuadro I), se tomaron 2 g de la pulpa molida y se extrajeron durante 1,5 h con 60 mL de metanol al 80% acidificado con 1% de ácido acético glacial, en un baño a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante (Rodríguez *et al.*, 2014). Tras la extracción, las muestras se filtraron empleando papel filtro #4, y se aforaron en un balón de 100 mL con la disolución empleada para la extracción. Finalmente, se filtró una porción a través de un filtro de $0,25\text{ }\mu\text{m}$, se inyectó al equipo de HPLC y se determinó la concentración de cada uno de los compuestos de interés.

Sobre la porción líquida, esta se homogenizó y fraccionó en cinco porciones para probar la remoción de proteínas y material coloidal mediante la adición de sulfato de amonio (20 g/L), cloruro de sodio (40 g/L), etanol (5 % v/v) y reactivo Carrez (Murthy & Naidu, 2010). Este último comprende las disoluciones A (1 mL/30 mL extracto) y B (1 mL/30 mL extracto), las cuales se encontraban compuestas por: A) 2,2 g de acetato de zinc y 0,3 mL de ácido acético glacial disueltos en 10 mL de agua destilada, y B) 1,0 g de hexacianoferrato de potasio en 10 mL de agua destilada (Ky *et al.*, 1999). Adicionalmente, se analizó un extracto control sin adición de reactivo para la remoción del material coloidal.

Una vez adicionados los reactivos según los tratamientos, los extractos fueron agitados a 3000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y se trasvasaron a un balón de volumen conocido y se aforaron con agua. Posteriormente, los extractos fueron

centrifugados a 3200 g durante 10 min a temperatura ambiente para la remoción del material insoluble. Finalmente, del líquido sobrenadante se filtró una porción a través de un filtro de 0,25 μm , se inyectó al equipo de HPLC y se determinó la concentración de cada uno de los compuestos de interés.

Diseño experimental

Mediante un diseño irrestricto aleatorio de cinco tratamientos con tres repeticiones para cada uno, se evaluó el efecto de cada uno de los tratamientos de remoción de material coloidal sobre la concentración de los compuestos de interés presentes en la porción líquida obtenida de la pulpa de café.

Análisis estadístico

A partir de los resultados generados, se realizó un ANDEVA para la concentración de cada uno de los compuestos de interés, y se determinó con una $p < 0,05$ si existían diferencias significativas debido a los tratamientos aplicados. Finalmente, se realizó una prueba de Tukey para determinar entre cuales tratamientos se obtuvieron diferencias significativas para cada variable respuesta.

Porcentajes de recuperación

Una vez definido el método de análisis (adjunto en el Anexo) para la determinación del porcentaje de recuperación, se prensó una muestra de pulpa de café fresca y la porción líquida se dejó a temperatura ambiente durante una semana, para promover la degradación de los compuestos de interés presentes de forma original en la muestra. Posteriormente, se fraccionó en cuatro porciones y se enriquecieron tres de ellas a niveles distintos (2, 50 y 80 ppm) de cada uno de los compuestos de interés y se analizó según el tratamiento de muestra correspondiente. Adicionalmente, se analizó una porción sin enriquecimiento para determinar el contenido original en la matriz de cada uno de los compuestos de interés.

En cuanto a la porción sólida, esta se secó hasta una humedad cercana a 5%, se molió, seguidamente se fraccionó en cuatro porciones y se enriquecieron tres de ellas a niveles distintos (2, 50 y 80 ppm) de cada uno de los compuestos de interés y se analizó por

triplicado según el tratamiento de muestra correspondiente. Adicionalmente, se analizó por triplicado una porción sin enriquecimiento para determinar el contenido original en la matriz de cada uno de los compuestos de interés.

La figura 6 detalla el proceso llevado a cabo para la determinación del porcentaje de recuperación del método de análisis desarrollado.

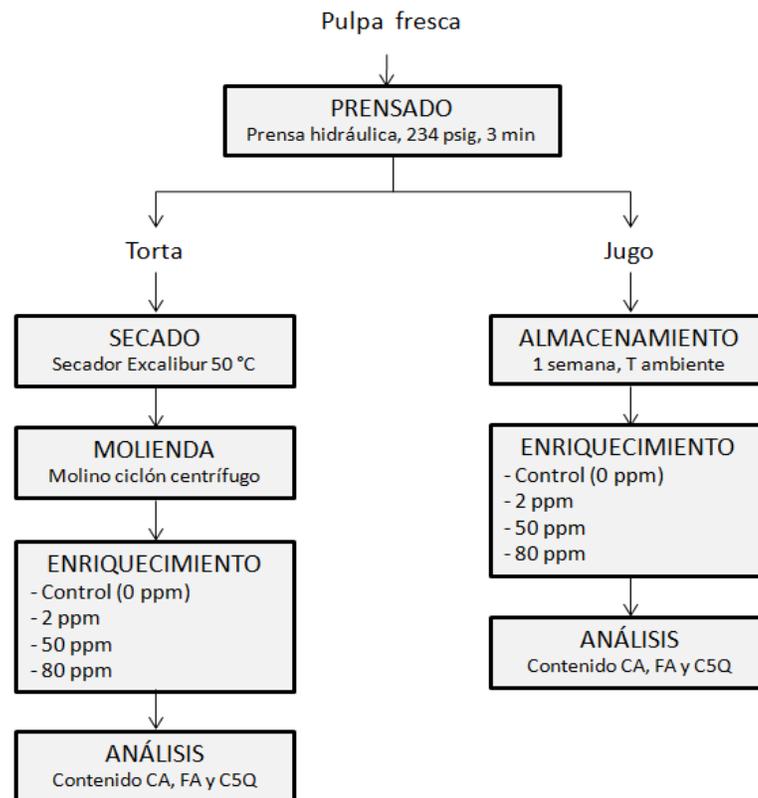


Figura 6. Diagrama del proceso para la determinación del porcentaje de recuperación.

El porcentaje de recuperación para cada uno de los niveles de enriquecimiento fue definido mediante la ecuación 3.

$$\% \text{ Recuperación}_{x \text{ ppm}} = \left(\frac{\text{Concentración tras enriquecer} - \text{Concentración original}}{\text{Concentración añadida}} \right) * 100 \quad (3)$$

Finalmente, el porcentaje de recuperación para cada uno de los compuestos de interés se expresó como el promedio de los porcentajes de recuperación obtenidos de los tres niveles de enriquecimiento.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\% \text{ recup}_{2 \text{ ppm}} + \% \text{ recup}_{50 \text{ ppm}} + \% \text{ recup}_{80 \text{ ppm}}}{3} \quad (4)$$

Precisión del método de análisis

La precisión del método de análisis fue determinada mediante el coeficiente de desviación estándar relativa, definido como:

$$\% \text{ Desviación estándar relativa} = \left(\frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \right) * 100 \quad (5)$$

Para lo cual se desarrolló por septuplicado el método definido para el análisis de cada una de las porciones de la pulpa.

Caracterización de la composición fisicoquímica de la pulpa de café

Debido a la naturaleza estacional del café, se decidió analizar la composición fisicoquímica de la pulpa de café proveniente de cinco momentos distintos de cosecha.

Materia prima

Para los análisis de la composición se recolectó 2 kg de pulpa en las fechas mostradas en el Cuadro III, la cual fue empacada en bolsas de polietileno de alta densidad y almacenada en congelación a -18 ° C la noche previa a su análisis.

Cuadro III. Fechas de recolección de pulpa de café empleada para el análisis de su composición.

| | |
|---|-------------------------|
| Fechas de recolección de pulpa analizada | 18 de diciembre de 2014 |
| | 12 de enero de 2015 |
| | 19 de enero de 2015 |
| | 18 de febrero de 2015 |
| | 11 de marzo de 2015 |

Análisis realizados

Para la determinación de la composición fisicoquímica de la pulpa de café se realizaron por triplicado los siguientes análisis: contenido de humedad, proteína, grasa, ceniza, azúcares, fibra, ácidos orgánicos, minerales, pH, sólidos solubles, acidez, polifenoles totales y capacidad antioxidante.

Análisis de los datos

Para los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada uno de los análisis realizados y se determinó con una $p < 0,05$ si existían diferencias significativas debido a las fechas de recolección de la pulpa. Adicionalmente, se realizó una prueba de Tukey para determinar entre cuales tratamientos se obtuvieron diferencias significativas.

Evaluación de distintos métodos enzimáticos para la extracción de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café.

Cinéticas de maceración enzimática sobre pulpa de café

Se evaluó el efecto de la maceración enzimática mediante varios preparados enzimáticos, sobre la extracción de los compuestos de interés y la turbidez del extracto obtenido.

Materia prima

Para la prueba se utilizó pulpa de café recolectada en diciembre del 2015, la cual fue empacada en bolsas de polietileno de alta densidad y almacenada en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En cuanto a los preparados enzimáticos empleados para la extracción de los compuestos de interés, el Cuadro IV muestra algunas de sus características.

Cuadro IV. Características principales de los preparados enzimáticos empleados durante la maceración enzimática de la pulpa de café.

| Preparado enzimático | Actividad principal | Enzima declarada/ Actividad declarada | Fuente | Otras actividades | Temperatura/ pH óptimos |
|-----------------------------|----------------------------|--|---------------|--------------------------|------------------------------------|
| U | Confidencial | Confidencial | Confidencial | Confidencial | Confidencial |
| V | Confidencial | Confidencial | Confidencial | Confidencial | Confidencial |
| C | Confidencial | Confidencial | Confidencial | Confidencial | Confidencial |

Fuente: Confidencial

Para el desarrollo de las cinéticas de maceración enzimática se evaluó el uso del molino de tornillo Hobart, la picadora Krämer Grebe y la picadora Hobart (descritos en el Cuadro I), todos a nivel de planta piloto para la trituration de la pulpa de café. En el Cuadro V se muestran las condiciones empleadas así como imágenes de la molienda obtenida.

Cuadro V. Imágenes de pulpa triturada mediante tres sistemas distintos para la selección del método de reducción de tamaño.



Nótese cómo de manera general los tamaños de los trozos de pulpa obtenidos tras la trituration con el molino de tornillo y la picadora Krämer Grebe son menores a los obtenidos con la picadora Hobart en las condiciones aplicadas. A partir de lo anterior, considerando la capacidad del molino para el procesamiento de muestras independientemente del tamaño de la carga, así como la facilidad de uso y homogeneidad

en los trozos de pulpa, se seleccionó el molino de tornillo Hobart con troquel de 0,5 cm como el equipo para la reducción de tamaño de la pulpa para la prueba.

Descripción del proceso

Se trituró la pulpa mediante el molino de tornillo Hobart y se calentó hasta alcanzar 40 °C, temperatura encontrada por Torres *et al.* (2011) como adecuada para la extracción enzimática de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, empleando un preparado con actividad pectinasa. Una vez alcanzada dicha temperatura, la cual fue controlada mediante un baño con agua caliente, se adicionaron 5 kg de la pulpa triturada a la mezcladora descrita en el Cuadro I, que se empleó para obtener una agitación uniforme que permitiese mantener en suspensión todo el sustrato y propiciar un buen mezclado. Dicho mezclado se realizó a un valor de consigna de 1 según la escala del equipo. Se agregaron X ppm del preparado enzimático, diluido al 10 % v/v en agua destilada, según el tratamiento mostrado en el Cuadro VI. En el caso del tratamiento 1, se adicionó un volumen de agua destilada igual al volumen de disolución al 10 % de preparado enzimático adicionado en los tratamientos restantes.

Cuadro VI. Tratamientos evaluados para la determinación del efecto del tratamiento enzimático sobre la extracción de los compuestos de interés en la pulpa de café.

| Tratamiento | Preparado enzimático |
|-------------|--------------------------|
| 1 | Sin preparado enzimático |
| 2 | U |
| 3 | V |
| 4 | C |

Durante 3 h de maceración enzimática se extrajeron muestras homogéneas de 600 g de pulpa cada 30 min. Posteriormente se pesaron aproximadamente 500 g de dicha pulpa dentro de una bolsa de manta, la cual contenía en el interior un trozo de tela sintética con poro de 1 mm x 1 mm, que recubría el interior de la bolsa. Dicha tela sintética fue utilizada con el objetivo de evitar la salida de sólidos en caso de rasgarse la bolsa de manta durante el prensado.

Se colocó la bolsa con la pulpa dentro de un cilindro metálico hueco con paredes perforadas. El cilindro se ubicó en una prensa hidráulica y mediante un pistón de 7,5 cm de diámetro se aplicó una presión de 234 psi_g (1600 lb_f según el manómetro de la prensa hidráulica descrita en el Cuadro I), durante 3 min, recolectándose el líquido en un recipiente.

Por último, el líquido fue fraccionado en dos partes: una porción se empleó para la determinación de la turbidez, en tanto que la otra porción fue congelada para la posterior determinación del contenido de ácidos hidroxicinámicos. Ambas porciones fueron empacadas en bolsas metalizadas.

La figura 7 muestra de forma esquemática el procedimiento para la extracción enzimática de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos.

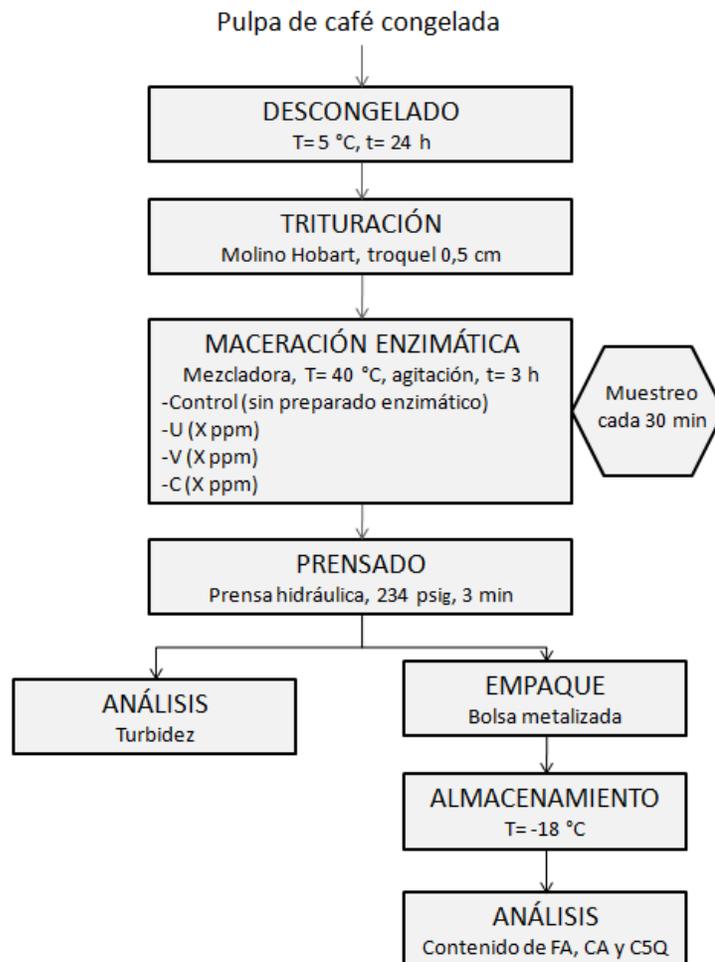


Figura 7. Diagrama del proceso de maceración enzimática sobre pulpa de café fresca para la extracción de los compuestos de interés.

Diseño experimental

Mediante un diseño factorial de dos factores se evaluó el efecto del tipo de preparado enzimático sobre la variación en la turbidez y el contenido de los compuestos de interés a lo largo de la maceración enzimática. Dichas variaciones se expresan en relación con la muestra extraída a los 30 min de maceración enzimática. Se emplearon tres preparados enzimáticos a una concentración de X ppm, además de una muestra control sin preparado enzimático, con dos repeticiones para cada uno.

Análisis de los datos

Con los resultados generados se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta, y se determinó con una $p < 0,05$ si existían diferencias significativas entre los resultados de los efectos simples y su interacción.

Evaluación de la actividad de la polifenoloxidasasa (PPO) endógena de la pulpa de café tras la adición de 0,5 % de metabisulfito de sodio

Materia prima

Para la determinación de la efectividad del metabisulfito de sodio sobre la inactivación de la polifenoloxidasasa se empleó pulpa recolectada en diciembre del 2015, la cual fue empacada en bolsas de polietileno de alta densidad y almacenadas en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Descripción del proceso

La pulpa fue descongelada y fraccionada en dos porciones, una de ellas como muestra control y la otra con adición de 0,5 % m/m de metabisulfito de sodio, el cual se ha reportado ser suficiente para generar un efecto inhibitorio sobre la polifenoloxidasasa (Bressani *et al.*, 1977). Ambas porciones fueron prensadas, de la forma descrita anteriormente, secadas con aire caliente a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un secador Excalibur (descrito en el Cuadro I) hasta alcanzar una humedad de 5 % y molidas con un molino ciclón centrífugo.

Posteriormente, se extrajeron las enzimas presentes en la pulpa mediante el procedimiento descrito por Bolaños (2015), para lo cual se pesaron 10 g de la pulpa seca, que se mezcló con 100 mL de buffer de fosfatos $\text{pH} = 6,8$ y 2 g de polivinilpirrolidona (PVP), esta última para asegurar la remoción de los polifenoles presentes en la muestra, se agitó durante 20 min, posteriormente se centrifugó a 3200 g durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalmente el sobrenadante se filtró al vacío a través de un papel filtro #4 mediante un embudo Büchner y el filtrado se centrifugó nuevamente durante 20 min a 3200 g y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante como el extracto enzimático.

La actividad de la polifenoloxidasas presente en los extractos se evaluó mediante espectrofotometría a lo largo de 90 min de reacción, con el objetivo de evidenciar el comportamiento del contenido del ácido 5-cafeoilquínico y de su producto de oxidación.

