



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA



TESIS

**CUANTIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES CONTENIDOS EN EL CAFÉ
(COFEEAA ARABICA) VERDE Y TOSTADO PROCEDENTE DE VERACRUZ**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

LUIS ÁNGEL RUGERIO GARCÍA

DIRECTORA ACADÉMICA:

DRA. ANDREA YAZMIN GUADARRAMA LEZAMA

ASESOR ADJUNTO:

DR. JULIÁN CRUZ OLIVARES

TOLUCA, MÉXICO

JUNIO, 2017

INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS..... | 2 |
| RESUMEN..... | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 10 |
| I. Café Verde y su consumo | 10 |
| II. Antioxidantes | 13 |
| III. Procesos industriales del café | 31 |
| IV. Espectroscopía, Absorbancia y Transmitancia. | 39 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 42 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 43 |
| 4. OBJETIVOS | 43 |
| 4.1. Objetivo General: | 43 |
| 4.2. Objetivos específicos: | 43 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 44 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 49 |
| 7. Conclusiones..... | 76 |
| 8. Referencias..... | 77 |
| 9. Anexos..... | 80 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1 | Sustancias bioactivas presentes en el café | 12 |
| Tabla 2 | Clasificación de los compuestos fenólicos | 18 |
| Tabla 3 | Estructuras y nombres de los principales ácidos hidroxí-cinámicos..... | 19 |
| Tabla 4 | Contenido de ácidos clorogénicos en granos de café expresados en porcentaje por gramo de materia seca..... | 21 |
| Tabla 5 | Concentración de ácidos y quinolactonas en café tostado expresado en porcentaje sobre gramos..... | 22 |
| Tabla 6 | Principales compuestos fenólicos que se sintetizán naturalmente.. | 23 |
| Tabla 7 | Principales bases de los taninos..... | 30 |
| Tabla 8 | Ilustraciones y temperaturas de los diferentes tostados del café..... | 32 |
| Tabla 9 | Términos de la Ley de Beer..... | 41 |
| Tabla 10 | Comprobación de la estabilidad de la solución madre y Absorbancia de la solución madre con Etanol. | 46 |
| Tabla 11 | Absorbancias encontradas por el método de Folin-Ciocalteu, Experimento I.. | 49 |
| Tabla 12 | Concentración de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu, Experimento II.. | 50 |
| Tabla 13 | Resultados de concentración método Folin-Ciocalteu, Experimento III. | 51 |
| Tabla 14 | Resultados generales del método Folin-Ciocalteu..... | 52 |
| Tabla 15 | Resultados de Actividad antioxidante por el método ABTS. | 53 |
| Tabla 16 | Resultados de Actividad antioxidante por el método DPPH..... | 55 |
| Tabla 17 | Determinación de taninos, Resultados Generales..... | 56 |
| Tabla 18 | Concentración de compuestos fenólicos totales a diferentes tiempos de horneado de café verde. | 59 |
| Tabla 19 | Capacidad antioxidante por método ABTS de café verde a diferentes tiempos en el horno | 60 |

| | |
|--|----|
| Tabla 20 Capacidad antioxidante por método DPPH de café verde a diferentes tiempos en el horno..... | 63 |
| Tabla 21 Concentración de taninos en las muestras de café sometidas a diferentes tiempos de tratamiento de tostado | 64 |
| Tabla 22 Concentración de compuestos fenólicos totales a diferentes temperaturas de horneado de café verde | 66 |
| Tabla 23 Capacidad antioxidante por método ABTS de café verde a diferentes temperaturas en el horno | 68 |
| Tabla 24 Capacidad antioxidante por método DPPH de café verde a diferentes temperaturas en el horno | 70 |
| Tabla 25 Concentración de taninos en café verde sometido a diferentes tratamientos térmicos | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Cofeaaa Arabica. | 10 |
| Figura 2 | Estructura del radical DPPH | 15 |
| Figura 3 | Mecanismo de reacción del DPPH | 15 |
| Figura 4 | Estructura del ABTS. | 16 |
| Figura 5 | Estructura del ácido quínico..... | 19 |
| Figura 6 | Ácidos clorogénicos y compuestos relacionados de acuerdo a sus características químicas..... | 20 |
| Figura 7 | Formación de lactonas..... | 22 |
| Figura 8 | Mecanismo de reacción de la oxidación de Fenoles a quinonas. | 24 |
| Figura 9 | Mecanismo de reacción de la oxidación del persulfato de Elbs..... | 25 |
| Figura 10 | Mecanismo y ejemplo de la formación de éteres de la síntesis de Williamson..... | 26 |
| Figura 11 | Mecanismo de la formación de éteres. | 26 |
| Figura 12 | Reacciones principales de la Sustitución Electrofílica aromática de los Fenoles..... | 27 |
| Figura 13 | Formación de aniones fenolato..... | 27 |
| Figura 14 | Productos del método Folin-Ciocalteu. | 29 |
| Figura 15 | Algunos ejemplos de taninos. | 30 |
| Figura 16 | Ilustración de melanoidinas..... | 34 |
| Figura 17 | Formación y compuestos principales de poblaciones de taninos | 35 |
| Figura 18 | Concentración de ácidos clorogénicos y melanodinos en café verde y tostado y en tazas de café filtradas en expreso.. | 36 |
| Figura 19 | Mecanismo de reacción de Maillard..... | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 Esquema de los caminos que pueden ocurrir en la reacción de Maillard | 38 |
| Figura 21 Fotografía de las muestras de temperatura variable..... | 58 |
| Figura 22 Comparación de mg de fenólicos, Efecto de tiempo en Folin | 59 |
| Figura 23 Comparación de mg, Efecto de tiempo en ABTS..... | 62 |
| Figura 24 Comparación de mg, Efecto de tiempo en DPPH | 63 |
| Figura 25 Comparación de mg, Efecto de tiempo en taninos | 65 |
| Figura 26 Comparación de mg de fenólicos, Efecto de temperatura en Folin..... | 66 |
| Figura 27 Comparación de mg de mMoles de Trolox, Efecto de temperatura en ABTS | 69 |
| Figura 28 Comparación de mg de A.C., Efecto de temperatura en DPPH..... | 70 |
| Figura 29 Comparación de mg, Efecto de temperatura en taninos..... | 71 |
| Figura 30 Mecanismos de Reacción de ácido clorogénico en reacción de Maillard..... | 74 |