El análisis se realizó a las longitudes de onda de 327 nm, la longitud de onda de máxima absorción del ácido 5-cafeoilquínico, y a 420 nm, la cual es la longitud de onda de máxima absorción de la *o*-benzoquinona producto de la oxidación del ácido 5-cafeoilquínico (Bolaños, 2015). Para el análisis se prepararon las disoluciones mostradas en el Cuadro VII; como se observa, fue necesaria la dilución para el análisis a 327 nm, debido a que en la concentración en que se encontraba el C5Q, las mediciones de absorbancia presentaban resultados superiores del ámbito de linealidad establecido por la Ley de Beer.

Cuadro VII. Reactivos empleados para la evaluación espectrofotométrica de la actividad de la polifenoloxidasas endógena.

| Disoluciones para la evaluación enzimática | |
|---|--|
| Disolución analizada a 420 nm | Disolución analizada a 327 nm |
| 4,05 mL Buffer citrato-ácido cítrico pH= 5 | |
| 0,3 mL de catalasa (200 ppm) | 0,75 mL Disolución analizada a 420 nm |
| 0,9 mL de C5Q 1 mM | 2,25 mL Buffer citrato-ácido cítrico pH= 5 |
| 0,3 mL del extracto enzimático | |

La figura 8 presenta en forma esquematizada el proceso desarrollado para la determinación de la actividad de la polifenoloxidasas endógena.

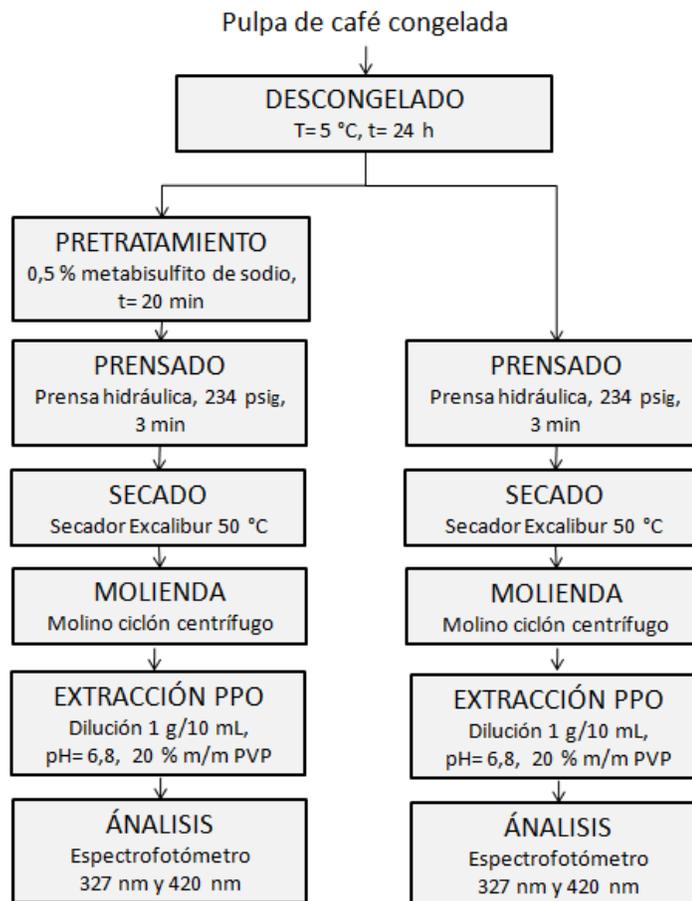


Figura 8. Diagrama del proceso para la determinación de la actividad de la polifenoloxidasas endógenas de la pulpa de café.

Diseño experimental

Mediante un diseño factorial de 2 factores se evaluó el efecto del tratamiento de la pulpa de café con 0,5 % m/m de metabisulfito de sodio a lo largo de 90 min, sobre la absorbancia del C5Q, así como la absorbancia del producto de oxidación de la actividad de la PPO. Se analizaron las variables respuesta en la muestra tratada con metabisulfito así como en una muestra control sin pretratamiento, con tres repeticiones para cada uno.

Análisis de los datos

Con los resultados generados se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta, y se determinó con una probabilidad $<0,05$ la existencia de diferencias significativas entre los resultados de los efectos simples y su interacción.

Maceración enzimática sobre pulpa de café seca, adicionada con 0,5 % de metabisulfito de sodio

Se evaluó el efecto de la maceración enzimática de pulpa seca y molida, previamente tratada con metabisulfito de sodio, sobre el contenido de los compuestos de interés obtenidos tras la extracción. En este caso la prueba se realizó únicamente empleando Viscozym-L, puesto que el efecto del tipo de preparado enzimático no resultaba relevante para efectos de la prueba.

Materia prima

Se utilizó pulpa de café recolectada en diciembre del 2015, empacada en bolsas de polietileno de alta densidad y almacenada en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Descripción del proceso

La pulpa de café fue descongelada y adicionada con 0,5 % m/m de metabisulfito de sodio, posteriormente se prensó, secó con aire caliente a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una humedad de 5% y se molió con un molino ciclón centrífugo.

Se rehidrataron 50 g de la pulpa seca en proporción 1 g/10 mL de buffer de citrato-ácido cítrico pH= 5; dicha proporción permitió la adecuada hidratación y agitación de la pulpa. En cuanto al pH del medio, este se encuentra entre el rango óptimo del preparado enzimático empleado. Posteriormente, se calentó hasta una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez alcanzada dicha temperatura, la cual fue controlada mediante un baño con agua caliente, se empleó un agitador a 225 rpm para obtener una agitación uniforme que permitiese mantener en suspensión todo el sustrato y propiciar un buen mezclado. El cuadro VIII muestra los tratamientos evaluados; para el tratamiento con preparado enzimático, se

agregaron Y ppm de V, diluido al 10 % v/v en el buffer; para el tratamiento control se adicionó agua en igual volumen.

Cuadro VIII. Tratamientos evaluados para la determinación del efecto del tratamiento enzimático sobre la extracción de los compuestos de interés en pulpa de café seca tratada con metabisulfito de sodio.

| Tratamiento | Preparado enzimático |
|--------------------|-----------------------------|
| 1 | Sin preparado enzimático |
| 2 | V |

Se extrajeron muestras de 20 mL al inicio y al final de la maceración enzimática. Dichas muestras fueron empacadas en viales color ámbar y almacenadas en congelación a -18 °C para el posterior análisis del contenido de los ácidos CA, FA y C5Q.

La figura 9 presenta de forma esquematizada el procedimiento realizado.

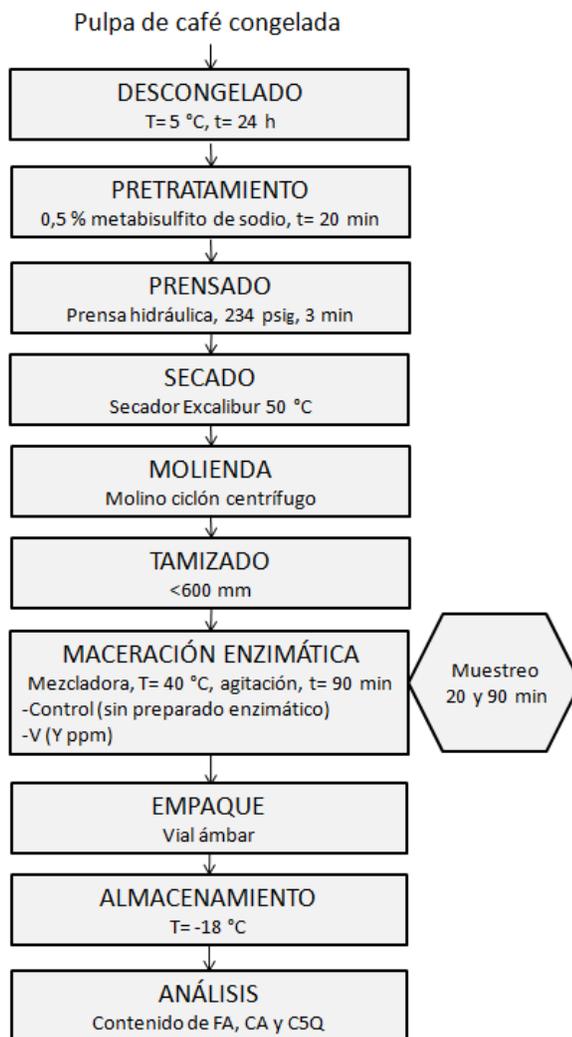


Figura 9. Diagrama del proceso de maceración enzimática sobre pulpa seca, adicionada con metabisulfito de sodio, para la extracción de los compuestos de interés.

Diseño experimental

Se realizó un diseño irrestricto aleatorio de dos tratamientos para evaluar el efecto de la adición del preparado enzimático sobre la variación en el contenido del FA, CA y el C5Q presentes en el extracto de pulpa de café seca tratada con metabisulfito de sodio. Se empleó el preparado enzimático V, además de una muestra control sin preparado enzimático, con dos repeticiones para cada uno.

Análisis de los datos

Con los resultados generados se realizó un análisis de t-student para las variables respuesta, y se determinó con una $p < 0,05$ si existían diferencias significativas entre los resultados de los efectos.

Determinación de la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café adicionada con metabisulfito de sodio tras su procesamiento y almacenamiento en distintas condiciones

Considerando el carácter estacional del café, resulta necesario la búsqueda de métodos que permitan la estabilización y almacenaje de la pulpa, por lo que se evaluó el efecto de la adición de 0,5 % m/m de metabisulfito de sodio sobre el contenido del C5Q tras el almacenaje de la pulpa mediante dos metodologías.

Materia prima

Se utilizó pulpa de café recolectada en febrero del 2016, almacenada en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ la noche anterior a su procesamiento.

Descripción del proceso

Se tomó una muestra de la pulpa fresca para la determinación del contenido del C5Q presente en la pulpa antes de su procesamiento y almacenamiento; posteriormente, la pulpa se fraccionó en dos porciones, a una de las cuales se le adicionó 0,5 % m/m de metabisulfito de sodio. Tras 20 min de la adición, se tomaron muestras de ambas porciones, se analizaron y se compararon contra la pulpa fresca para la determinación del efecto de la adición del metabisulfito de sodio sobre el contenido del C5Q. El recuadro A de la figura 10 detalla este proceso.

Posteriormente la porción de pulpa con metabisulfito de sodio fue prensada mediante una prensa hidráulica para la remoción de la mayor cantidad de jugo posible. De la torta obtenida del prensado se tomó una muestra para su análisis y posterior

comparación. La torta del prensado se fraccionó en dos porciones, una de ellas fue empacada al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad y mantenida a temperatura ambiente, con la liberación frecuente del gas producido. La otra porción fue secada con aire a 50 °C hasta alcanzar una humedad de 5 % y almacenada a temperatura ambiente. Finalmente, ambas fracciones fueron almacenadas durante 40 días, a cuyo término se analizaron para la determinación del efecto de las condiciones de la pulpa durante el almacenamiento sobre la variación en el contenido del C5Q. El recuadro B de la figura 10 detalla este proceso.

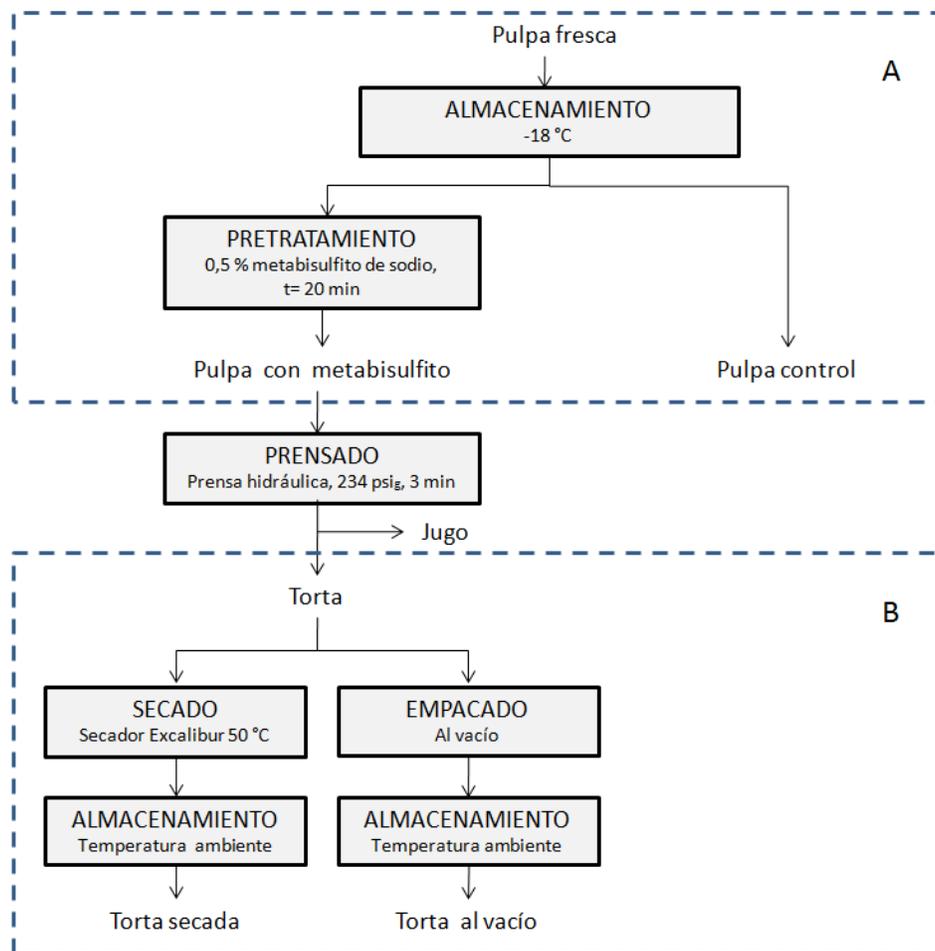


Figura 10. Diagrama del proceso para la determinación de la estabilidad del ácido 5-cafeoilquinico a lo largo del proceso de estabilización y almacenamiento de la pulpa.

Diseño experimental

Se empleó un diseño irrestricto aleatorio de dos tratamientos y tres repeticiones, para evaluar el efecto de la adición del metabisulfito de sodio 0,5 % m/m sobre la variación en el contenido del C5Q presente en la pulpa de café.

Empleando el mismo diseño experimental y cantidad de repeticiones, se evaluó el efecto de las condiciones de la pulpa durante el almacenamiento sobre la variación en el contenido del C5Q presente en la pulpa de café sulfitada. Para esto se evaluaron los tratamientos de pulpa secada con aire caliente y pulpa empacada al vacío.

Análisis de los datos

Con los resultados generados de ambos diseños experimentales, se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) a las variaciones en el contenido del C5Q, y se determinó con una $p < 0,05$ si existían diferencias significativas entre los resultados de los efectos.

4.5 Métodos de análisis fisicoquímicos

Determinación del pH

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-012 (CITA, 2014a), basado en el método AOAC 981.12 (AOAC, 2005a).

Determinación de la acidez

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-011 (CITA, 2014b), el cual considera el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005b).

Determinación del contenido de sólidos solubles

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-046 (CITA, 2014c), basado en el método AOAC 932.12 (AOAC, 2005c).

Determinación del contenido de ácidos orgánicos (cítrico, tartárico, málico y succínico)

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-043 (CITA, 2009), de acuerdo con el método empleado por Gokturk (2006).

Determinación de la humedad

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-002 (CITA, 2014d), con base en el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005d).

Determinación del contenido de proteína

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-003 (CITA, 2014e), según el método AOAC 920.152 (AOAC, 2005e).

Determinación del contenido de grasa

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-005 (CITA, 2014f), basado en el método desarrollado por Carpenter *et al.* (1993).

Determinación del contenido de cenizas

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-004 (CITA, 2014g), basado en el método AOAC 940.26 (AOAC, 2005f).

Determinación del contenido de azúcares

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-006 (CITA, 2014h), basado en los métodos desarrollados por Pirisino (1983) y Sullivan & Carpenter (1993).

Determinación de la capacidad antioxidante

Se determinó mediante el método AQCITA-M037 (CITA, 2010), en el cual la capacidad antioxidante es determinada mediante el seguimiento por espectrofotometría, de la cinética de reacción de fluoresceína. De acuerdo con lo descrito por Huang *et al.* (2002), Wu *et al.* (2004) y Huang *et al.* (2005).

Determinación del contenido de polifenoles totales

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-048 (CITA, 2015a), en el cual se cuantifican los polifenoles totales mediante el seguimiento por espectrofotometría UV/Vis. de la reacción redox entre el reactivo Folin Ciocalteu y los polifenoles. De acuerdo con lo descrito por Slinkard & Singleton (1997) y Georgé *et al.* (2005).

Determinación del contenido de fibra dietética

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-007 (CITA, 2014i), basado en el método AOAC 985.29 (AOAC, 2005g).

Determinación del contenido de minerales (sodio, potasio, calcio y hierro)

Se determinó mediante el método P-SA-MQ-035 (CITA, 2014j), basado en los métodos AOAC 985.35 (AOAC, 2012a) y AOAC 999.11 (AOAC, 2012b).

Determinación del contenido de minerales (cobre y manganeso)

Fue determinado por el Laboratorio de Química del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA), basado en los métodos AOAC 975.03 (AOAC, 1996a) y AOAC 968.08 (AOAC, 1996b).

Determinación del contenido de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico

Se determinó mediante el método desarrollado, el cual se detalla en el Anexo.

Determinación de turbidez

Se determinó empleando un turbidímetro marca HACH modelo 2100 AN, para lo cual se llena el recipiente con aproximadamente 30 mL de la muestra homogénea y se agita suavemente. Se coloca la muestra en el equipo y se realiza la medición a los 30 s.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café.

Curvas de calibración

Para la cuantificación del contenido de los compuestos de interés presentes en las muestras producto de las distintas pruebas desarrolladas, se elaboraron curvas de calibración para los ácidos cafeico (CA), ferúlico (FA) y 5-cafeoilquínico (C5Q), los cuales son, según Torres *et al.* (2011), los de mayor contenido en la pulpa de café.

Para la identificación de las señales asociadas a los patrones empleados, la figura 11 presenta la superposición de los tres cromatogramas obtenidos tras la inyección de cada patrón de manera individual.

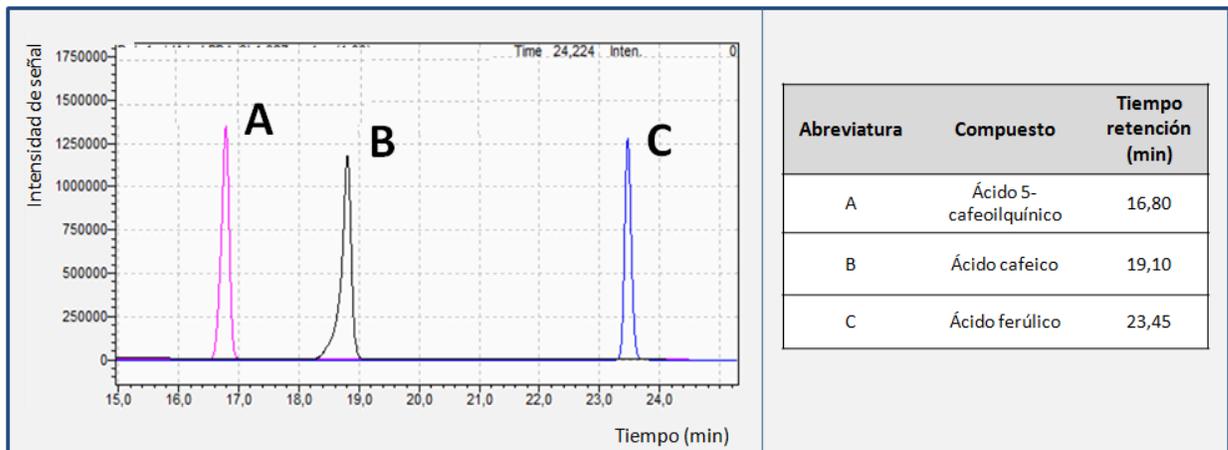


Figura 11. Cromatogramas de los patrones de FA, CA y C5Q analizados y sus respectivos tiempos de retención.

A partir de las señales presentes en los cromatogramas mostrados en la figura 11, se determinaron los tiempos de retención mostrados para cada uno de los compuestos de interés, es decir, el tiempo que tarda cada compuesto en atravesar la columna de

cromatografía, lo cual posteriormente permitió identificar dichos compuestos en las muestras analizadas, al presentar tiempos de retención similares.

Las curvas de calibración son la técnica más común para la calibración instrumental, en la cual se emplea una serie de disoluciones de distinta concentración, y estas se relacionan con la respuesta obtenida por el equipo (Raposo, 2016). Las figuras 12, 13 y 14 muestran la relación entre la concentración y la respuesta para los patrones evaluados, así como las gráficas de regresión lineal, las cuales permiten evaluar estadísticamente dicha relación entre las variables, además de establecer las ecuaciones que las modelan.

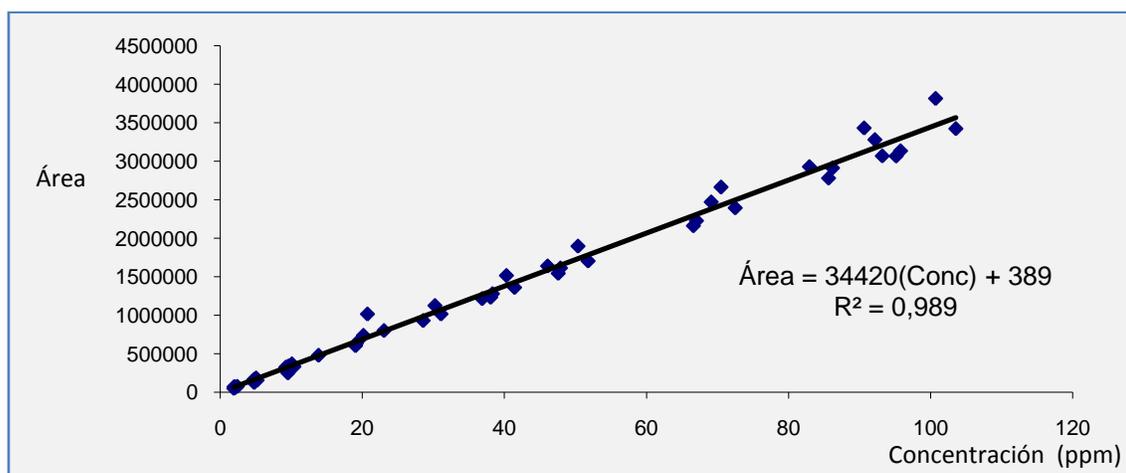


Figura 12. Curva de calibración para el ácido 5-cafeoilquínico.

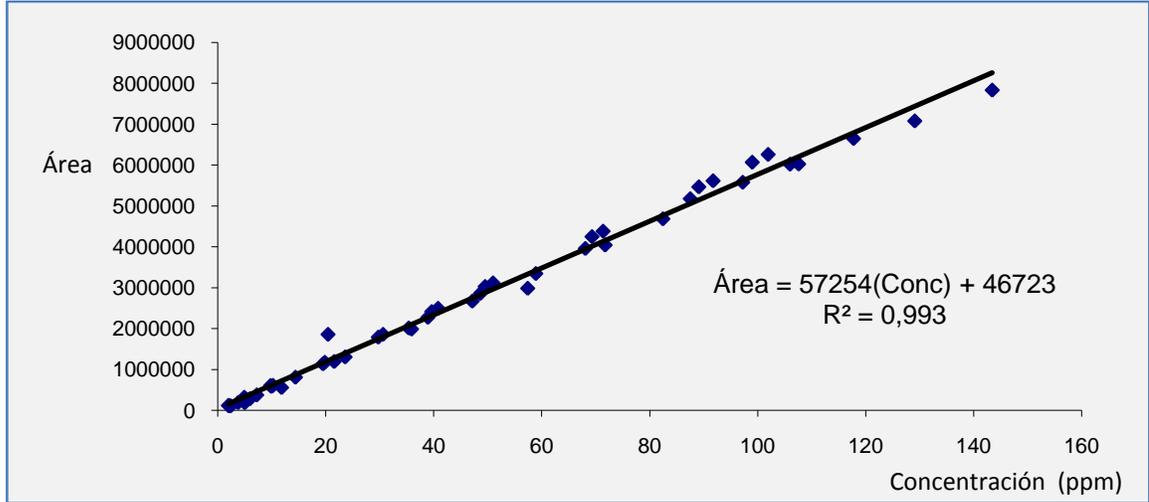


Figura 13. Curva de calibración para el ácido cafeico.

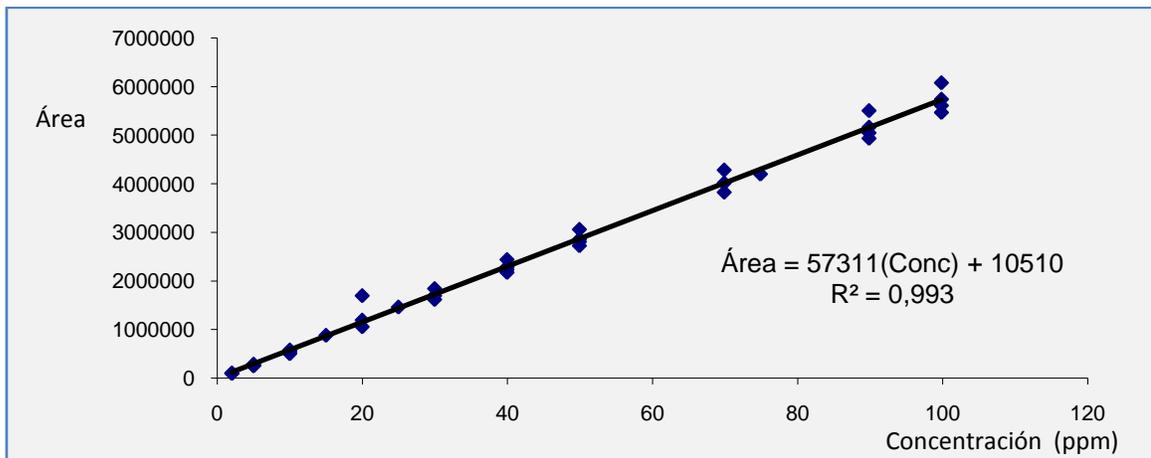


Figura 14. Curva de calibración para el ácido ferúlico.

El Cuadro IX detalla los parámetros de las regresiones lineales empleados para la determinación de las ecuaciones necesarias para la cuantificación de los compuestos de interés.

Cuadro IX. Parámetros obtenidos a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración de los compuestos evaluados.

| Parámetro | Valor | | |
|--|----------------------------|------------------|-------------------|
| | Ácido 5- cafeoilquínico | Ácido cafeico | Ácido ferúlico |
| p modelo | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 |
| R ² | 0,9895 | 0,9930 | 0,9933 |
| R ² ajustado | 0,9893 | 0,9928 | 0,9932 |
| Pendiente (Área/ppm) | 34 420 | 57 254 | 57 311 |
| Incertidumbre de la pendiente (Área/ppm) | 516 | 703 | 771 |
| Intercepto (Área) | 389 | 46 723 | 10 510 |
| Incertidumbre del intercepto (Área) | 27 117 | 42 888 | 41 669 |

Cabe resaltar que los análisis de regresión lineal para los tres compuestos de interés presentan modelos significativos ($p < 0,0001$), además de coeficientes de determinación cercanos a 1, parámetros comúnmente empleados para la evaluación de la calibración de un método analítico (Raposo, 2016). Adicionalmente, estos presentan coeficientes de determinación ajustados igualmente cercanos a 1, lo cual resulta aún más importante puesto que este parámetro normaliza el valor del coeficiente de determinación tomando en cuenta el número de coeficientes en el modelo matemático, por lo que corresponde a un parámetro más estricto para la evaluación del modelo que el coeficiente de determinación (Montgomery, 2004).

Por lo tanto, las ecuaciones generadas para las curvas de calibración relacionan en buena medida la concentración en las disoluciones patrón y la señal obtenida del equipo, de modo que permiten estimar la concentración de los compuestos de interés presentes en las muestras analizadas.

A partir de los valores mostrados en el Cuadro IX, a continuación se presentan las ecuaciones 6, 7 y 8 que describen las curvas de calibración empleadas.

- Ácido 5-cafeoilquínico:

$$\text{Area} = 34\,420 * (\text{Concentración (ppm)}) + 389 \quad (6)$$

- Ácido cafeico:

$$\text{Area} = 57\,254 * (\text{Concentración (ppm)}) + 46\,723 \quad (7)$$

- Ácido ferúlico:

$$\text{Area} = 57\,311 * (\text{Concentración (ppm)}) + 10\,510 \quad (8)$$

Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Para la adecuada cuantificación de un analito, es necesaria la determinación de los límites de detección y cuantificación. El primero permite establecer la presencia o no del analito en una muestra, mientras que el segundo define si su concentración puede ser determinada de manera confiable (Zorn *et al.*, 1997).

A partir de los parámetros obtenidos de la regresión lineal (desviación estándar del intercepto y la pendiente) detallados en el Cuadro IX y considerando las ecuaciones 1 y 2 de la sección IV, se determinaron los límites de detección y cuantificación respectivamente, mostrados en el Cuadro X para cada uno de los compuestos de interés.

Cuadro X. Límites de detección y cuantificación para los compuestos evaluados.

| Límite | Valor (ppm) | | |
|---------------------|------------------------|---------------|----------------|
| | Ácido 5-cafeoilquínico | Ácido cafeico | Ácido ferúlico |
| Detección (LD) | 2,36 | 2,25 | 2,18 |
| Cuantificación (LQ) | 7,88 | 7,49 | 7,27 |

Comparando los resultados obtenidos contra lo propuesto por Craig *et al.* (2016), cuyo método de análisis presenta un límite de cuantificación de 1,25 ppm para el ácido 5-cafeoilquínico, el método desarrollado evidencia elevados límites de cuantificación, por lo que resulta útil para muestras con contenidos superiores a las 8 ppm. Lo anterior podría deberse al método empleado para la determinación de los límites, puesto que de acuerdo

con Zorn *et al.* (1997), el uso de la regresión lineal define límites más estrictos que aquellos definidos mediante otros métodos como por ejemplo la relación señal-ruido, la cual suele ser bastante empleada en métodos cromatográficos.

Establecimiento del método de preparación de la muestra

Se evaluó el uso de cuatro agentes precipitantes con el objetivo de remover el material coloidal presente en el extracto obtenido de la pulpa de café, y de esta forma purificar dichos extractos para su análisis; los resultados de la adición de estas sustancias se muestran en el Cuadro XI.

Cuadro XI. Contenido de compuestos de interés obtenidos tras la adición de distintos agentes precipitantes.

| Agente precipitante | Contenido (ppm) | | |
|---------------------|----------------------------|---------------|----------------|
| | Ácido 5-cafeoilquínico | Ácido cafeico | Ácido ferúlico |
| NaCl | 56,83 ± 0,15 ^a | 10,33 ± 3,18 | ND |
| Etanol | 54,92 ± 0,57 ^{ab} | NC | ND |
| Sulfato de amonio | 54,52 ± 1,01 ^{bc} | NC | ND |
| Control | 52,93 ± 1,32 ^c | NC | ND |
| Reactivo Carrez | 7,73 ± 0,57 ^d | ND | ND |

Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). NC: No cuantificable. ND: No detectable.

Considerando los LD y LQ definidos anteriormente, se encuentra que en las muestras analizadas los ácidos cafeico y ferúlico presentan concentraciones inferiores a las requeridas para su cuantificación y detección respectivamente, por lo que la definición del agente precipitante a utilizar se realizó tomando en consideración únicamente el contenido de ácido 5-cafeoilquínico. Lo anterior se debe a que según Rodríguez *et al.* (2014), el contenido de ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café es de entre 95,4 % y 97,5 % del contenido total de los ácidos hidroxycinámicos y clorogénicos en muestras de café costarricense.

Contrario a lo encontrado por Ky *et al.* (1997), quienes definen el tratamiento con el reactivo Carrez como el que brinda mejores resultados, en este caso fue el que presentó resultados inferiores, esto podría deberse a que dichos autores comparan el método con adición de reactivo Carrez, contra métodos con una serie mayor de etapas, en las cuales podría presentarse pérdida del analito.

En cuanto al sulfato de amonio, esta suele ser una de las sales más empleadas para la precipitación de proteínas, y suele preferirse sobre otras debido a que tanto su anión como su catión poseen fuerzas iónicas importantes (Kumar *et al.*, 2003). Sin embargo, como se observa en el Cuadro XI, su efecto sobre las muestras provocó concentraciones de C5Q inferiores a las generadas por el cloruro de sodio.

Si bien no se presentan diferencias significativas entre los efectos generados por el etanol y el cloruro de sodio, se decide emplear cloruro de sodio debido a que su adición no provoca la dilución de la muestra, como ocurre al agregarse etanol. Esto disminuye la concentración de los compuestos de interés que pueden no ser detectados debido a los elevados límites de cuantificación.

Por otro lado, el uso de cloruro de sodio permitió la cuantificación del ácido cafeico, lo cual no sucede al emplearse etanol como agente precipitante. Adicionalmente, el uso de cloruro de sodio resulta de menor costo económico en comparación con el uso de etanol por lo que se descarta el uso de este disolvente.

Porcentajes de recuperación

Tras definirse el agente precipitante a emplear para el análisis de las muestras de jugo de pulpa de café, se evaluó el porcentaje de recuperación del método desarrollado en este trabajo. Además, se evaluó el porcentaje de recuperación para el método de análisis de la pulpa seca descrito por Rodríguez *et al.* (2014), con el objetivo de conocer este parámetro, considerando que dicho método fue aplicado a las muestras sólidas analizadas en distintas etapas del proyecto. El Cuadro XII muestra los porcentajes de recuperación promedio tras el enriquecimiento a 2, 50 y 80 ppm de cada uno de los analitos mostrados.

Cuadro XII. Porcentajes de recuperación promedio obtenidos para los compuestos de interés analizados mediante el método desarrollado.

| Muestra analizada | Porcentaje de recuperación promedio (%) | | |
|-------------------------|---|---------------|-------------------|
| | Ácido 5- cafeoilquínico | Ácido caféico | Ácido ferúlico |
| Jugo de pulpa (líquido) | 93,6 ± 5,8 | 92,2 ± 5,2 | 89,3 ± 4,3 |
| Pulpa seca (sólido) | 77,7 ± 24,4 | 99,0 ± 15,7 | 76,4 ± 18,0 |

Datos son reportados como promedio para los tres niveles de enriquecimiento (2, 50 y 80 ppm) ± intervalo de confianza, con un nivel de confianza del 95%.

Con el objetivo de comparar los valores de recuperación promedio obtenidos, el Cuadro XIII muestra los valores recomendados por la AOAC (2002) en función de la concentración del analito.

Cuadro XIII. Porcentajes de recuperación recomendados para la validación de métodos de análisis (AOAC, 2002).

| Concentración del analito | Porcentaje de recuperación (%) |
|---------------------------|--------------------------------|
| 100 % | 98-101 |
| 10 % | 95-102 |
| 1 % | 92-105 |
| 1000 ppm | 90-108 |
| 100 ppm | 85-110 |
| 10 ppm | 80-115 |
| 1 ppm | 75-120 |
| 1 ppb | 70-125 |

De acuerdo con los datos mostrados en el Cuadro XIII, considerando que la concentración promedio de cada uno de los compuestos de interés empleados para la determinación del porcentaje de recuperación fue cercana a las 50 ppm, esto implica que el porcentaje de recuperación recomendado para los analitos debería comprender entre 83 y 113 % aproximadamente. Entonces, es posible afirmar que el método de análisis para el jugo de pulpa posee porcentajes de recuperación adecuados. Esto podría atribuirse a la efectividad del agente precipitante, así como a la simplicidad del método de análisis en el

que la muestra solamente experimenta la precipitación del material coloidal, por lo que se reduce la posibilidad de pérdidas del analito.