RESUMEN

El café (*Coffea arabica*), es una planta, cuyos granos son ampliamente consumidos no solo en México sino en todo el mundo. A partir de la semilla o grano de café es posible preparar infusiones. Los granos de café contienen gran cantidad de compuestos con actividad biológica, que aportan beneficios a la salud para el ser humano cuando son consumidos, éstos son conocidos como compuestos fenólicos y taninos. Una etapa importante para preparar infusiones de café a partir de los granos del mismo, es el proceso de tostado, en donde se llevan a cabo una serie de reacciones químicas muy importantes que generan e imparten el aroma y sabor final a las bebidas. No se sabe con seguridad que efecto tiene el tostado sobre los compuestos bioactivos contenidos en los granos de café. En este trabajo se examinaron muestras de café verde y café tostado a diferentes condiciones de procesamiento. Las muestras de café tostado se compararon con muestras de café tostado industrialmente. Las muestras se sometieron a diversos métodos de ensayos de compuestos fenólicos, antioxidantes y taninos. El café verde se sometió a dos procesos de tostado, el primero variando la temperatura de 100 a 300°C y el segundo variando el tiempo de tostado de 30 hasta 180 minutos, con la finalidad de observar de qué manera afectan estos procesos en la estructura y concentración de compuestos previamente mencionados. Posteriormente se cuantificó la concentración de compuestos que contenía cada muestra y se observó que las variables de tiempo y temperatura alteraban de forma lineal decreciente la concentración de compuestos fenólicos, mientras que en los demás ensayos se observaron diferentes comportamientos no lineales, los cuales indican que los compuestos presentan distintas reacciones químicas que afectan tanto la estructura como la concentración de los mismos. Con los resultados obtenidos, se concluyó que el café verde contenía una concentración mayor de compuestos fenólicos, taninos y antioxidantes mucho mayor que las muestras de café tostado.

INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más populares y consumidas a nivel mundial. En México esta no es la excepción y son muchas las personas que ingieren café con regularidad. Existen muchas opiniones tanto a favor como en contra de ingerir café ya que algunos de sus componentes resultan favorables, mientras que otros simplemente no aportan nada a los procesos biológicos. La mayor parte del café que se consume, es en forma de bebida, la cual está preparada a base de granos de café, los cuales son sometidos a ciertos procesos para conferirle características específicas como color, sabor, textura, etc. Uno de los principales procesos al que es sometido el café verde es el proceso de tostado o también conocido como torrefacción. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de extracción, del cual se obtienen licores con diferentes concentraciones de cafeína y principalmente de compuestos fenólicos y antioxidantes. Tanto el proceso de torrefacción como el de extracción presentan un efecto en los componentes del café. Este efecto se ve reflejado en reacciones químicas que suceden de forma simultánea y que más allá de degradarse, se ha verificado que se pueden estar sintetizando nuevos componentes con un poder antioxidante mucho mayor que el derivado de las formas nativas de los componentes. Los compuestos fenólicos y otras familias de moléculas antioxidantes, forman parte importante de los componentes de los granos de café. Estos compuestos presentan actividad biológica en el organismo humano, más allá de los mitos que pueden presentarse al consumir café, mediante el estudio de los componentes y su potencial antioxidante se puede conocer los beneficios que las infusiones de café aportan a la salud. En este trabajo se determinaron los compuestos fenólicos y antioxidantes en muestras de café verde y la diferencia en composición que existe entre éste y el café tostado de acuerdo al proceso al que son sometidos.

1. MARCO TEÓRICO

I. Café Verde y su consumo

El cafeto arábigo (*Coffeaa arábica*) es un arbusto de la familia de las rubiáceas nativo de Etiopía y/o Yemen; es la principal especie cultivada para la producción de café (obtenido a partir de las semillas tostadas), En la figura 1 se puede apreciar la planta del cafeto.



Figura 1 Coffeaa arábica.

El arbusto representa el 75% de la producción mundial de café. Produce un café fino y aromático, y necesita de un clima fresco para su cultivo sin embargo el cultivo del cafeto arábica es más delicado, menos productivo y está reservado a tierras altas de montañas. Las razones por las que se cultiva el café, tienen que ver con aquéllas por las que la población lo consume y éstas se puede dividir en cuatro:

- a) **Valor simbólico:** para muchos habitantes del occidente, tomar una taza de café por la mañana es un rito personal, que se repite con otras personas a lo largo del día.
- b) **Utilización como droga:** Muchos beben café para darse un "empujón adicional". Algunas culturas prohíben su uso.
- c) **Relaciones sociales y económicas:** el cultivo, empaquetado, distribución y comercialización del café son actividades de carácter global que afectan a diversas culturas, grupos sociales y organizaciones dentro de esas mismas

culturas, así como a miles de individuos. Gran parte del café que se consume en Europa y los Estados Unidos de Norteamérica, se importa de Sudamérica y otras partes del mundo.

1.1. Descripción Botánica del Café

De las más de cien especies que pertenecen al género *Cofeaea*, solamente dos de ellas se usan para la preparación de la bebida: *Cofeaea arábica* y *Cofeaea canephora*. La primera especie abarca casi tres cuartas partes de la producción mundial y se cultiva principalmente en centro y Sudamérica desde México hasta Perú. *Cofeaea canephora* o *Cafeto robusta* ofrece una bebida rica en cafeína; fuerte y más ácido, usualmente usado para la fabricación de café soluble o instantáneo y mezclas. El robusta se adapta a terrenos llanos, con rendimientos más elevados.

El cultivo del cafeto arábica es más delicado, menos productivo y está reservado a tierras altas de montaña, entre 900 y 2.000 msnm y es originario de Etiopía (5.2%), hoy en día los diez países con mayor producción, según las estadísticas del 2013 son: Brasil (38.7%), Vietnam (21.66%), Indonesia (9.2%), Colombia (8.58%), India (4.09%), Perú (3.31%), Honduras (3.31%), México (3.07%) y Uganda (2.83%).

1.2. Composición Nutricional

Los taninos condensados son los principales compuestos fenólicos en la pulpa del café, estos se encuentran en concentraciones de entre 0.8 al 14%, mientras que en la semilla, los compuestos fenólicos predominantes presentes son una familia de esterres formados entre ciertos ácidos hidroxicinámicos y ácidos quínicos, conocidos colectivamente como ácidos clorogénicos. Aun así los taninos están presentes en las semillas pero en menor concentración. Los ácidos clorogénicos están presentes en altas concentraciones en la semillas hasta un 14% y tienen una influencia en la calidad y el sabor del café (Adriana Farah, 2006).

2.1 Sustancias bioactivas presentes en el café.

El café como matriz química es una compleja mezcla de proteínas, lípidos, azúcares, etc. De los compuestos más importantes y destacados se encuentran son los compuestos fenólicos y taninos. La siguiente tabla muestra algunos de los principales compuestos del café y su actividad biológica.