Con respecto al método de análisis para muestras sólidas, únicamente el valor obtenido para la recuperación del ácido cafeico se encuentra en el rango recomendado. Los resultados obtenidos para los otros compuestos de interés, así como los amplios intervalos de confianza se atribuyen a la posible pérdida de analito en el residuo de pulpa durante el filtrado.

Precisión del método de análisis

Se determinó mediante la desviación estándar relativa, la precisión del método desarrollado para el análisis del jugo de pulpa, así como la precisión del método descrito por Rodríguez *et al.* (2014) para el análisis de la pulpa seca; los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro XIV.

Cuadro XIV. Desviación estándar relativa obtenida para el contenido de los compuestos de interés presentes en el jugo y la pulpa seca.

| Muestra analizada | Desviación estándar relativa (%) | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------------|----------------|
| | Ácido 5-cafeoilquínico | Ácido cafeico | Ácido ferúlico |
| Jugo de pulpa (líquido) | 1,31 (114,4 ± 1,2) | ND | ND |
| Pulpa seca (sólido) | 7,14 (7 836 ± 414) | ND | ND |

Datos producto del análisis por septuplicado de la misma muestra. Valor indicado entre paréntesis corresponde a la concentración promedio (ppm) ± intervalo de confianza, con un nivel de confianza del 95 %. ND: No detectado.

Como se evidencia en el Cuadro XIV, en las muestras analizadas únicamente se logra detectar el C5Q, lo cual se debe a lo mencionado anteriormente sobre los bajos contenidos de los demás compuestos de interés, así como los altos límites de detección y cuantificación (Rodríguez *et al.*, 2014).

Para la comparación de los valores de precisión obtenidos, el Cuadro XV muestra los valores recomendados por la AOAC (2002) en función de la concentración del analito.

Cuadro XV. Porcentajes de desviación estándar relativa recomendados para la validación de métodos de análisis (AOAC, 2002).

| Concentración del analito | Desviación estándar relativa (%) |
|----------------------------------|---|
| 100 % | 1 |
| 10 % | 1,5 |
| 1 % | 2 |
| 1000 ppm | 3 |
| 100 ppm | 4 |
| 10 ppm | 6 |
| 1 ppm | 8 |
| 1 ppb | 15 |

Al comparar contra los valores recomendados por la AOAC (2002), el análisis establecido para el jugo de pulpa presenta porcentajes de desviación estándar relativa inferiores al valor máximo establecido ($\approx 4\%$) según la concentración en que se encuentra dicho compuesto, lo cual asegura la precisión del método establecido.

En cuanto a la precisión del método empleado para el análisis de la pulpa seca, este presenta valores fuera de lo recomendado, debido a que de acuerdo con la concentración del analito, el método de análisis debería presentar porcentajes de repetibilidad inferiores a 3%. Nuevamente se considera que la etapa de filtración durante el análisis puede ser la causa de la variación, debido a la posible pérdida de analito.

Una vez definidos los límites de detección y cuantificación, el agente precipitante a utilizar para la remoción del material coloidal presente en las muestras, así como el porcentaje de recuperación y la precisión del método, este fue establecido como se muestra en el Anexo.

A pesar de los bajos porcentajes de recuperación y precisión para el método de análisis de la pulpa seca, se decide su empleo con el objetivo de comparar entre tratamientos evaluados posteriormente, considerando que las deficiencias del método son constantes para las distintas muestras analizadas.

5.2 Caracterización de la composición fisicoquímica de la pulpa de café

Se analizó la composición fisicoquímica de la pulpa de café en cinco momentos distintos de la cosecha 2014-2015, obteniéndose los resultados mostrados en el Cuadro XVI.

Al analizar de manera general las distintas variables evaluadas en la pulpa obtenida como subproducto del beneficiado, no se aprecian patrones claros a lo largo del tiempo de cosecha que sean consistentes entre las variables, y que puedan ser atribuidos al nivel de maduración de los frutos de café, a pesar de la presencia de una mayor proporción de granos inmaduros procesados al inicio y al final de la cosecha.

La gran variabilidad obtenida entre fechas de recolección puede atribuirse a diversos factores además del grado de madurez, como por ejemplo el origen geográfico de los frutos, que incluye aspectos como altitud y tipo de suelo, la variedad de la planta (Caturra o Catuaí), e inclusive la eficiencia del procesamiento (Pandey *et al.*, 2000). En el caso específico de la pulpa empleada como materia prima, esta proviene de café cultivado entre los 1300-1800 msnm, de regiones como Tres Ríos en Cartago, así como de la zona de los Santos en San José.

El contenido de humedad de las muestras de pulpa de café, presenta en promedio 85 g/100 g de pulpa fresca, el cual coincide con lo determinado por Ferreira (2014), quien al considerar la combinación de la pulpa de café y el mucílago encuentra un contenido de humedad de 83 g/ 100 g de pulpa fresca. Adicionalmente, lo determinado por dicha autora con respecto al contenido de proteína (1,6 %) y el contenido de ceniza (0,7 %) respalda los resultados obtenidos para dichas variables.

El contenido de grasa promedio se ajusta al valor de 0,2 % reportado por Ribeiro *et al.* (2014). Ahora, de acuerdo con Torres (2013) el contenido de fibra determinado se encuentra entre el rango reportado de 4,5-6,0 %, y la suma de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa se aproxima a un valor de 4 %. El valor de pH obtenido concuerda con el obtenido por Ulloa *et al.* (2003) quienes reportan un valor de pH de 4,5 previo a la fermentación de la pulpa de café.

Cuadro XVI. Caracterización fisicoquímica de la pulpa de café recolectada a lo largo de la cosecha.

| Análisis | Fecha de recolección | | | | | Promedio |
|--|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------|
| | 18 Diciembre 2014 | 12 Enero 2015 | 19 Enero 2015 | 18 Febrero 2015 | 11 Marzo 2015 | |
| Humedad (g/ 100 g) | 86 ± 4 | 84 ± 4 | 84,2 ± 0,3 | 84,5 ± 0,3 | 87,2 ± 0,1 | 85 ± 2 |
| Proteína N*6,25 (g/ 100 g) | 1,27 ± 0,05 ^d | 1,41 ± 0,02 ^b | 1,531 ± 0,004 ^a | 1,34 ± 0,01 ^c | 1,30 ± 0,01 ^{cd} | 1,4 ± 0,1 |
| Grasa (g/ 100 g) | 0,142 ± 0,005 ^{bc} | 0,172 ± 0,002 ^b | 0,223 ± 0,006 ^a | 0,118 ± 0,002 ^c | 0,15 ± 0,03 ^{bc} | 0,16 ± 0,04 |
| Ceniza (g/ 100 g) | 0,8 ± 0,1 ^c | 1,12 ± 0,02 ^a | 0,82 ± 0,04 ^c | 1,02 ± 0,02 ^{ab} | 0,88 ± 0,01 ^{bc} | 0,9 ± 0,1 |
| Fibra (g/ 100 g) | 5,3 ± 0,1 ^c | 6,3 ± 0,2 ^a | 6,1 ± 0,4 ^{ab} | 5,49 ± 0,02 ^{bc} | 5,717 ± 0,002 ^{abc} | 5,8 ± 0,5 |
| pH | 4,3 ± 0,0 ^e | 4,64 ± 0,01 ^a | 4,49 ± 0,02 ^c | 4,56 ± 0,01 ^b | 4,46 ± 0,01 ^d | 4,5 ± 0,1 |
| Sólidos solubles (° Brix) | 10,0 ± 0,2 ^b | 7,242 ± 0,004 ^d | 10 ± 0,0 ^b | 11,070 ± 0,004 ^a | 8,1 ± 0,0 ^c | 9 ± 2 |
| Fructosa (g/ 100 g) | 2,2 ± 0,2 ^b | 1,65 ± 0,03 ^d | 1,85 ± 0,03 ^{cd} | 3,5 ± 0,1 ^a | 1,92 ± 0,01 ^c | 2,2 ± 0,8 |
| Glucosa (g/ 100 g) | 2,7 ± 0,2 ^a | 2,5 ± 0,3 ^a | 2,79 ± 0,09 ^a | 2,5 ± 0,1 ^a | 1,54 ± 0,04 ^b | 2,4 ± 0,6 |
| Sacarosa (g/ 100 g) | ND | ND | ND | 0,14 ± 0,04 | ND | 0,14 ± 0,04 |
| Polifenoles totales (mg GAE/ 100 g) | 212,3 ± 0,9 ^b | 270 ± 13 ^a | 221 ± 5 ^b | 199 ± 5 ^b | 198 ± 12 ^b | 220 ± 31 |
| Capacidad antioxidante ORAC (µmol TE/ 100 g) | 3671 ± 377 ^c | 5204 ± 602 ^a | 4290 ± 507 ^b | 3964 ± 401 ^{bc} | 2857 ± 350 ^b | 4059 ± 988 |

Datos reportados en base húmeda como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). ND: No detectable.

Cuadro XVI (Continuación). Caracterización fisicoquímica de la pulpa de café recolectada a lo largo de la cosecha.

| Análisis | Fecha de recolección | | | | | Promedio |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| | 18 Diciembre 2014 | 12 Enero 2015 | 19 Enero 2015 | 18 Febrero 2015 | 11 Marzo 2015 | |
| Acidez (g ácido málico/100 g) | 0,258 ± 0,004 ^b | 0,186 ± 0,001 ^d | 0,272 ± 0,003 ^a | 0,25 ± 0,01 ^b | 0,21 ± 0,01 ^c | 0,24 ± 0,04 |
| Ácido cítrico (g/ 100 g) | ND | ND | ND | 0,03 ± 0,02 | 0,008 ± 0,004 | 0,02 ± 0,01 |
| Ácido tartárico (g/ 100 g) | 0,016 ± 0,008 | 0,015 ± 0,001 | 0,03 ± 0,01 | 0,020 ± 0,002 | 0,036 ± 0,001 | 0,02 ± 0,01 |
| Ácido málico (g/ 100 g) | 0,145 ± 0,002 ^a | 0,12 ± 0,01 ^{ab} | 0,16 ± 0,03 ^a | 0,16 ± 0,02 ^a | 0,08 ± 0,02 ^b | 0,13 ± 0,04 |
| Ácido succínico (g/ 100 g) | 0,09 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,11 ± 0,07 | 0,04 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 0,07 ± 0,04 |
| Ácido oxálico (g/ 100 g) | ND | ND | ND | ND | 0,006 ± 0,002 | 0,006 ± 0,002 |
| Sodio (mg/ 100 g) | 6 ± 2 ^{ab} | 7,3 ± 0,7 ^a | 1,3 ± 0,1 ^c | 4 ± 1 ^b | 1,8 ± 0,2 ^c | 4 ± 3 |
| Potasio (mg/ 100 g) | 318 ± 8 ^d | 425 ± 21 ^b | 424 ± 9 ^b | 495 ± 14 ^a | 371 ± 5 ^c | 407 ± 70 |
| Calcio (mg/ 100 g) | 36,6 ± 0,3 ^c | 43 ± 2 ^{ab} | 44 ± 2 ^a | 43 ± 1 ^{ab} | 40,4 ± 0,6 ^b | 41 ± 3 |
| Hierro (mg/ 100 g) | 0,7 ± 0,1 ^c | 1,15 ± 0,08 ^b | 1,20 ± 0,07 ^b | 1,48 ± 0,05 ^a | 1,3 ± 0,1 ^{ab} | 1,2 ± 0,3 |
| Cobre (mg/ 100 g) | ND | 0,16 ± 0,01 ^b | 0,19 ± 0,01 ^a | 0,20 ± 0,01 ^a | 0,18 ± 0,01 ^{ab} | 0,18 ± 0,02 |
| Manganeso (mg/ 100 g) | ND | 0,79 ± 0,02 ^a | 0,46 ± 0,01 ^c | 0,79 ± 0,02 ^a | 0,70 ± 0,02 ^b | 0,7 ± 0,2 |

Datos reportados en base húmeda como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). ND: No detectable.

El valor obtenido de sólidos solubles promedio concuerda con lo determinado por Tavares *et al.* (2013), quienes realizaron la medición de este parámetro en pulpa de café previo a la fermentación para la obtención de etanol. Sin embargo, de acuerdo con Marín *et al.* (2003), el contenido de sólidos solubles presentes en la pulpa de café puede alcanzar hasta 20 °Brix en frutos sobremaduros; por lo tanto, el valor obtenido podría deberse a la presencia de frutos sin madurar.

En cuanto a la diferencia entre el contenido de sólidos solubles y la suma de los compuestos hidrosolubles reportados, cabe considerar que la pulpa es un material rico en otros compuestos no presentados en el Cuadro XVI, como lo son más de cien compuestos fenólicos, entre ellos ácidos clorogénicos y ácidos hidroxicinámicos, cafeína, así como antocianidinas y flavanoles (Torres, 2013; Tavares *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayor porción de la diferencia puede encontrarse asociada al contenido de fibra soluble presente, como por ejemplo pectina (Torres, 2013).

Con respecto a los ácidos orgánicos determinados, destacan el ácido málico y succínico como los de mayor contenido, por encima de los ácidos cítrico, oxálico y tartárico. El valor promedio obtenido para la acidez supera los valores reportados por Navia *et al.* (2011), así como por Marín *et al.* (2003), quienes encontraron valores de hasta 0,11 g ácido málico/100 g pulpa fresca y 0,14 g ácido málico/100 g pulpa fresca, respectivamente para frutos de café Arábica de la variedad *Colombia*.

En cuanto al contenido de minerales presentes en la pulpa de café, todos los valores determinados experimentalmente resultan inferiores a los reportados en la literatura, donde se establecen para 100 g de pulpa fresca, contenidos de 480 mg; 80 mg; 4,2 mg; 0,38 mg y 1,36 mg para el potasio, calcio, hierro, cobre y manganeso respectivamente (Rodríguez-Valencia, 2003). En este caso resulta importante considerar que la composición del suelo de cultivo es un factor decisivo en el contenido de minerales, especialmente aquellos encontrados en bajas concentraciones (Farah, 2012). Adicionalmente, el potasio resalta como el mineral de mayor concentración, coincidiendo esto con el contenido de minerales presentes en el grano de café, en los cuales el potasio comprende hasta un 40 % del total, lo

que evidencia una alta relación entre el contenido de minerales de la pulpa y la semilla de café (Farah, 2012).

Según Murthy & Naidu (2010), el contenido de polifenoles presente en la pulpa de café es de 222 mg de ácido gálico por cada 100 g de pulpa fresca, por lo que el resultado obtenido coincide con el valor determinado por ambos autores. Finalmente, con respecto a la capacidad antioxidante *in vitro* de la pulpa de café, no se encontró en la literatura información que permitiese comparar contra el valor obtenido; sin embargo, esta debe ser inferior a la que presenta el fruto de café entero, debido al alto contenido de compuestos con actividad antioxidante presentes en la semilla. Esto se confirma al comparar el dato obtenido contra el valor de 17 616 μmol de equivalentes de Trolox/100 g fruto de café reportado por Mullen *et al.* (2011), considerando un fruto de café entero con 76 % de humedad (Sadeghian *et al.*, 2003).

La capacidad antioxidante obtenida para la pulpa de café de manera *in vitro*, se aproxima a la reportada para frutas como arándanos, cerezas, granada real y fresas (4 669, 3 747, 4 479 y 4 302 μmol de equivalentes de Trolox/100 g de fruta respectivamente) e inferior a la de frutas como açai, mora y arándano rojo (102 700, 5 905 y 9 090 μmol de equivalentes de Trolox/100 g de fruta respectivamente) (Haytowitz & Bhagwat, 2010).

5.3 Evaluación de distintos métodos enzimáticos para la extracción de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en la pulpa de café

Cinéticas de maceración enzimática sobre pulpa de café

Con el objetivo de hidrolizar las paredes celulares y con ello favorecer la extracción de los ácidos hidroxycinámicos y clorogénicos, se evaluó el efecto de la adición de tres preparados enzimáticos sobre la variación en el contenido de los compuestos de interés. La figura 15 muestra las cinéticas de extracción para el C5Q, el cual corresponde al único compuesto detectado.

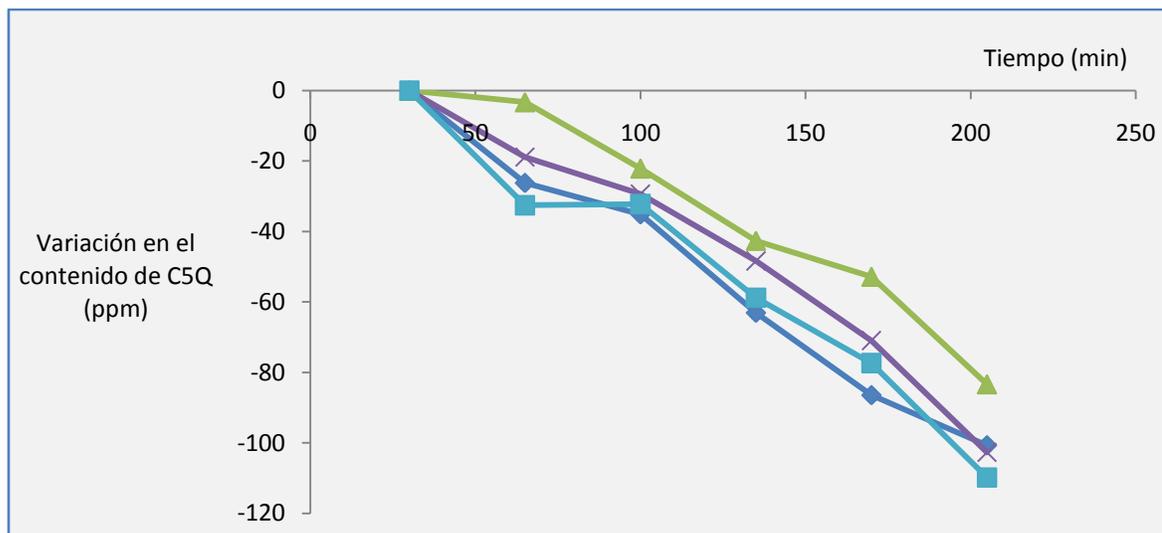


Figura 15. Relación entre el tiempo de maceración enzimática y la variación promedio (n=2) en el contenido de C5Q (♦ Control, ▲ C, × V, ■ U).