Tabla 1 Sustancias bioactivas presentes en el café

| Sustancia | Actividad biológica |
|-------------------------|-------------------------------|
| Ácido cafenil quínico. | Antioxidante |
| Acetaldehído | Inhibidor de la tiroxinaza |
| Adenina | Vasodilatador y Diurético |
| <i>Alfa</i> -tocoferol | Antioxidante |
| Asparagina | Diurético |
| Ácido aspártico | Neuroexitante |
| <i>Beta</i> -caroteno | Antioxidante |
| Ácido caféico | Antidepresivo y antioxidante |
| Calcio | Vasodilatador |
| Colina | Hipoquinético |
| Ácido cítrico | Anticoagulante y antioxidante |
| Citrostadienol | Antirreumático |
| Cianidina | Antioxidante |
| Cisteína | Antioxidante |
| Cicloeucaleanol | Antibacterial |
| Eugenol | Antioxidante y vasodilatador |
| <i>Gamma</i> -tocoferol | Antioxidante |
| Guaiacol | Anestesico |
| Hierro | Antihemorrágico |
| Ácido isoclorogénico | Antioxidante |
| Isoeugenol | Antioxidante |
| Lanosterol | Antioxidante |
| Metionina | Antioxidante |
| Niacina | Vasodilatador |
| Ácido oléico | Antiinflamatorio |
| Ácido oxálico | Hemostático |
| <i>Para</i> -cresol | |

(Duke, 2009).

2.2. Antioxidantes: Descripción y determinación

2.2.1. Descripción de los antioxidantes.

Desde el punto de vista biológico los antioxidantes son compuestos capaces de oponerse a la oxidación (Vicente y col., 2009) y aquellas moléculas capaces de retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato (Halliwell, 1999). Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en sus orbitales de valencia. Debido a su configuración electrónica, son inestables y extremadamente reactivos, tendiendo a captar un electrón disponible de alguna molécula o átomo, a fin de alcanzar su estabilidad electrónica. La molécula que cede el electrón se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así una reacción en cadena (Halliwell, 1999). Los antioxidantes detienen el efecto de los radicales libres.

Existen factores exógenos y endógenos al organismo humano que estimulan o detienen la generación de radicales libres. Entre los estímulos exógenos que incrementan la generación de especies oxidantes se destacan diversos tipos de radiación, contaminantes ambientales, la metabolización de fármacos, el humo del tabaco, la acción de células del sistema inmunológico, o dietas deficientes en antioxidantes (Beckman, 1998).

El cuerpo humano está sometido bajo constante estrés oxidativo, esto se debe a que todos los organismos aerobios requieren oxígeno para la producción eficiente de energía, sin embargo durante la respiración ocurren procesos oxidativos que implican transferencia de electrones y liberación de radicales libres. Los procesos fisiológicos normales del organismo generan por si solos cierta cantidad de estas sustancias oxidantes y no todas las reacciones de radicales libres en los sistemas vivos son perjudiciales (Beckman 1998; Lee, 2004). En la cadena respiratoria se generan a partir del oxígeno, especies parcialmente reducidas y altamente reactivas denominadas especies reactivas del oxígeno (ERO's). De acuerdo a esto, la citotoxicidad de las ERO's en los seres vivos se produce cuando su generación excede la capacidad antioxidante del organismo, en un proceso denominado "estrés oxidativo". Las alteraciones celulares y metabólicas por acción de las ERO's sobre proteínas (alteraciones estructurales), lípidos (reacción en

cadena de oxidación) y ADN (roturas), dan lugar a numerosos procesos fisiopatológicos. Así, cuando las moléculas biológicas pierden sus electrones, sufren alteraciones en su funcionalidad, con la consecuente pérdida de homeostasis, aparición de enfermedades y posible muerte celular (Jeremy, 2004). Para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, los seres vivos poseen diferentes sistemas de defensa antioxidante integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos o químicos. A nivel celular existen diversas enzimas que son capaces de modular el estrés oxidativo y que resultan una primera línea de defensa al prevenir la generación de las especies radicales derivadas del oxígeno molecular (Castenmiller, 2000; Morales, 2011). Si el desbalance continúa, un grupo de enzimas reparadoras actúa a continuación, para revertir el daño o prevenir futuras lesiones en los constituyentes celulares. Para apoyar estos sistemas de defensa, actúan diferentes tipos de antioxidantes que incluyen componentes endógenos, como las proteínas de suero y sus grupos tiol, bilirrubina y glutatión y compuestos antioxidantes provenientes de la dieta, que incluyen entre otros grupos importantes a algunas vitaminas y a los compuestos fenólicos (Castenmiller, 2000).

2.2.2. Determinación de capacidad antioxidante.

a) Ensayo del radical DPPH

Una de las principales formas de determinar la capacidad antioxidante de un compuesto es el ensayo de capacidad antioxidante por el radical DPPH (difeníl-(2,4,6-trinitrofenil-imino)azanium). En la figura 2 se presenta la estructura química del DPPH.

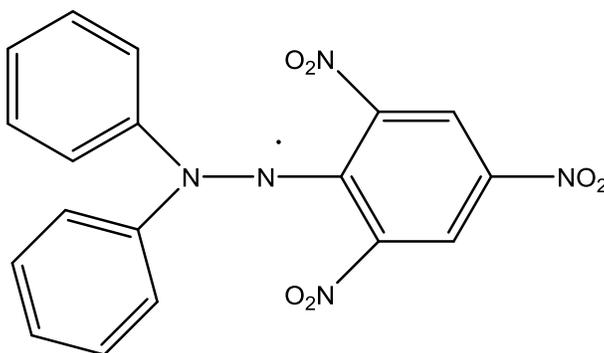


Figura 2 Estructura del radical DPPH

El DPPH es uno de los pocos radicales estables y que se venden comercialmente. Presenta una absorción en el UV-vis máxima a 515nm.

El método del radical DPPH, es utilizado para evaluar la actividad antioxidante de compuestos específicos, a menudo es referido como un método que representa las reacciones endógenas en sistemas biológicos. Los compuestos antioxidantes reaccionan con el radical DPPH en una solución de metanol. La reducción de este radical es seguida mediante el monitoreo de la absorbancia durante la reacción. Después de la reacción de reducción, la absorción disminuye hasta que el color morado-azul desaparece (Abuja, 1998). En la figura 3 se muestra el mecanismo de reacción del radical DPPH.

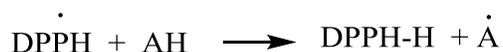


Figura 3 Mecanismo de reacción del DPPH

b) Ensayo de capacidad antioxidante por el método del radical ABTS

Este ensayo fue reportado por primera vez por Miller y Rice en 1993 (Miller, 1993). Posteriormente llegó una versión mejorada, en esta el oxidante fue el radical ABTS. Dicho radical es generado mediante la oxidación de 2,2-azinobis, 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) con persulfato de potasio. Posteriormente se diluye la muestra hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.01 nm. Un mililitro de la solución resultante se mezcló con 10 μ L de la muestra y posteriormente se determina la absorbancia. La diferencia de la absorbancia obtenida es puesta contra la concentración del antioxidante. La concentración de antioxidantes es dada como el porcentaje de cambio en la absorbancia del radical ABTS (Pellegrini, 1999).

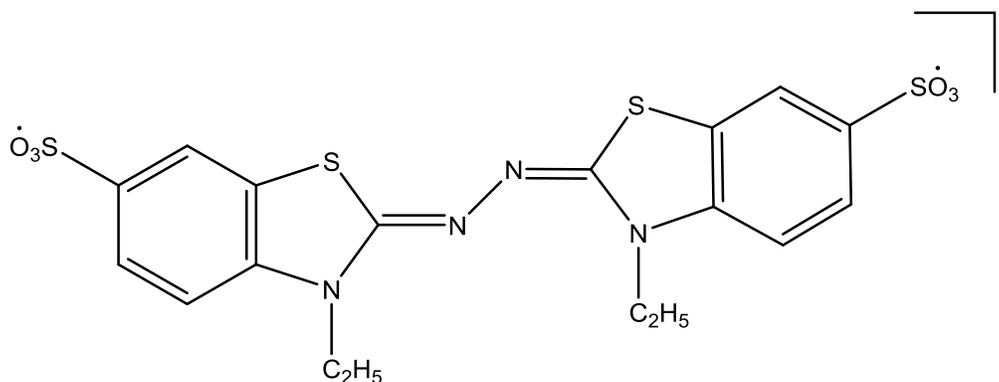


Figura 4 Estructura del ABTS.

2.3. Compuestos fenólicos

2.3.1. Descripción y utilidad en las plantas.

Los compuestos fenólicos se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas. En la actualidad se conocen más de 8 000 estructuras fenólicas diferentes que parten de moléculas simples hasta dímeros. Todas ellas se caracterizan por presentar al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y pueden dividirse en varias clases, de acuerdo al número de átomos de carbono presentes en conjunción con la estructura fenólica básica. Entre los más importantes se distinguen: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y otros compuestos menos comunes como estilbenos y lignanos (Dai, 2010; Michalak, 2006).

Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de productos, con distintas características de solubilidad de acuerdo a la complejidad de su estructura: algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros de gran tamaño y resultan insolubles. Los fenoles muestran también una multiplicidad de funciones en la planta: pueden actuar como mecanismo de defensa ante herbívoros y patógenos, proveen soporte mecánico, atraen polinizadores, algunos de ellos son pigmentos que absorben la radiación ultravioleta y otros actúan como agentes alelopáticos, reduciendo por ejemplo el crecimiento de plantas competidoras. (Taiz y Zeiger, 2006).

Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas, vegetales, cereales y algunas bebidas como el té, café, vino y cerveza; y son por lo tanto constituyentes integrales de la dieta humana. En los alimentos de origen vegetal los fenoles contribuyen a la estabilidad oxidativa y son en parte responsables de algunas propiedades organolépticas, como amargor, astringencia, color, sabor y olor (Pandey, 2009; Dai, 2010).

Se ha hallado que los compuestos fenólicos pueden modular la actividad de una amplia gama de receptores enzimáticos y celulares. De esta manera, estos compuestos cumplirían además otras funciones biológicas en la prevención y el tratamiento de enfermedades. Entre éstas se destacan efectos vasodilatadores, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibición de enzimas pro-oxidantes (Dai y Mumper, 2010).

2.3.2. Características químicas de los fenoles

Químicamente los fenoles son compuestos cuya fórmula general es Ar-OH, donde Ar es fenilo o un fenilo sustituido. Por lo general los fenoles se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol, los metilfenoles reciben el nombre especial de cresoles (Morrison, 2001). Existen varias clasificaciones para los fenoles, uno de los más comúnmente utilizados se basa en el número de carbonos propuesto y publicado por Jeffrey Harborne y Simmonds en 1980 (Harbone, 1980).

Tabla 2 Clasificación de los compuestos fenólicos

| Número de carbonos | Esqueleto básico | Número de Ciclos | Clase | Ejemplos |
|--------------------|--------------------------------|------------------|---|---------------------------------------|
| 6 | C ₆ | 1 | Simple Fenoles y Benzoquinonas | Catecol |
| 7 | C ₆ -C ₁ | 1 | Ácidos Fenolicos | Ácido Gálico y Salicilico. |
| 8 | C ₆ -C ₂ | 1 | Acetofenonas, Ácidos Fenilaceticos. | Ácido Hidroxifenilacetico. |
| 9 | C ₆ -C ₃ | 1 | Ácidos Hydroxicinamicos, Cumarinas, Fenilpropenos | Eugenol, Ácidos Cafeicos y Ferulicos. |
| 10 | C ₆ -C ₄ | 1 | Naftoquinonas | Juglona. |

(Harbone, 1980).

2.3.3. Propiedades físicas de los fenoles.

Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto fusión, tienen puntos de ebullición elevados, debido a que forman puentes de hidrogeno. El propio fenol tiene cierta solubilidad en agua por los puentes de hidrogeno con ella. La mayoría de los otros fenoles son esencialmente insolubles, incoloros y se oxidan con facilidad, por lo que a menudo presentan color, a menos que estén cuidadosamente purificados (Morison, 2001). Los fenoles son compuestos bastante ácidos; la mayoría de los fenoles tienen valores de constantes de acidez del orden de 10^{-10} , por lo que son menos ácidos que los ácidos carboxílicos (Morrison, 2001).

2.3.4. Los compuestos fenólicos presente en el café.

La mayoría de los compuestos fenólicos en el café y la semilla del café son ácidos clorogénicos. Estos compuestos incluyen diferentes grupos de compuestos e isómeros formados mediante la esterificación de una molécula de ácido quínico (Figura 5) y una de las tres moléculas de un ácido cinámico específico.

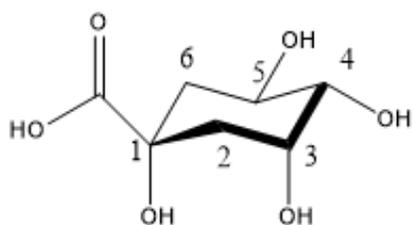


Figura 5 Estructura del ácido quínico.