Como se observa de modo general en la figura 15, la adición de los preparados enzimáticos no produjo variaciones positivas en el contenido del C5Q a lo largo de las cinéticas de maceración enzimática, sino que por el contrario el contenido de dicho compuesto disminuye significativamente ($\alpha=0,05$) conforme avanza el tiempo. Adicionalmente, dicha disminución se muestra en la misma medida sin presentarse diferencias significativas entre los preparados enzimáticos empleados.

Los resultados obtenidos contradicen lo obtenido por Torres (2013), quien empleó preparados comerciales con distintas actividades enzimáticas logrando una extracción de hasta aproximadamente 69% del contenido de C5Q presente en la pulpa de café tras 8 h de maceración. La diferencia entre los resultados presentados en la figura 15 y los obtenidos por Torres (2013), pueden deberse al efecto de enzimas endógenas presentes, especialmente la polifenoloxidasasa, considerando que según Mazzafera & Robinson (2000) esta enzima presenta preferencia al ácido 5-cafeoilquínico sobre otros sustratos evaluados.

En el caso de las pruebas desarrolladas por Torres (2013), las muestras evaluadas no presentan actividad enzimática debido a que para el desarrollo de las extracciones enzimáticas dicha autora aplica procedimientos sobre la pulpa de café previos a la

extracción, tales como la adición de metanol y el tratamiento en autoclave, lo que permite la inactivación de la polifenoloxidasasa debido a su desnaturalización.

Por otro lado, se evaluó la turbidez de los extractos obtenidos durante la maceración enzimática como parámetro de extracción. La figura 16 muestra la variación en la turbidez en función del tiempo de maceración.

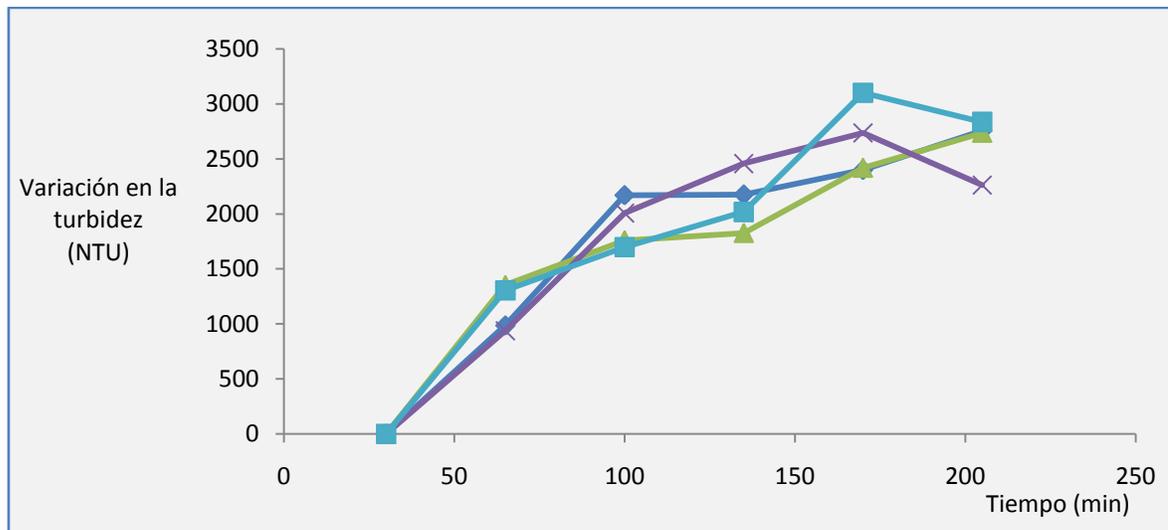


Figura 16. Relación entre el tiempo de maceración enzimática y la variación en la turbidez promedio (n=2) (♦ Control, ▲ C, × V, ■ U).

A lo largo de la maceración enzimática se presentan variaciones significativas ($\alpha=0,05$) en la turbidez de los extractos obtenidos, para todos los tratamientos. Este comportamiento puede deberse tanto a la acción de las enzimas sobre la pulpa de café, como al efecto mecánico producto de la agitación, los cuales desprenden residuos que incrementan la turbidez de los extractos.

Por otro lado, no se muestran diferencias significativas entre el efecto de los tratamientos enzimáticos evaluados y el control, a pesar de que los tres preparados enzimáticos empleados poseen la capacidad de hidrolizar la celulosa, esto como actividad principal para uno de ellos, o actividad secundaria para los preparados restantes, la cual corresponde al principal componente de la pared celular de la pulpa de café (Murthy & Naidu, 2012).

Además, se ha encontrado que preparados con actividades xilanasas y actividades pectinasas como las presentes en algunos de los preparados evaluados, resultan eficaces para la extracción de ácidos hidroxicinámicos (Torres *et al.*, 2011). Por lo tanto, se encuentra que los resultados obtenidos se asocian principalmente a la acción mecánica provocada por la agitación durante el tratamiento enzimático.

Considerando la posible actividad de la polifenoloxidasas endógena de la pulpa de café como la causa de la reducción en la concentración del C5Q, se decidió evaluar la actividad de esta enzima, así como el efecto de la adición de metabisulfito de sodio con el objetivo de inhibir su actividad.

Evaluación de la actividad de la PPO endógena de la pulpa de café tras la adición de 0,5 % de metabisulfito de sodio

El Cuadro XVII presenta los parámetros estadísticos empleados para la evaluación del modelo generado para la determinación del efecto de la adición de metabisulfito de sodio sobre la actividad de la PPO.

Cuadro XVII. Parámetros obtenidos a partir del análisis de varianza para la degradación del C5Q y la formación de productos de la PPO.

| Variable evaluada | Parámetros | | | |
|----------------------------------|------------|----------------|------------------------------------|-----------------|
| | p modelo | R ² | R ² _{ajustado} | P _{fa} |
| Degradación del C5Q | <0,0001 | 0,9666 | 0,9659 | 0,9986 |
| Formación de productos de la PPO | <0,0001 | 0,9054 | 0,9036 | 0,9995 |

Considerando la pertinencia del modelo generado, a partir de la probabilidad de significancia, así como de los coeficientes de determinación y la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}), la figura 17 muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad de la PPO.

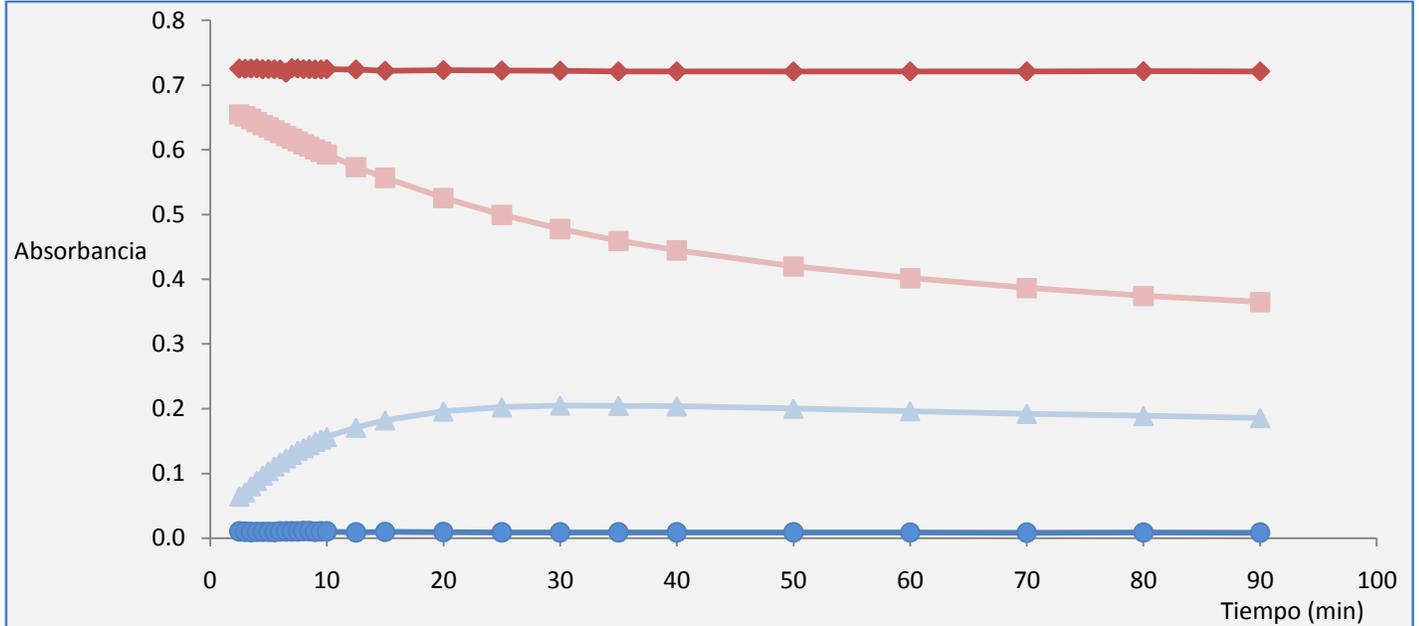


Figura 17. Absorbancias promedio del C5Q (n=3) (♦ pulpa adicionada con 0,5% de Na₂S₂O₅, ■ pulpa control) y absorbancias promedio de los productos de la PPO (n=3) (▲ pulpa control, ● pulpa adicionada con 0,5 % de Na₂S₂O₅).

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 17, el efecto del tiempo sobre las absorbancias del C5Q resulta significativamente distinto ($\alpha=0,05$) entre la pulpa control y la pulpa adicionada con Na₂S₂O₅, siendo siempre constantes las absorbancias asociadas a la pulpa adicionada con Na₂S₂O₅, lo cual se traduce en una ausencia de degradación del C5Q.

De igual forma, el efecto del tiempo sobre las absorbancias de los productos de la PPO resulta significativamente distinto ($\alpha=0,05$) entre la pulpa control y la pulpa adicionada con Na₂S₂O₅, siendo siempre constantes las absorbancias asociadas a la pulpa adicionada con Na₂S₂O₅, lo cual se relaciona con una ausencia de formación de productos.

Cabe señalar que en el caso de la pulpa control, la curva asociada a la degradación del C5Q se relaciona de manera inversa con la curva que modela la formación de los productos de la PPO. Esto demuestra la actividad de degradación de dicha enzima sobre el ácido clorogénico. Por otro lado, para la pulpa adicionada con Na₂S₂O₅ los valores de

absorbancia constantes para las curvas asociadas al C5Q y a sus productos de oxidación confirman la inactivación de la PPO.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado por Bressani *et al.* (1977) quienes tras la adición de 0,5 % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a la pulpa de café, aseguran detener el pardeamiento enzimático. Adicionalmente, Kuijpers *et al.* (2012) lograron la inactivación de la PPO con la adición de NaHSO_3 , otro de los derivados del dióxido de azufre.

De manera cualitativa, la figura 18 muestra el efecto del metabisulfito de sodio sobre la pulpa de café.

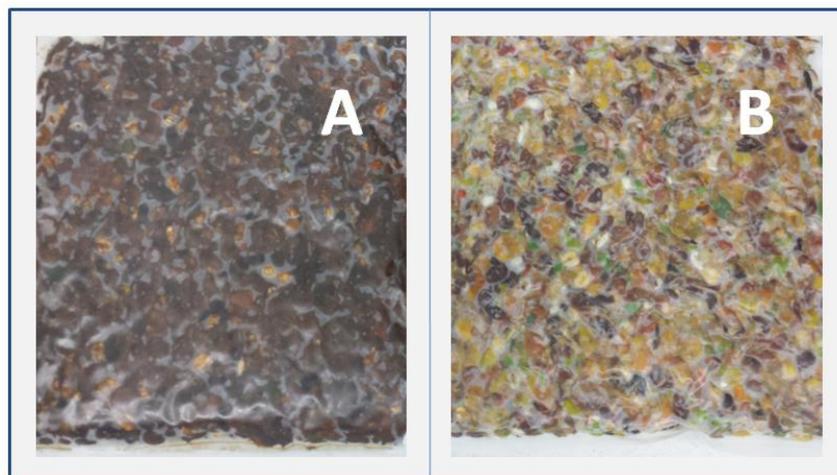


Figura 18. Efecto del metabisulfito de sodio sobre el pardeamiento de la pulpa de café (A: Pulpa control, B: Pulpa adicionada con 0,5 % de metabisulfito de sodio).

Si bien los resultados de la figura 17 confirman la inactivación específicamente de la PPO tras la adición del metabisulfito de sodio, la ausencia de pardeamiento enzimático mostrado en la figura 18 (B), podría indicar además la efectividad del metabisulfito de sodio para la inactivación de otras enzimas presentes en la pulpa de café, tal como la peroxidasa, la cual según Bolaños (2015) posee también una importante actividad sobre compuestos fenólicos.

Maceración enzimática sobre pulpa de café seca, adicionada con 0,5 % de metabisulfito de sodio

Una vez determinada la efectividad del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ para la inactivación de la PPO endógena, se evaluó nuevamente la extracción del C5Q mediante el preparado enzimático Viscozym L, obteniéndose los resultados mostrados en el Cuadro XVIII.

Cuadro XVIII. Variación en el contenido del C5Q tras 70 min de maceración enzimática con V de la pulpa adicionada con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

| Tratamiento | Variación (ppm) |
|----------------------|-----------------|
| Control | -4,27 ± 2,33 |
| Adición de V (Y ppm) | -6,17 ± 3,51 |

Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=2), con un nivel de confianza del 95 %.

A partir del análisis de la información mostrada en el Cuadro XVIII, no se presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las variaciones en el contenido de C5Q en las muestras maceradas con el preparado enzimático V y las muestras control ($p=0,4825$). Lo anterior, puede deberse a que la presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en la pulpa provoque la inactivación del preparado enzimático adicionado o que su actividad de β -glucanasa no resulte la adecuada para la extracción del C5Q.

Según Crepin *et al.* (2003) y Benoit *et al.* (2006), se ha encontrado que las enzimas con actividad feruloilesterasa resultan especialmente importantes para la extracción de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, debido a su capacidad para hidrolizar el enlace éster formado entre estos compuestos y los azúcares presentes en las paredes celulares. Esto confirma que el preparado empleado no posee la actividad enzimática adecuada para la extracción del C5Q; sin embargo, no se descarta el efecto del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ sobre la inactivación del preparado.

Independientemente de la actividad del preparado enzimático, cabe resaltar de manera general, que tras el proceso de extracción el contenido de C5Q disminuye, lo cual

resulta inesperado e indeseable. Narita e Inouye (2013) evaluaron la degradación del C5Q en condiciones similares a las empleadas en el presente trabajo, 37 °C y pH 5, y encontraron que en disolución acuosa la degradación de este compuesto resulta dependiente tanto del tiempo como del pH, y que su degradación suele dar origen a los isómeros 3-cafeoilquínico y 4-cafeoilquínico.

Con el objetivo de corroborar dicha posibilidad, se analizaron las distintas señales presentes en los cromatogramas con el propósito de evidenciar el incremento en alguna de las señales, lo que podría estar asociado a un aumento en el contenido de los isómeros 3 y 4 productos de la transformación del C5Q. La figura 19 muestra la sección de los cromatogramas de muestras obtenidas a los 20 y 90 min de maceración enzimática en donde se presenta el incremento de una señal desconocida.

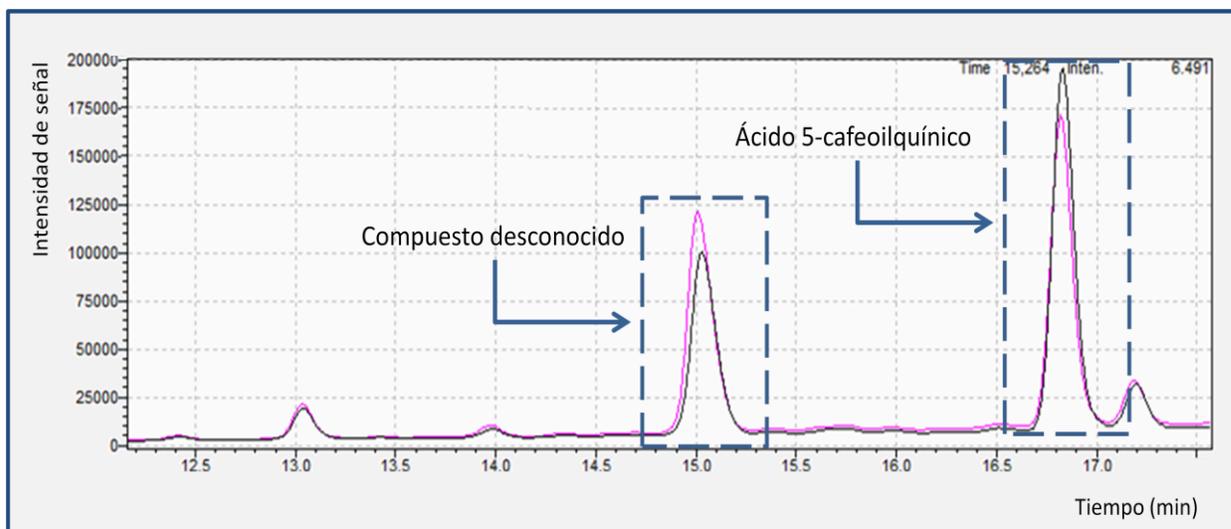


Figura 19. Cromatogramas asociados a una muestra control durante la maceración enzimática (— extracto obtenido a los 20 min; — extracto obtenido a los 90 min).

Como se muestra en la figura 19, tras 70 min de extracción enzimática de la pulpa tratada con 0,5 % de metabisulfito de sodio, se presenta una disminución en la señal asociada al C5Q, y se aprecia un incremento en una señal de intensidad importante correspondiente a un compuesto desconocido.