De acuerdo al sistema de numeración de la IUPAC el ácido quínico tiene grupos hidroxilo en la posición axial en carbonos 1 y 3, e hidroxilos en posición ecuatorial en los carbonos 4 y 5. Los esteres de este ácido se forman generalmente con el carbono 5 pero es posible en el carbono 3 y 4, y menos probable en el carbono 1. Los ácidos hidroxi-cinámicos son ácidos propenóicos con sustituciones diferentes en el anillo aromático. En la siguiente tabla se muestran los 3 más comunes (Clifford, 2003)

Tabla 3 Estructuras y nombres de los principales Ácidos hidroxi-cinámicos.

| Ácido Caféico | Ácido Ferúlico | Ácido <i>P</i> -Coumárico |
|---------------|----------------|---------------------------|
| | | |

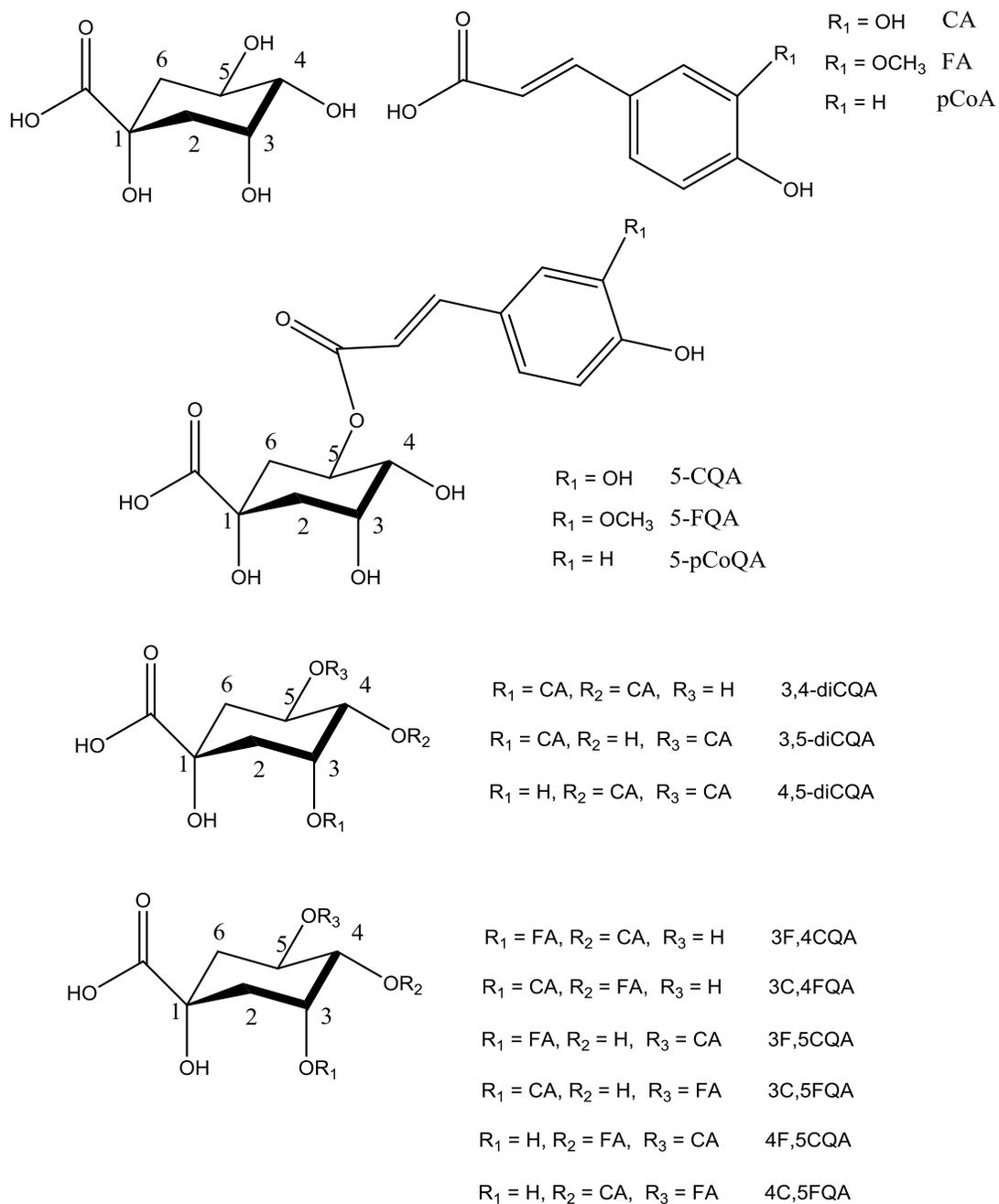


Figura 6 Ácidos clorogénicos y compuestos relacionados de acuerdo a sus características químicas.

Los grupos principales de los ácidos clorogénicos que se encuentran en el café están presentes en la figura anterior, de acuerdo con su identidad química. Estos grupos de compuestos incluyen los ácidos cafeoilquinicos (CQA), con 3 isómeros

(3-, 4- y 5-CQA), Ácidos dicafenoilquinicos (diCQA), con tres isómeros (3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA) y así subsecuentemente todas las posibles combinaciones entre posición y sustituyente.

El total de los ácidos clorogénicos presentes en los granos del café varía de acuerdo a su genética, especie, forma de cultivo, grado de maduración, clima y suelo. En general los valores descritos en la literatura de ácidos clorogénicos para la *Coffeaa arábica* van de 4 a 8.4% de materia seca. En adición a los ácidos clorogénicos existen otros compuestos de la familia de los mismos que se encuentran dentro de los granos de café como los ácidos quínicos, ácidos cafeoil-metoxicinamolquinicos, además de algunas lactonas y ácidos clorogénicos libres como se puede ver en la tabla 3 (Farah, 2006).

Tabla 4 Contenido de ácidos clorogénicos en granos de café expresados en porcentaje por gramo de materia seca

| Muestra | CQA | FQA | diCQA | Total de Ácidos Clorogénicos |
|--------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------------------|
| <i>C. arábica</i> | 5.76 | 0.25 | 0.87 | 6.88 |

CQA: Ácidos clorogénicos derivados del ácido caféico, FQA: Ácidos Clorogénicos derivados del ácido Ferúlico, diCQA: ácidos clorogénicos derivados del *p*-coumarico (Turgo, 1984).