Para la identificación del compuesto desconocido responsable de la señal, se analizó su espectro de absorción junto con el del C5Q; la figura 20 presenta ambos espectros.

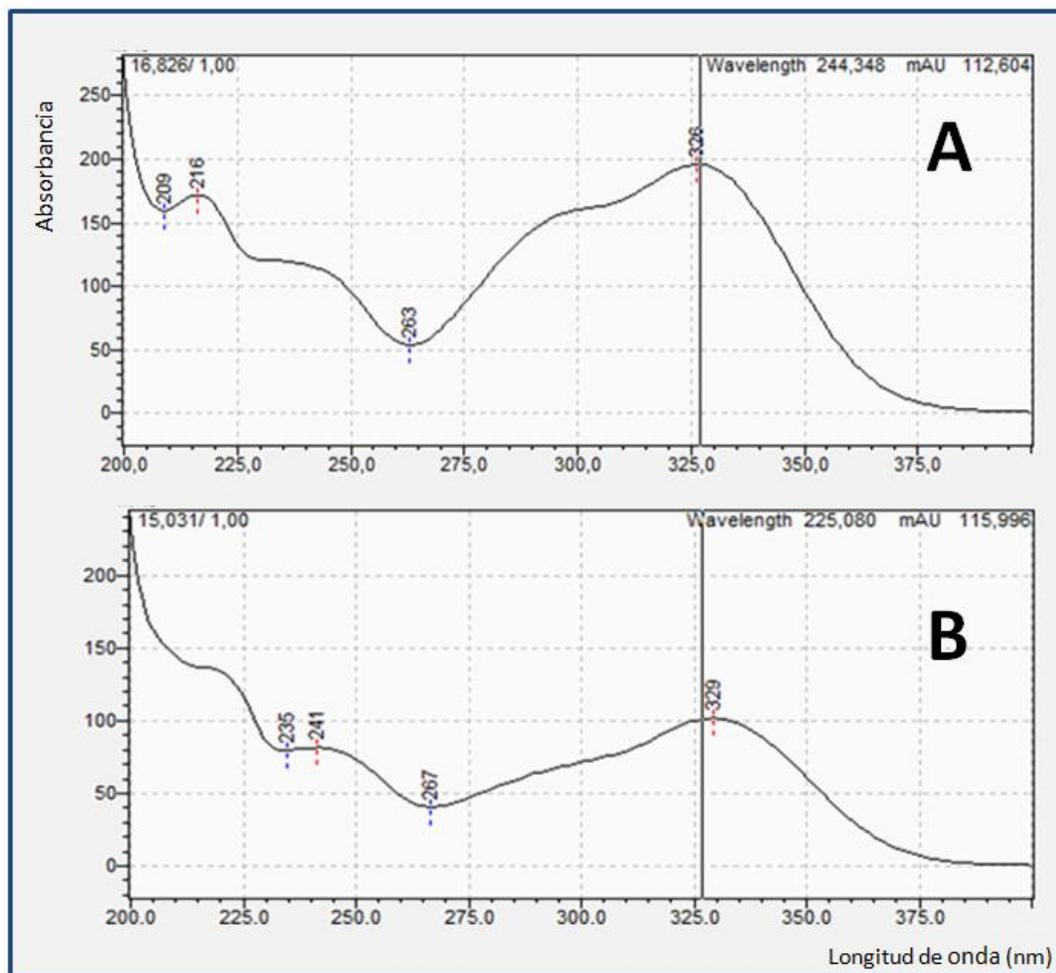


Figura 20. Espectros de absorción asociados al C5Q (A) y al compuesto desconocido (B).

Al comparar los espectros se identifica un mismo patrón de absorción, por lo que es posible determinar que ambos compuestos presentan estructuras moleculares similares, dando un primer indicio de que dicho compuesto corresponda a alguno de los isómeros del C5Q.

Para continuar elucidando la posible identidad de dicho compuesto, se comparó el orden de elución del mismo contra referencias en la literatura. La figura 21 muestra el cromatograma detallado en el protocolo interno del CIRAD (s.f.) “Dosages des acides chlorogéniques isomères” utilizado en el análisis de un grano de café verde, empleando las mismas condiciones cromatográficas (columna, temperatura del horno, flujo, longitud de onda y fase móvil) que las empleadas en los análisis de este trabajo.

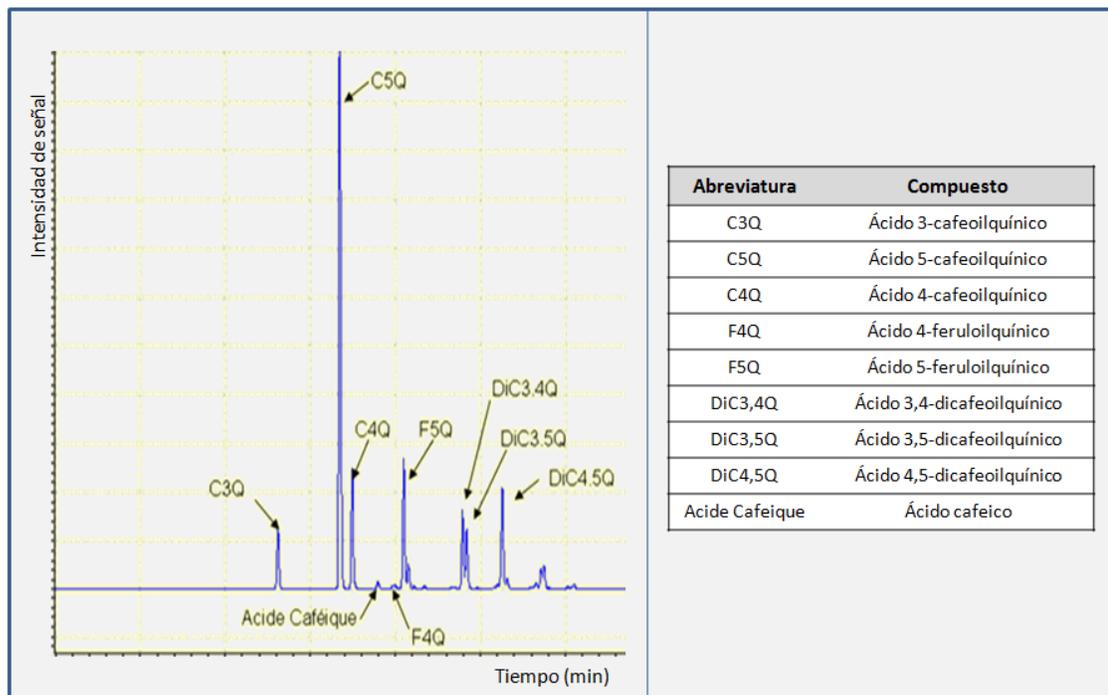


Figura 21. Cromatograma obtenido del análisis de un extracto de café verde con la identificación del ácido cafeico y distintos ácidos clorogénicos (Adaptado de CIRAD, s.f.)

Como se observa en la figura 21, el ácido 3-cafeoilquinico corresponde al ácido hidroxicinámico que eluye previo al C5Q, lo cual coincide con lo encontrado por varios autores, por lo que la disminución en la intensidad de la señal asociada al C5Q puede deberse a su transformación en el ácido 3-cafeoilquinico (Ky *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2009; Kuhnert *et al.*, 2012; Rodrigues & Bragagnolo, 2013; Mullen *et al.*, 2013; Craig *et al.*, 2016; Pandjaitan, 2016).

5.4 Determinación de la estabilidad del ácido 5-cafeoilquínico presente en la pulpa de café adicionada con metabisulfito de sodio durante el almacenamiento a temperatura ambiente y procesamiento bajo dos distintas condiciones (empacado al vacío y secado con aire caliente)

Una vez determinada la efectiva inactivación de la PPO endógena mediante la adición de 0,5 % de Na₂S₂O₅ a la pulpa de café, se evaluó su efectividad en el procesamiento y almacenamiento. El Cuadro XIX muestra los datos asociados al cambio en el contenido del C5Q obtenido tras la adición o no del Na₂S₂O₅.

Cuadro XIX. Variación en el contenido de C5Q presente en la pulpa de café tras la adición de 0,5 % de Na₂S₂O₅.

| Tratamiento | Variación (ppm) |
|--|-----------------|
| Control | -2097,6 ± 945,2 |
| Adición de Na ₂ S ₂ O ₅ | 2871,4 ± 1319,0 |

Datos reportados en base seca como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %.

A partir de los datos mostrados en el Cuadro XIX, se encuentra que la adición del Na₂S₂O₅ genera diferencias significativas (p= 0,0053) sobre la variación en el contenido de C5Q. Adicionalmente, en el caso de la pulpa adicionada con Na₂S₂O₅, esta presenta un incremento en el contenido de dicho ácido, lo cual se debe a que los sulfitos poseen efecto reductor sobre las quinonas, productos de la PPO, convirtiéndolas en difenoles (Morante *et al.*, 2014).

El Cuadro XX presenta los resultados obtenidos tras el almacenamiento durante 40 días a temperatura ambiente de la pulpa de café adicionada con Na₂S₂O₅. Este almacenamiento se realizó bajo dos condiciones distintas, en una de ellas la pulpa fue secada con aire caliente a 50 °C hasta alcanzar una humedad menor al 5 %, posteriormente empacada y almacenada hasta su análisis, en tanto que en la otra condición evaluada se

empacó la pulpa de café al vacío, se almacenó a temperatura ambiente y frecuentemente se liberó el gas producido.

Cuadro XX. Variación en el contenido de C5Q presente en la pulpa de café adicionada con 0,5 % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ tras su procesamiento mediante dos distintas condiciones y su almacenamiento a temperatura ambiente durante 40 días.

| Método de conservación | Variación (ppm) |
|--------------------------------|------------------|
| Secado con aire caliente 50 °C | -2446,8 ± 252,1 |
| Empaque al vacío | -5443,4 ± 2748,4 |

Datos reportados en base seca como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %.

Al comparar los resultados del Cuadro XX, no se presentan diferencias significativas ($p= 0,1650$) entre ambos métodos de conservación, esto debido principalmente a la gran variabilidad presentada en los valores de concentración de C5Q de las muestras empacadas al vacío, en vista de la gran cantidad de procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos que pueden tener lugar bajo las condiciones de conservación, alto contenido de humedad y temperatura ambiente, e inevitablemente provocan efectos sobre la composición de la pulpa de café.

Sin embargo, considerando las ventajas que presenta el almacenamiento de la pulpa de manera seca, como lo son el requerir un menor volumen, ausencia de lixiviados y compuestos volátiles, se selecciona este método como el más apropiado para el almacenamiento de la pulpa de café, como materia prima para una posterior extracción de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos.

Al considerar los resultados obtenidos tras la adición de metabisulfito de sodio y el almacenamiento de la pulpa, y con el objetivo de establecer una metodología que permita la valorización de la pulpa de café mediante la extracción de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, la figura 22 muestra una propuesta para el proceso de extracción de estos compuestos, así como las principales variables a considerar en cada una de la etapas.

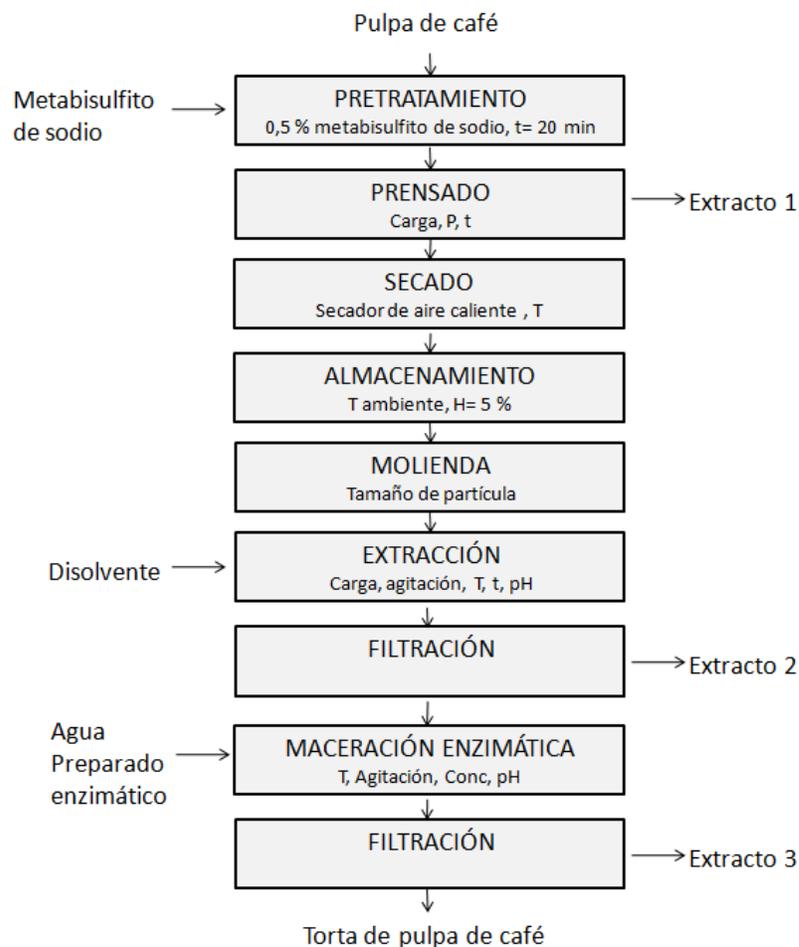


Figura 22. Propuesta del proceso para la extracción de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos de la pulpa de café.

Como se muestra en la figura 22, el proceso inicia con la adición de metabisulfito de sodio para la inactivación de la PPO endógena, seguida de un prensado con el objetivo de remover gran cantidad del líquido propio de la pulpa, de modo que se facilite el posterior secado con aire caliente. Adicionalmente, el prensado permite la obtención de un líquido con cierto contenido de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos no ligados a la pulpa, en el caso del C5Q, este primer extracto presenta un contenido cercano a las 1300 ppm (BS para un extracto con 91 % de humedad).

Para evitar el crecimiento de microorganismos y evitar reacciones que puedan degradar los compuestos de interés, la pulpa es secada con aire caliente hasta alcanzar una humedad cercana al 5%, que permite su almacenamiento y uso posterior, lo cual resulta de gran importancia considerando el carácter estacional del café y por ende también el de sus subproductos.

Previo a la etapa de extracción es necesaria la molienda de la pulpa seca, lo cual favorece el proceso de extracción sólido-líquido de los restantes compuestos no ligados a la pulpa. Para dicha etapa de extracción, es necesario el uso de un disolvente adecuado que favorezca la transferencia de los compuestos de interés desde la pulpa.

A nivel industrial, el uso de disolventes orgánicos corresponde al método más común, empleándose normalmente metanol, etanol o mezclas de estos junto con agua, en porcentajes entre 60 % y 70 % (Pandjaitan, 2016). Adicionalmente, algunos autores suelen emplear disolventes acidificados, así como temperaturas entre 30 y 50 °C para favorecer la extracción (Pandjaitan, 2016).

Específicamente el uso de metanol al 80 %, acidificado al 1 %, permitió la extracción, en razón de 2 g de pulpa seca para 60 mL de disolvente, de cerca de 8000 ppm del C5Q presente en el residuo sólido (BS para un contenido de humedad de 5 %), tras permanecer 1,5 h en agitación a 55 °C. Esta etapa de extracción permite además remover los residuos de metabisulfito o sus productos de modo que estos no afecten la actividad del preparado adicionado durante la maceración enzimática.

La filtración posterior permite la obtención de un segundo extracto con presencia de los restantes ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos libres; sin embargo, considerando que la mayoría de estos, más de un 70 % dependiendo del compuesto, se encuentran ligados a las paredes celulares, resulta necesaria la aplicación de un tratamiento posterior que permita desprenderlos (Rodríguez *et al.*, 2011). Para ello, la maceración con preparados enzimáticos que presenten actividad feruloilesterasa es una alternativa que ha sido estudiada como una forma potencial de obtener compuestos bioactivos a partir de la pulpa de café, y lograr así un máximo aprovechamiento de este subproducto (Torres *et al.*, 2011).

Finalmente, la filtración tras la maceración enzimática asegura la separación de la porción líquida con altos contenidos de los compuestos de interés, de los restos de pulpa insolubles. El extracto obtenido en esta operación, junto con los generados en las etapas anteriores sería posteriormente purificado, de modo que permita la recuperación de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos.

Por otro lado, los extractos obtenidos a lo largo del proceso serían además ricos en otros compuestos solubles también presentes en la pulpa de café tal como la cafeína, cuyo contenido se ha visto que resulta igual o más atractivo que el de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, además de que al tratarse de un compuesto con mayor estabilidad permite su extracción sin experimentar degradación como si ocurre con los compuestos de interés para este estudio. De modo que el análisis de viabilidad técnico-económica podría modificar los intereses para la valorización de la pulpa de café.

VI. CONCLUSIONES

El método de análisis mediante HPLC desarrollado permite la cuantificación de muestras líquidas con contenidos superiores a las 8 ppm de C5Q, FA y CA, y presenta porcentajes de recuperación y precisión adecuados.

La aplicación de una maceración enzimática sobre pulpa de café para la extracción de ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico resulta ineficiente sin la aplicación de un pretratamiento que permita la inactivación de la polifenoloxidasas endógenas causantes de la degradación de estos compuestos, especialmente del C5Q.

La adición de 0,5 % de metabisulfito de sodio resulta adecuada para la inactivación de la polifenoloxidasas endógenas de la pulpa de café.

Durante el proceso de extracción, la reducción en la concentración del C5Q proveniente de la pulpa de café se asocia probablemente a su isomerización, dando origen al ácido 3-cafeoilquínico.

La adición de 0,5 % de metabisulfito de sodio permite la estabilización del C5Q presente en la pulpa de café durante su procesamiento y almacenamiento a temperatura ambiente, tanto de manera fresca empacada al vacío, con eliminación frecuente del gas producido, como seca con una humedad del 5 %.