De los isómeros presentados anteriormente en orden de abundancia 5-CQA es responsable del 56-62% del total de los Ácidos Clorogénicos. 3-CQA y 4CQA cuentan para un 10% del total. Los isómeros DiCQA aportan del 15-20% del total. Y los isómeros de FQA de un 5-13%. Los isómeros restantes y los derivados previamente mencionados conforman el resto (Clifford, 2003).

Durante el proceso de tostado, los ácidos clorogénicos cambian su composición. Debido a la inestabilidad térmica, los ácidos clorogénicos generalmente se degradan en un derivado del fenol cuando las condiciones son muy intensas. Durante el tostado, parte de estos compuestos es isomerizada, una parte es transformada en quinolactonas (Figura 7) y otra parte es degradada en compuestos de bajo peso molecular. También es posible que participen en la formación de material polimérico como las melanoidinas (Clifford, 2000).

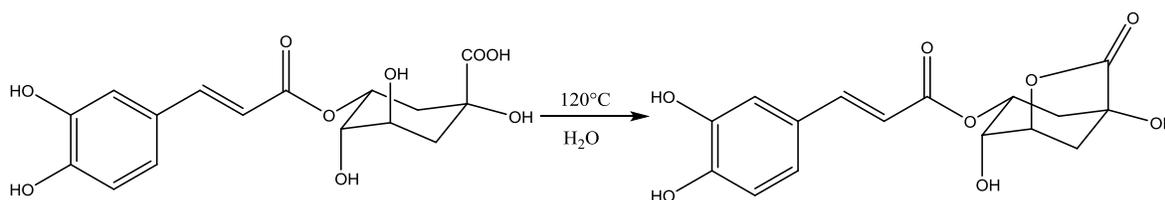


Figura 7 Formación de lactonas (Farah, 2006).

Tabla 5 Concentración de ácidos y quinolactonas en café tostado expresado en porcentaje sobre gramos.

| Muestra | CQA | FQA | DiCQA | Total CGA | CQL |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Comercial Promedio | 2.26 | 0.21 | 0.19 | 2.66 | 0.31 |
| Coffeea arábica tostada | 3.23 | Sin Presencia | Sin Presencia | 0.32 | Sin Presencia |
| Instantáneo | Sin presencia |

CQA: Ácidos clorogénicos derivados del ácido caféico, FQA: Ácidos Clorogénicos derivados del ácido Ferúlico, diCQA: ácidos clorogénicos derivados del *p*-coumarico, CQL: Lactonas. (Farah, 2006).

2.3.5. Oxidación de los fenoles

Los fenoles naturales son reactivos, especialmente a la oxidación, notablemente una mezcla de fenoles complejos pueden llegar a un proceso de autooxidación con el tiempo. Esto se correlaciona al cambio de color café que ocurre en muchos alimentos. Este cambio de color café ha sido la causa de la muerte de células en los seres humanos. (Moreira, 2012).

De entre los fenoles más importantes que se sintetizan naturalmente se muestran algunos en la tabla 3

Tabla 6 Principales compuestos fenólicos naturales.

| | |
|--------------------------------|---|
| Cannabinoides | El constituyente activo de la Cannabis |
| Capsaicina | El componente picante de los chiles. |
| Carvacrol | Antimicrobiano presente en el orégano |
| Cresol | found in coal tar and creosote |
| Estradiol | Estrogeno – hormonas |
| Eugenol | Principal compuesto en el aceite de clavo |
| Ácido Gálico | Presente en Ajo |
| Guaiacol | Orto Metoxifenol-Sustancia que proporciona el sabor ahumado y se encuentra en el café, whisky y cigarros. |
| Salicilato de Metilo | Compuesto presente en algunos aceites comerciales. |
| Cetona de Frambueso | El compuesto que da olor a los Frambuesos |
| Ácido Salicílico. | Precursor de la aspirina |
| Setotonina/Dopamina/Adrenalina | Neurotransmisores naturales |
| Timol | Antiséptico utilizado en enjuagues bucales |
| Tirosina | Un aminoácido |
| Sesamol | Compuesto presente en el sesame. |

2.3.6. Reacciones de los Fenoles

a) Oxidación a quinonas (Morrison, 2001).

Una de las principales reacciones de los fenoles es la oxidación, esta se puede observar con detalle en la siguiente figura.

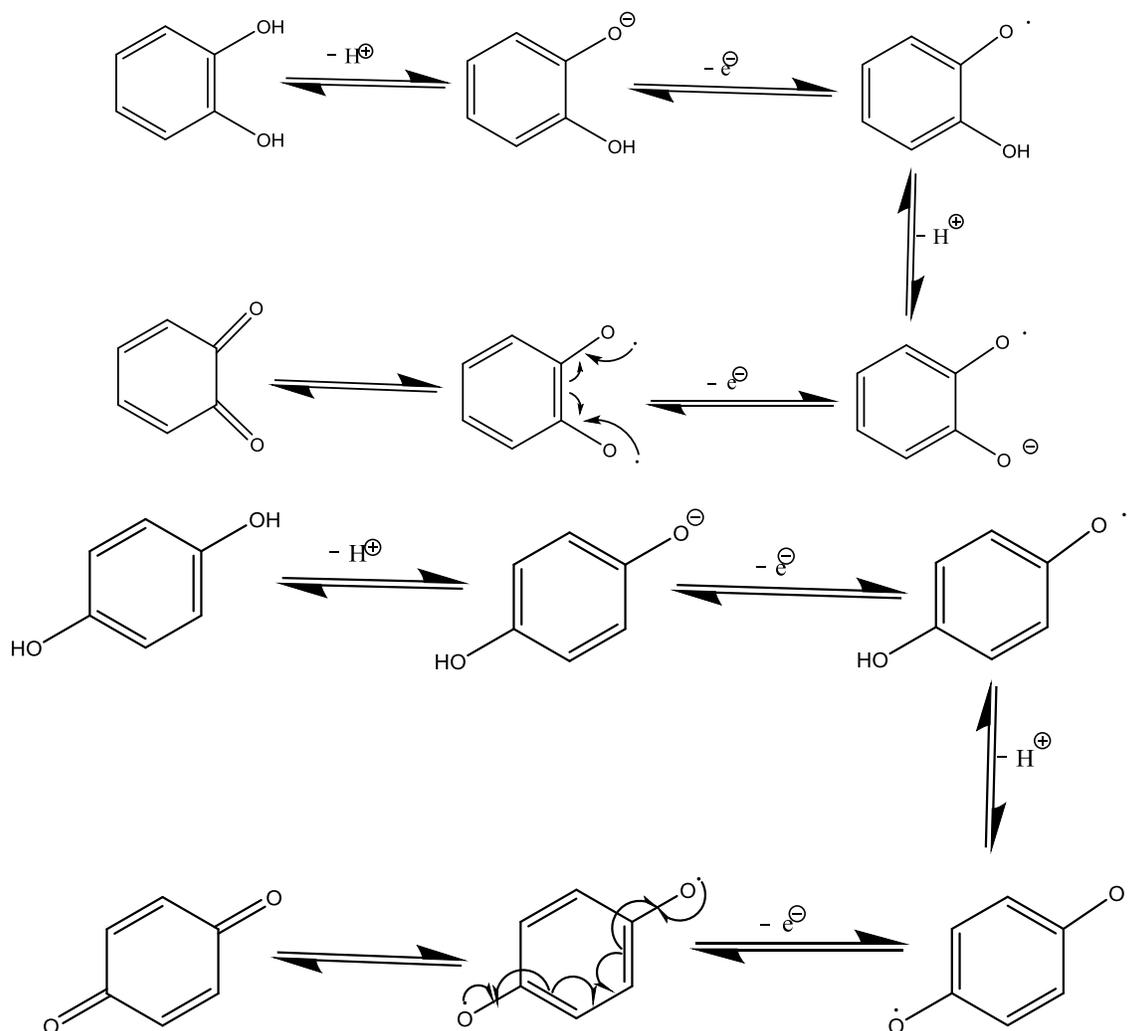


Figura 8 Mecanismo de reacción de la oxidación de fenoles a quinonas.

b) Oxidación del persulfato de Elbs

El fenol es hidroxilado en la posición *para* empleándose persulfato de potasio alcalino (Morrison, 2001). El mecanismo de reacción se presenta a continuación.

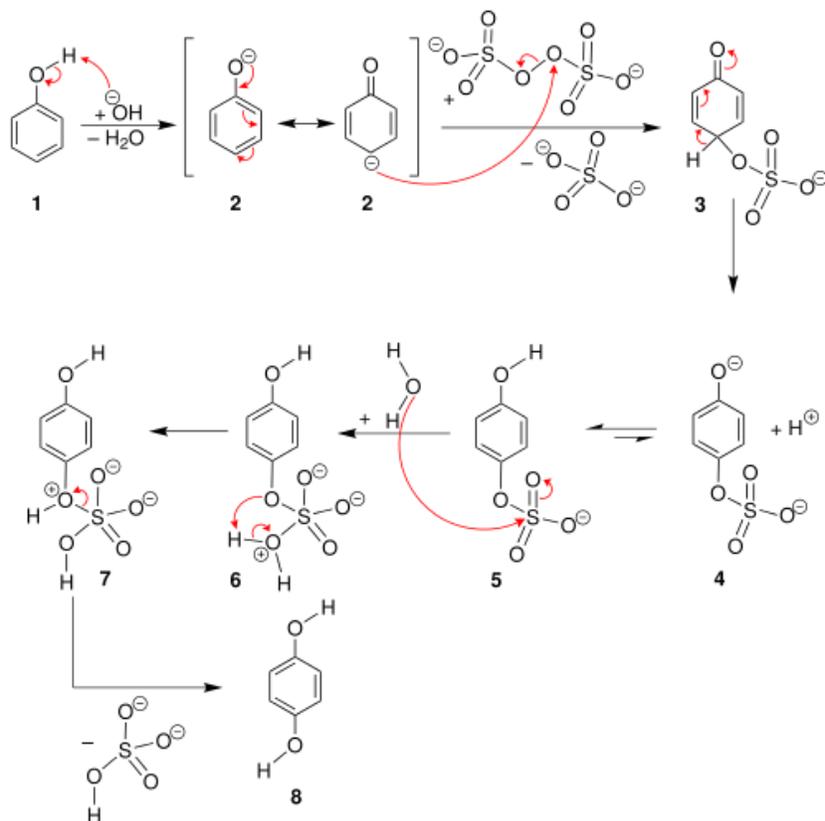


Figura 9 Mecanismo de reacción de la oxidación del persulfato de Elbs.

Debido a que el fenol posee un oxígeno con un par electrónico disponible se puede llevar a cabo la formación de Eteres como se muestra a continuación.

Formación de éteres (síntesis de Williamson)

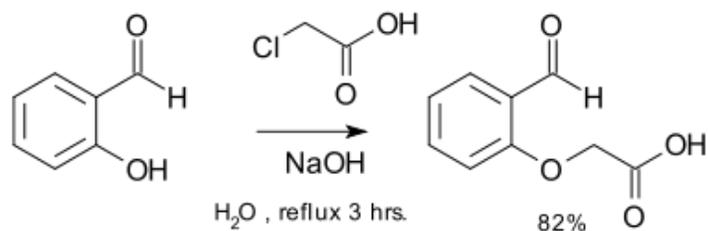


Figura 10 . Mecanismo y ejemplo de la formación de éteres de la síntesis de Williamson.

De igual forma puede llevar a cabo formación de éteres

d) Formación de éteres

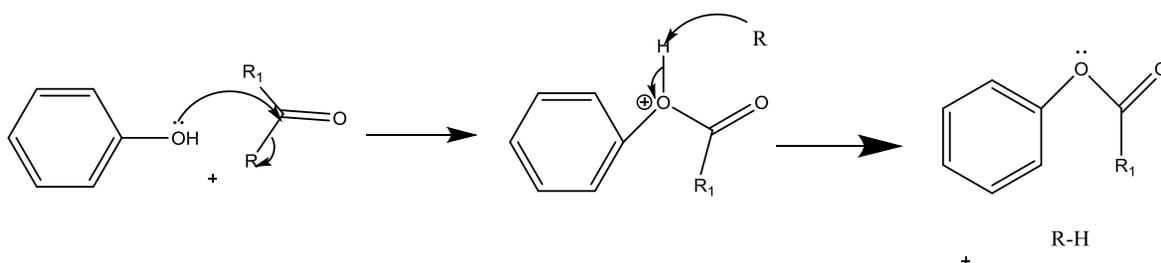


Figura 11 Mecanismo de la formación de éteres.

e) Sustitución electrofílica aromática.

El grupo $-OH$ activa poderosamente el anillo y orienta para y orto. Dentro de estas reacciones encontramos: sulfonación, nitración, halogenación, alquilación y acilación de Friedel-Crafts (Morrison, 1998).