Por su composición, la pulpa de café corresponde a un desecho con elevado impacto ambiental que puede constituirse en un subproducto con potencial funcional, de modo que su valorización mediante la extracción de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos implica beneficios no solo a nivel de la salud de los consumidores, sino también en el ámbito ambiental.

VII. RECOMENDACIONES

Optimizar el proceso de extracción para la cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos presentes en las muestras sólidas, de manera que se mejore el porcentaje de recuperación y precisión en el análisis de dichos compuestos.

Determinar la concentración óptima de metabisulfito de sodio necesaria para la inactivación de la polifenoloxidasas endógena de la pulpa de café.

Evaluar la extracción de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos de la pulpa de café, mediante la cuantificación del contenido de los tres isómeros principales del ácido cafeoilquinico (C5Q, C3Q y C4Q).

Valorar la extracción de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos ligados a las paredes celulares, mediante la aplicación de un preparado enzimático comercial con actividad feruloilesterasa, o la hidrólisis ácida de la pulpa de café.

Por las facilidades que presenta el manejo de un producto seco, se recomienda el secado con aire caliente a 50 °C como un método para la conservación de la pulpa de café previo a su procesamiento.

Evaluar procesos alternativos al tratamiento enzimático, para la recuperación de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, tales como la extracción con etanol, empleo de ultrasonido, microondas, entre otros.

Analizar el contenido residual de sulfito como un parámetro para la evaluación de las etapas de purificación de los extractos de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos, considerando los posibles efectos nocivos que pueden provocar los sulfites en personas sensibles a estos.

Desarrollar procesos que permitan la valorización del subproducto de la pulpa de café obtenido tras la extracción de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1996a. Official methods of analysis: Official method AOAC 975.03. Metals in plants and pet foods, Atomic absorption spectrophotometric method. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 1996b. Official methods of analysis: Official method AOAC 968.08. Metals in animal feed and pet food, Atomic absorption spectrophotometric method. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2002. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. INTERNET. http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf (Recuperado el 08/10/16).
- AOAC. 2005a. Official methods of analysis: Official method 981.12. pH of acidified foods. 18 ed. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2005b. Official methods of analysis: Official method 942.15. Acidity (titratable) of fruit products. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2005c. Official methods of analysis: Official Method 932.12. Solids (soluble) in fruits and fruit products, refractometer method. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2005d. Official methods of analysis: Official method 920.151. Solids (total) in fruits and fruit products. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2005e. Official methods of analysis: Official method 920.152. Protein of food products. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).

- AOAC. 2005f. Official methods of analysis: Official method 940.26. Ash of fruit and fruit products. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2005g. Official methods of analysis: Official method 985.29. Total dietary fiber determination. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2012a. Official methods of analysis: Official method 985.35. Lead, cadmium, copper, iron and zinc in food, atomic absorption spectrophotometry after dry ashing. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AOAC. 2012b. Official methods of analysis: Official method 999.11. Minerals in infant formula, enteral products and pet foods, atomic absorption spectrophotometric method. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/> (Recuperado el 10/06/15).
- AZMIR, J., ZAIDUL, I., RAHMAN, M., SHARIF, K., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M., GHAFUOR, K., NORULAINI, N. & OMAR, A. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4): 426–436.
- BAYNE, S. & CARLIN, M. 2010. *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. CRC Press, Boca Ratón. p. 5-44.
- BENOIT, I., NAVARRO, D., MARNET, N., RAKOTOMANOMANA, N., LESAGE, L., SIGOILLOT, J., ASTHER, M. & ASTHER, M. 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research*. 341: 1820-1827.
- BEL-RHLID, R., THAPA, D., KRAEHENBUEHL, K., HANSEN, C. & FISCHER, L. 2013. Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *AMB Express*. 3: 28.

- BELITZ, H., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. 2009. Food Chemistry. Springer, Alemania.
- BAYINDIRLI, A. 2010. Introduction to enzymes. En: Enzymes in fruit and vegetable processing. CRC Press, Boca Ratón. p. 1-18.
- BHAT, S. & SUKUMARAN, R. 2012. Enzyme technologies for bioconversion of food processing by-products. En: Chandrasekaran, M. Valorization of food processing by-products. Boca Ratón, CRC Press. p. 233-266.
- BOLAÑOS, M. 2015. Estudio exploratorio de la actividad de tres enzimas endógenas y su efecto sobre las antocianinas presentes en la broza del café. Trabajo final de graduación de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos, Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- BRESSANI, R., MURILLO, B., CABEZAS, M. & JARQUÍN, R. 1977. Effect of bisulfite addition on the chemical composition and cellular content fractions of dehydrated coffee pulp. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 25(5): 1090-1092.
- BUDRYN, G., NEBESNY, E. & RACHWAL, D. 2013. Stability of hydroxycinnamic acids and caffeine from green coffee extracts after heating in food models systems. European Food Research and Technology. 236: 969-978.
- CARPENTER, D., NGEH-NGWAINBI, J. & LEE, S. 1993. Lipid analysis. En: Sullivan, D. & Carpenter, D. eds. Methods of analysis for nutrition labeling. AOAC International.
- CÄMMERER, B. & KROH, L. 2006. Antioxidant activity of coffee brews. European Food Research and Technology. 223: 469-474.
- CINZIA R., ESPOSITO, F., NAPOLITANO, A., RITIENI, A. & FOGLIANO, V. 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(5): 1338-1343.
- CIRAD, s. f. Dosages des acides chlorogéniques isomères. Francia.

- CITA, 2009. Determinación de ácidos orgánicos por HPLC, P-SA-MQ-043. Emisión N° 1. San José, Costa Rica.
- CITA, 2010. Determinación de la actividad antioxidante, método ORAC con espectrofluorómetro Biotek, AQCITA-M037. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA. 2014a. Determinación del pH, P-SA-MQ-012. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA. 2014b. Determinación de la acidez titulable, P-SA-MQ-011. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014c. Determinación del contenido de sólidos solubles, P-SA-MQ-046. Emisión N° 1. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014d. Determinación del contenido de humedad, P-SA-MQ-002. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014e. Determinación del contenido de proteína, P-SA-MQ-003. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014f. Determinación del contenido de grasa cruda por extracto etéreo, P-SA-MQ-005. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014g. Determinación del contenido de cenizas totales, P-SA-MQ-004. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014h. Determinación del contenido de azúcares por HPLC, P-SA-MQ-006. Emisión N° 8. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014i. Determinación del contenido de fibra dietética total por método enzimático, P-SA-MQ-007. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA, 2014j. Determinación del contenido de minerales por espectrofotometría de absorción atómica, P-SA-MQ-035. Emisión N° 1. San José, Costa Rica.
- CITA, 2015a. Determinación de polifenoles, P-SA-MQ-048. Emisión N° 1. San José, Costa Rica.

- CLIFFORD, M. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 362-372.
- CRAIG, A., FIELDS, C., LIANG, N., KITTS, D. & ERICKSON, A. 2016. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 154: 481-485.
- CREPIN, V., FAULDS, C. & CONNERTON, I. 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63 (6): 647-652.
- DAVIDSON, M. 2001. Control of microorganisms with chemicals. En: Juneja, V. & Sofos, J. *Control of foodborne microorganisms*. CRC Press, Boca Ratón. p. 165-190.
- DELGADO, C., RUFÍAN, J. & MORALES, F. 2005. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7832–7836.
- DILLARD, C. & GERMAN, B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1744-1756.
- ESQUIVEL, P. & JIMÉNEZ, V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 46(2): 488-495.
- FARAH, A. 2012. Coffee constituents. En: Yi-Fang, C. *Coffee: Emerging health effects and disease prevention*. Wiley-Blackwell. p. 21-58.
- FARAH, A., DE PAULIS, T., MOREIRA, D., TRUGO, L. & MARTIN, P. 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 374–381.
- FERREIRA, C. 2014. Microbial activity during coffee fermentation. En: Schwan, R. & Fleet, G. *Cocoa and coffee fermentations*. CRC Press. p. 397-423.
- FUJIOKA, K. & SHIBAMOTO, T. 2008. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*. 106(1): 217–221.

- GALLAND, L. 2014. Functional foods: health effects and clinical applications. En: Caballero, B. Encyclopedia of human nutrition. New York, Elsevier. p. 366-371.
- GAUTHIER, L., BONNIM, M., MARCHEGAY, G., PINSON, L., DUCOS, C., RICHARD, 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 of Food Microbiology. 221: 61-68.
- GEORGÉ, S., BRAT, P., ALTER, P. & AMIOT, M. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(5): 1370-1373.
- GOKTURK, N. 2006. Organic acid, tocopherol and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. Chemistry of Natural Compounds. 42(2): 156-159.
- HAYTOWITZ, D. & BHAGWAT, S. 2010. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. INTERNET: http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC_R2.pdf. (Recuperado el 10/09/2016).
- HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. & PRIOR, R. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96 well format. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(16): 4437-4444.
- HUANG, D., OU, B. & PRIOR, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(6): 1841-1856.
- ICAFAE. 2011. Guía técnica para el cultivo del café. Costa Rica.
- ICAFAE. 2016. Historia del café. INTERNET: <http://www.icafe.cr/nuestro-cafe/historia/> (Recuperado el 29/07/16).
- ICO. 2015. Trade Statistics. Organización Internacional del Café, Londres. INTERNET. http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics. (Recuperado el 02/02/2015).

- KUHNERT, N., KARAKÖSE, H. & JAISWAL, R. 2012. Analysis of chlorogenic acids and other hydroxycinnamates in food, plants, and pharmacokinetic studies. En: Nollet, L. & Toldrá, F. eds. Handbook of analysis of active compounds in functional foods. CRC Press, Boca Ratón. p. 461-506.
- KY, C., LOUARN, J., GUYOT, B., CHARRIER, A., HAMON, S. & NOIRO, M. 1999. Relationsbetween and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. International Journal of Plant Breeding Research. 98: 628-637.
- KY, C., NOIROT, M. & HAMON, S. 1997. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 786-790.
- KUIJPERS, T., NARVÁEZ, C., VINCKEN, J., VERLOOP, A., VAN BERKEL, W. & GRUPPEN, H. 2012. Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid by sulfur-containing compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60: 3507-3514.
- KUMAR, A., GALAEV, I. & MATTIASSON, B. 2003. Precipitation of proteins: Nonspecific and Specific. En: Hutti-Kaul, R. & Mattiasson, B. Isolation and purification of proteins. CRC Press. p. 1-51.
- LARA, L. 2005. Efectos de la altitud, sombre, producción y fertilización sobre la calidad del café (*Coffea arabica* L. var. Caturra) producido en sistemas agroforestales de la zona cafetalera nor-central de Nicaragua. Tesis M. Sc. en Agroforestería Tropical. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Cartago.
- LI, H., CHEN, B. & YAO, S. 2005. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (*E. ulmodies*). Ultrasonics Sonochemistry. 12: 295-300.
- LIU, Y. & KITTS, D. 2011. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. Food Research International. 44: 2418-2424.

- LÓPEZ, I. & DE PEÑA, M. 2008. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *European Food Research and Technology*. 227: 141-149.
- MARÍN, S., ARCILA, J., MONTOYA, E. & OLIVEROS, C. 2003. Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. *Colombia*). *Cenicafé*. 54(3): 208-225.
- MARTÍNEZ, E. & DUVNJAK, Z. 2006. Enzymatic degradation of chlorogenic acid using a polyphenol oxidase preparation from the white rot fungus *Trametes versicolor* ATCC 42530. *Process Biochemistry*. 41: 1835-1841.
- MAZZAFERA, P. & ROBINSON, S. 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*. 55: 285-296.
- MONTEIRO, M. & FARAH, A. 2012. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. *Food Chemistry*. 134: 611-614.
- MONTGOMERY, D. 2004. *Diseño y análisis de experimentos* 2 ed. Limusa, México D. F.
- MOON, J., SUN, H. & SHIBAMOTO, T. 2009. Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5365-5369.
- MORANTE, J., AGNIESZKA, A., BRU-MARTÍNEZ, R., CARRANZA, M., PICO-SALTOS, R. & RODRÍGUEZ, E. 2014. Distribución, localización e inhibidores de las polifenoxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*. 7(1): 23-31.
- MULLEN, W., NEMZER, B., STALMACH, A., ALI, S. & COMBET, E. 2013. Polyphenolic and hydroxycinnamate contents of whole coffee fruits from China, India, and Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 5298-5309.
- MULLEN, W., NEMZER, B., OU, B., STALMACH, A., HUNTER, J., CLIFFORD, M. & COMBET, E. 2011. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee

- fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 3754-3762.
- MURTHY, P. & NAIDU, M. 2010. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. 5(3): 897-903.
- MURTHY, P. & NAIDU, M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition. *Resources, Conservation and Recycling*. 66: 45–58.
- MURUGAN, K., CHANDRASEKARAN, V., KARTHIKEYAN, P. & AL-SOHAIBANI, S. 2012. Current state of the art of food processing by-products. En: Chandrasekaran, M. ed. *Valorization of food processing by-products*. CRC Press, Boca Ratón. p. 35-62.
- MUSSATO, S., MACHADO, E., MARTINS, S. & TEIXEIRA, J. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residue. *Food Bioprocess Technology*. 4: 661–672.
- NARITA, Y. & INOUE, K. 2013. Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 966-972.
- NAVIA, D., VELASCO, R. & HOYOS, J. 2011. Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products. *Vitae*. 18(3): 287-294.
- PANDEY, A., SOCCOL, C., NIGAM, P., BRAND, D., MOHAN, R. & ROUSSOS, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 6(2): 153-162.
- PANDJAITAN, N. 2016. Chlorogenic acids from green coffee beans: Standard quality and extraction methods. En: Bagchi, D., Moriyama, H. & Swaroop, A. eds. *Green coffee bean extract in human health*. CRC Press. p. 31-45.
- PAPADOYANIS, I. & SAMANIDOU, V. 2009. Sample preparation for HPLC. En: Cazes, J. *Encyclopedia of Chromatography*. CRC Press, Boca Ratón. p. 2090-2105.

- PARRAS, P., MARTÍNEZ, M., JIMÉNEZ, A. & MURCIA, M. 2007. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*. 102: 582-592.
- PÉREZ, M., CÄMMERER, B., DE PEÑA, M., CID, C. & KROH, L. 2010. Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(5): 2958-2965.
- PIRISINO, J. 1983. High performance liquid chromatographic determination of lactose, glucose and galactose in lactose reduced milk. *Journal of Food Science*. 48: 742-754.
- PROCOMER. 2014. Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica. Promotora de comercio exterior de Costa Rica, San José. INTERNET: http://www.procomer.com/contenido/descargables/estadisticas/libro_estadistica2013-web.pdf. (Recuperado el 23/01/2015).
- RAMÍREZ, E. & VIRADOR, V. 2002. Polyphenol oxidase. En: Whitaker, J., Voragen, A. & Wong, D. *Handbook of Food Enzymology*. CRC Press, Boca Ratón. p. 209-215.
- RAPOSO, F. 2016. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 77: 167-185.
- RIBEIRO, D., RODRÍGUEZ, N., ZAMBRANO, D. & LÓPEZ-NUÑEZ, J. 2014. Management and utilization of wastes from coffee processing. En: Schwan, R. & Fleet, G. eds. *Cocoa and coffee fermentations*. CRC Press, Boca Ratón. p. 545-588.
- ROBINSON, D. 2000. The effect of oxidative enzymes in foods. En: Robinson, D. & Michael, N. eds. *Food shelf life stability*. CRC Press, Boca Ratón. p. 90-105.
- RODRIGUES, N. & BRAGAGNOLO, N. 2013. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MSⁿ. *Journal of Food Composition and Analysis*. 32: 105-115.
- RODRÍGUEZ, L., RAMIREZ, M., ARANDA, E., MADHAVAN, K., FAVELA, E., AGUILAR, C. & SAUCEDO, G. 2014. Soluble and bound hydroxycinnamates in

- coffee pulp (*Coffea arabica*) from seven cultivars at three ripening stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62: 7869-7876.
- RODRÍGUEZ-VALENCIA, N. 2003. Ensilaje de pulpa de café. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Chinchiná. p. 1-8.
- SACCHETTI, G., DI MATTIA, C., PITTIA, P. & MASTROCOLA, D. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. Journal of Food Engineering. 90: 74-80.
- SADEGHIAN, S., MEJÍA, B. & ARCILA, J. 2003. Composición elemental de frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha en la zona cafetera de Colombia. Cenicafé. 57(4): 251-261.
- SÁNCHEZ, I., JIMÉNEZ, A. & SAURA, F. 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). Food Chemistry. 90(1-2): 133-139.
- SÁNCHEZ, J. 2007. Estudio sobre el valor antioxidante del café (*Coffea arabica*) de Costa Rica y su relación con el lugar de procedencia, el grado de tostado y la forma de preparación de la bebida. Trabajo final de graduación de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, San José.
- SHRIVASTAVA, A. & GUPTA, V. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. Chronicles of Young Scientist. 2(1): 21-25.
- SHYAM, R. & CHANDRASEKARAN, M. 2012. Beverages. En: Chandrasekaran, M. ed. Valorization of food processing by-products. CRC Press, Boca Ratón. p. 589-614.
- SLINKARD, K. & SINGLETON, V. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 28: 49-55.

- SOLÍS, L. & HERRERA, C. 2005. Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café. *Agronomía Costarricense*. 29(2): 99-107.
- STALIKAS, C. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30: 3268-3295.
- STEPHEN, B., LU, H., KAO, T. & CHEN, B. 2010. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51: 549-556.
- SUAREZ, M., ALONSO, A., VALERIO, G., GONZÁLEZ, O., VILLENEUVE, P. & FIGUEROA, M. 2014. Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33: 55-58.
- SULLIVAN, D. & CARPENTER, D. 1993. *Methods of analysis for nutrition labeling*. AOAC International, Arlington. p. 33-83.
- TAVARES, E., RIBEIRO, J., TAVARES, A., FERREIRA, J., PIMENTA, C. & QUEIROZ, F. 2013. Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169(2): 673-687.
- TAN, Z., WANG, C., YI, Y., WANG, H., LI, M., ZHOU, W., TAN, S. & LI, F. 2014. Extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Bohemeria nivea* L. Gaud) leaf using ethanol/salt aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*. 132: 396-400.
- TORRES, M. 2013. Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- TORRES, M., CORDOVA, J., RODRÍGUEZ, G., ROUSSOS, S., RAMÍREZ, A., TORRES, E. & SAUCEDO, G. 2011. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technology and Biotechnology*. 49(3): 369-373.

- ULLOA, J., VERRETH, J., AMATO, S. & HUISMAN, E. 2003. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology*. 89(3): 267-274.
- UPADHYAY, R., RAMALAKSHMI, K. & JAGAN, L. 2012. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chemistry*. 130: 184-188.
- VAN BOEKEL, M. 2008. *Kinetic modeling of reactions in food*. CRC Press, Boca Ratón.
- WEDZICHA, B. 2000. Effects of sulfur dioxide on food quality. En: Robinson, D. & Michael, N. eds. *Food shelf life stability*. CRC Press, Boca Ratón. p. 60-89.
- WU, X., BEECHER, G., HOLDEN, J., HAYTOWITZ, D., GEBHARDT, S. & PRIOR, R. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(12): 4026-4037.
- ZORN, M., GIBBONS, R. & SONZOGNI, W. 1997. Weighted least-squares approach to calculating limits of detection and quantification by modeling variability as a function of concentration. *Analytical Chemistry*. 69: 3069-3075.

IX. ANEXO

Método para el análisis del contenido de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en muestras de pulpa de café

Desarrollado por: Johan Jiménez Arias

1. Principio

El método consiste en la cuantificación de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en un extracto de pulpa de café, mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés), tipo fase reversa. En este método se contempla la precipitación de proteínas, mediante la adición de cloruro de sodio y cuantificación por detección a 327 nm para los ácidos hidroxicinámicos.

2. Objetivo

Determinar la concentración de ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico presentes en una muestra de pulpa de café.

3. Equipos

3.1. Equipo requerido para la curva de calibración

- Balanza analítica con resolución de 0,01 mg
- Micropipetas y puntas
- Cristalería: balón aforado de 10,00 mL

3.2. Equipo requerido para la determinación

- Balanza analítica con resolución de 0,1 mg
- Micropipetas y puntas
- Baño de calentamiento con agitación
- Agitador automático
- Cristalería: erlenmeyer de 125 mL, balón aforado de 100,0 mL, embudo de espiga, viales para cromatografía
- Papel filtro #4

- Filtros de jeringa (0,20 μm) y jeringas de 5 mL
- Tubos de centrifuga
- Baño de ultrasonido

3.3. Equipo para cromatografía

- Equipo para filtración de fase móvil para HPLC
- Filtro de membrana hidrofílico de polipropileno 0,45 μm para preparación de fase móvil
- Filtros de membrana de celulosa regenerada 0,45 μm para preparación de fase móvil
- Baño de ultrasonido
- Horno Shimadzu CTO-20A para la columna cromatográfica
- Inyector automático de muestras Shimadzu SIL-20A HT, controlado por módulo CBM- 20A
- Bomba cuaternaria Shimadzu LC-20AT
- Detector de arreglo de diodos PDA Shimadzu e integrador LC-Solutions

4. Condiciones de operación del equipo de cromatografía

- Columna: Uptisphere C18-ODB 5 μm (250 x 4,6) mm
- Temperatura del horno: 30 °C
- Flujo: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 10 μL
- Longitud de onda: 327 nm para la detección de los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos
- Fase móvil: modo de gradiente (ver **Cuadro IA**)

Cuadro IA. Gradiente de fase móvil para el análisis de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquinico mediante cromatografía líquida de alta resolución.

| Fase móvil | Tiempo (min) | | | | | |
|---------------------------------------|--------------|----|-----|-----|----|----|
| | 0 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 |
| Metanol | 5 | 75 | 100 | 100 | 5 | 5 |
| H ₃ PO ₄ (4 mM) | 95 | 25 | 0 | 0 | 95 | 95 |

5. Reactivos

- Patrones: ácido 5-cafeoilquínico (Sigma Aldrich, >95%), ácido cafeico (Sigma Aldrich, >98%) y ácido ferúlico (European pharmacopoeia reference standard, 99,8%).
- Agua (grado HPLC y destilada)
- Metanol (grado HPLC y grado reactivo)
- Ácido fosfórico (grado reactivo, 85% m/v)
- Cloruro de sodio (grado reactivo)
- Ácido acético glacial (grado reactivo)
- Pirogalol (grado reactivo)

6. Preparación de disoluciones

- Fase móvil H_3PO_4 (4 mM): mida 1 L de agua grado HPLC y adicione 272 μL de ácido fosfórico (grado reactivo, 85% m/v). Filtre a través del equipo de filtración para fase móvil, empleando el filtro de membrana hidrofílico de polipropileno.

Trasvase la fase móvil filtrada a un recipiente con tapa limpio, y lleve al baño de ultrasonido, aplique ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz durante 20 min a temperatura ambiente, con el objetivo de remover burbujas presentes en la fase móvil. Procure dejar la tapa del recipiente levemente abierta para asegurar la salida de gases del recipiente.

- Fase móvil Metanol: mida 1 L de metanol grado HPLC y filtre a través del equipo de filtración para fase móvil, empleando el filtro de membrana de celulosa.

Trasvase la fase móvil filtrada a un recipiente con tapa limpio, y lleve al baño de ultrasonido, aplique ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz durante 20 min a temperatura ambiente, con el objetivo de remover burbujas presentes en la fase móvil. Procure dejar la tapa del recipiente levemente abierta para asegurar la salida de gases del recipiente.

- Disolvente de extracción para muestras sólidas (MeOH 80 % acidificado): mida 96 mL de metanol grado reactivo, adicione 1,2 mL de ácido acético glacial y 22,8 mL de agua. Lo anterior para obtener 120 mL de metanol 80 % acidificado al 1 %, cantidad de disolución requerida para analizar cada muestra sólida.

7. Preparación de la curva de calibración

- 7.1. Mida por diferencia una masa de 1,0 mg de cada uno de los compuestos patrones de interés en un balón aforado de 10,00 mL.
- 7.2. Adicione metanol 80 % (grado HPLC) hasta la mitad del volumen del balón, y asegure que los reactivos adicionados se solubilizan. En caso de no solubilizarse es posible introducir el balón en el baño de ultrasonido durante el tiempo necesario para lograr la solubilización.
- 7.3. Afore el balón, de modo que se obtenga una disolución madre de 100 ppm de cada uno de los compuestos de interés.
- 7.4. Empleando una micropipeta y viales para cromatografía, realice las diluciones mostradas en el Cuadro IIA, para la obtención de las distintas disoluciones para la curva de calibración.

***Nota:** Es posible realizar la curva de calibración a partir de un solo vial con disolución de patrones a 100 ppm, mediante la inyección seriada de dicha disolución, empleando distintos volúmenes de inyección. Consultar al personal del laboratorio que conoce el software del equipo para realizar las modificaciones del volumen de inyección.

Cuadro IIA. Volúmenes de disolución madre y metanol 80 % (grado HPLC), necesarios para la obtención de las disoluciones para la curva de calibración.

| Concentración de cada patrón en la disolución (ppm) | Volumen de disolución madre (100 ppm) (µL) | Volumen de Metanol 80% (grado HPLC) (µL) |
|---|--|--|
| 90 | 900 | 100 |
| 75 | 750 | 250 |
| 50 | 500 | 500 |
| 40 | 400 | 600 |
| 25 | 250 | 750 |
| 15 | 150 | 850 |
| 10 | 100 | 900 |
| 0,5 | 50 | 950 |
| 0,25 | 25 | 975 |

- 7.5. Inyecte en el equipo y posteriormente integre las señales asociadas a cada uno de los patrones.

La figura 1A muestra el tiempo de retención aproximado de cada uno de los compuestos de interés.

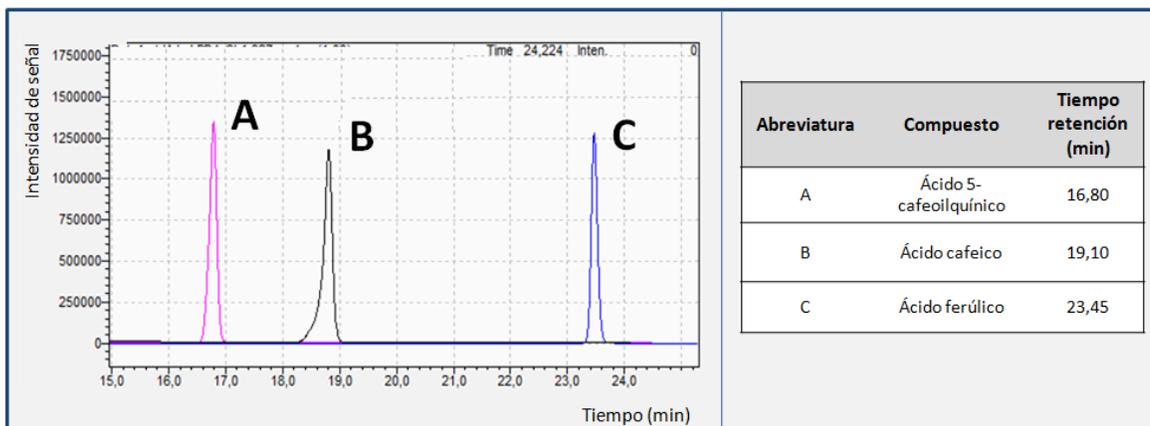


Figura 1A. Cromatograma de los ácidos cafeico, ferúlico y 5-cafeoilquínico.

- 7.6. Grafique el área bajo la curva contra la concentración de cada disolución patrón empleada. Determine la ecuación de la curva para cada uno de los patrones, así como el coeficiente de determinación (R^2). Para asegurar una adecuada calibración, dicho parámetro debe presentar un valor $\approx 0,995$.
- 7.7. De la regresión lineal $y = mx + b$ se tiene el valor de la pendiente (m) y del intercepto (b), donde “ y ” es el valor de área y “ x ” la concentración en ppm del compuesto patrón.
- 7.8. De esta manera: $C_n \text{ (ppm)} = x = (y - b)/m$ (Ecuación 1)

8. Determinación

8.1. Muestras líquidas

- 8.1.1. Homogenice la muestra lo máximo posible.
- 8.1.2. Mida un volumen exacto de 7,50 mL de la muestra en un tubo de centrifuga.
- 8.1.3. Adicione 0,3 g de NaCl y una pequeña punta de espátula de pirogalol.
- 8.1.4. Coloque el tubo de centrifuga tapa en el agitador y agite a 3000 rpm durante 20 min.
- 8.1.5. Centrifugue la muestra a 3200 g durante 10 min.
- 8.1.6. Decante el sobrenadante y filtre a través del filtro de jeringa (0,20 μm) a un vial para cromatografía.
- 8.1.7. Inyecte la muestra al equipo.
- 8.1.8. Integre el área asociada a la señal de cada uno de los patrones y determine la concentración mediante la *Ecuación 1*.

8.2. Muestras sólidas

- 8.2.1. Muela la muestra hasta obtener un tamaño de partícula fino.
- 8.2.2. Mida una masa de 2 g de muestra en un erlenmeyer de 125 mL, adicione una pequeña punta de espátula de pirogalol.
- 8.2.3. Adicione 60 mL del disolvente para extracción de muestras sólidas.
- 8.2.4. Coloque en el baño de calentamiento a 55 °C con agitación constante durante 1,5 h.
- 8.2.5. Transcurrido el tiempo, deje que la muestra se enfríe un poco y filtre a través del papel filtro #4, hacia un balón aforado de 100,0 mL.
- 8.2.6. Afore el balón con el disolvente para extracción de muestras sólidas.
- 8.2.7. Filtre una porción del contenido del balón a través de un filtro de jeringa (0,20 µm) a un vial para cromatografía.
- 8.2.8. Inyecte la muestra al equipo.
- 8.2.9. Integre el área asociada a la señal de cada uno de los patrones y determine la concentración mediante la *Ecuación 1*.

9. Bibliografía

CIRAD. s.f. Dosages des acides chlorogéniques isomères. Francia.

KY, C., LOUARN, J., GUYOT, B., CHARRIER, A., HAMON, S. & NOIRO, M. 1999. Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. International Journal of Plant Breeding Research 98: 628-637.

KUHNERT, N., KARAKÖSE, H. & JAISWAL, R. 2012. Analysis of chlorogenic acids and other hydroxycinnamates in food, plants, and pharmacokinetic studies. En Nollet, L. & Toldrá, F. eds. Handbook of analysis of active compounds in functional foods. CRC Press, Boca Ratón. p. 461-506.

MURTHY, P. & NAIDU, M. 2010. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. Food and Bioprocess Technology 5(3): 897-903.

10. Anexos

La figura 2A muestra el cromatograma obtenido al determinar el contenido de los ácidos cafeico, ferúlico 5-cafeoilquínico presentes en una muestra de fruto de café liofilizado, mediante el método de extracción descrito en la sección 8.2, al comparar esta contra la figura 3A, la cual muestra el cromatograma obtenido al determinar el contenido de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos presentes en una muestra de café verde, mediante el método “Dosages des acides chlorogéniques isomères” desarrollado por en el CIRAD. Es posible la identificación de las señales asociadas a otros ácidos clorogénicos presentes en la muestra, tales como los ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 4-feruloilquínico, 5-feruloilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico y 4,5-dicafeoilquínico.

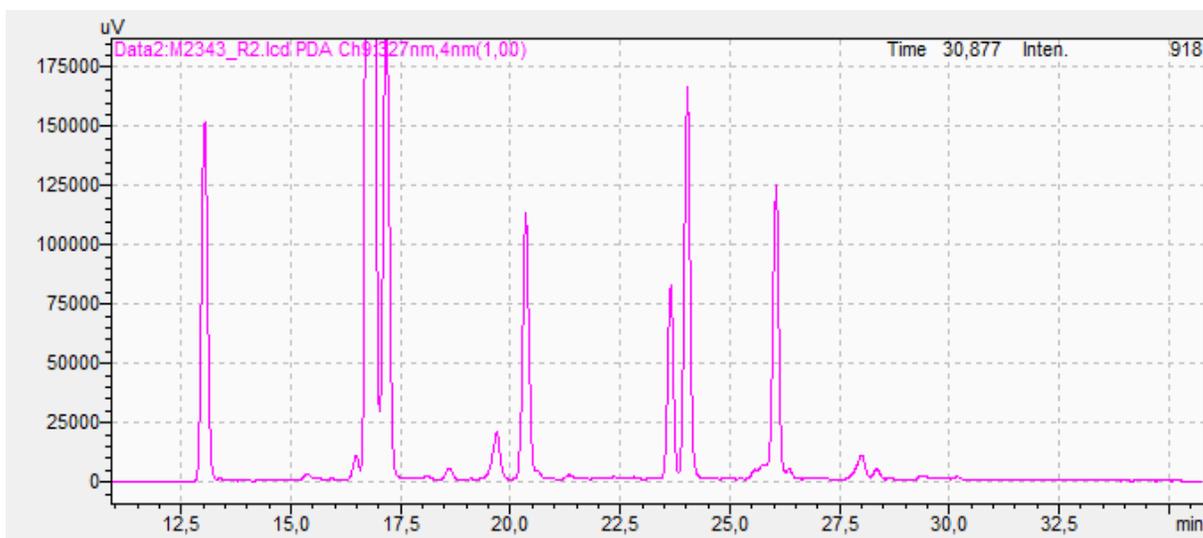


Figura 2A. Cromatograma obtenido a partir de la extracción de una muestra de fruto de café liofilizado, mediante el procedimiento descrito en la sección 8.2.

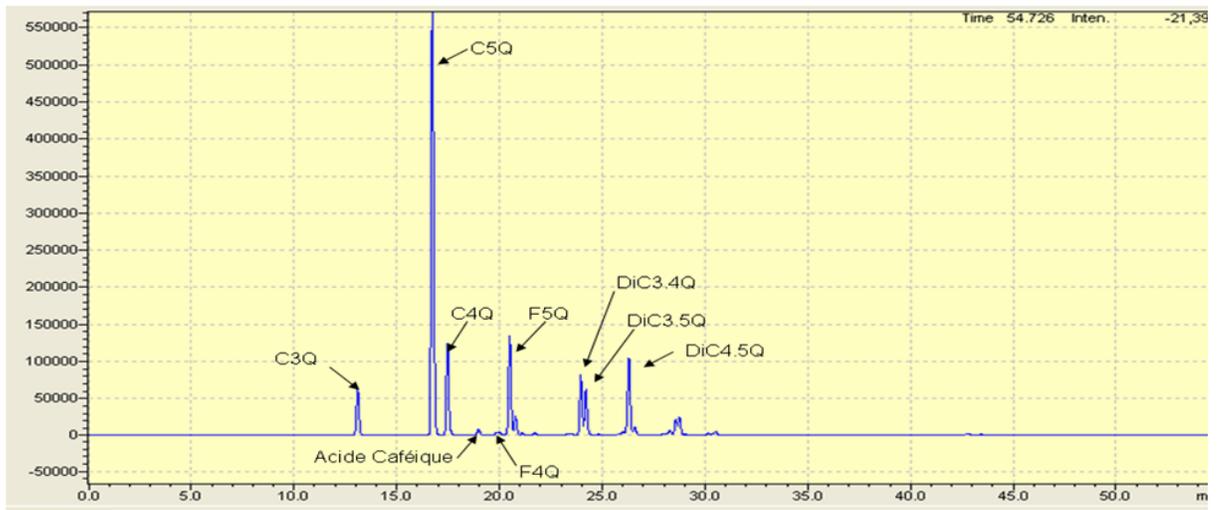


Figura 3A. Cromatograma presente en el procedimiento “Dosages des acides chlorogéniques isomères” obtenido de la extracción de los ácidos hidroxycinámicos y clorogénicos presentes en un grano de café verde.