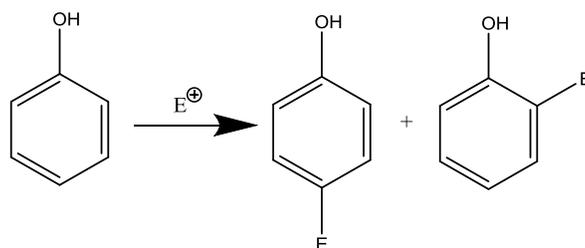


Figura 12 Reacciones principales de la sustitución electrofílica aromática de los fenoles.

f) Anión fenolato

La formación de estos aniones deriva de la pérdida de H^+ y actúan como ligandos ante cationes metálicos (Figura 13)

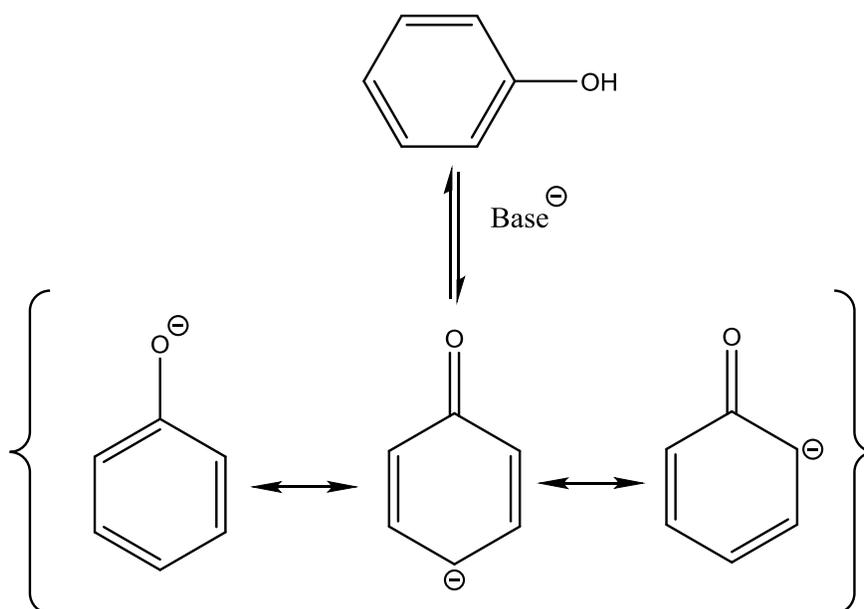


Figura 13 Formación de aniones fenolato.

2.3.7 Métodos de cuantificación analítica de compuestos fenólicos

2.3.7.1. Ensayo para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales mediante el reactivo Folin-Ciocalteu

Este ensayo fue originalmente utilizado para el análisis de las proteínas tomando ventaja de la actividad del reactivo. Posteriormente fue utilizado por Singleton para el análisis de fenoles total en vino (Singleton, 1999). Este reactivo mide la capacidad de reducción. Muchas publicaciones aplicaron este método y frecuentemente se han encontrado excelentes líneas de correlación entre los perfiles de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Este ensayo se basa en el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato. Ambos reaccionan y forman ácido fosfomolibdotungstenico de color amarillo, el cual reacciona con los compuestos fenólicos dando lugar a una coloración azul susceptible a ser determinada espectrofotométricamente a 765nm.

El reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico a ningún compuesto fenólico. Los polifenoles reaccionan con este reactivo solo bajo condiciones básicas. La disociación de un protón fenólico produce un anión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu. Eso apoya la noción de que la reacción ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrón. A pesar de la indefinida naturaleza química de este reactivo este ensayo es conveniente, simple y reproducible por lo que se ha acumulado una gran cantidad de datos y se ha convertido en un ensayo de rutina en el estudio de antioxidantes fenólicos (Dejian, 2005).

Si bien es cierto que el mecanismo en concreto aún no está definido completamente se pueden apreciar los productos. Los cuales son la reducción a los polifenoles tienen una coloración azulada que se cuantifica espectroscópicamente en base a una recta patrón con ácido gálico (García, 2003).

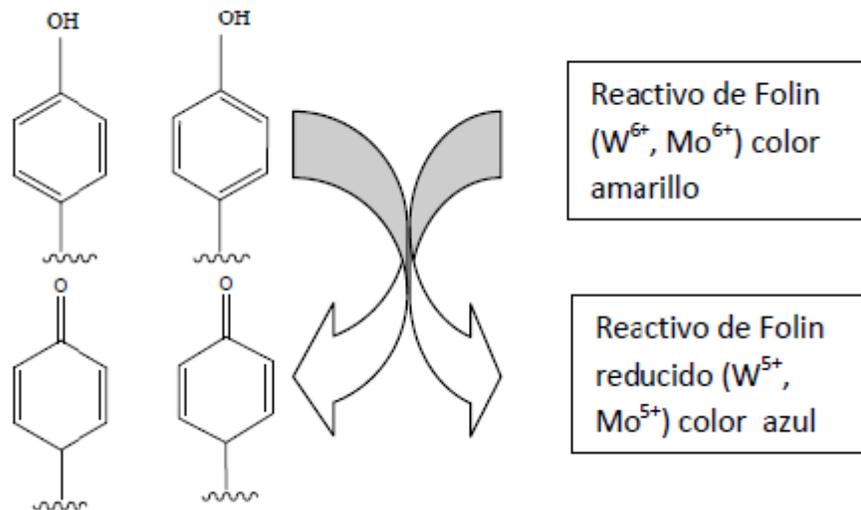


Figura 14 Productos del Método Folin-Ciocalteu.

2.4 Taninos

2.4.1 Descripción de los taninos.

Los taninos son compuestos polifenólicos de alto peso molecular con funciones en los sistemas biológicos como quelantes de metales, agentes de precipitación de proteínas y antioxidantes (Kar, 2003).

Los taninos se clasifican en tres grupos de acuerdo a su monómero base: taninos hidrolizables, condensados y florotaninos. Los taninos hidrolizables son compuestos que contienen un núcleo central de glucosa esterificado con ácido gálico (galotaninos) o con ácido elágico (elagitaninos). Los taninos condensados son polímeros de flavonoides vinculados a través de un enlace de carbono, también se conocen como proantocianidinas (Mc Rae, 2011).

II. Procesos industriales del café

3.1 Proceso del tostado.

3.1.1 Descripción

El tostado del café transforma las propiedades tanto físicas como químicas de los granos de café verde en café tostado. El proceso confiere al café su sabor característico. Los granos de café sin tostar contienen similares niveles de ácidos, proteínas, azúcares y cafeína que los granos tostados, pero carecen de otros componentes químicos que se van degradando tanto por oxidación con el calor, la luz y reacciones internas, siendo la principal la reacción de Maillard (Wang, 2011). El proceso de tueste consiste esencialmente en tres pasos: a) clasificación, b) tueste y c) atemperado; que consiste en esperar a que alcance temperatura ambiente. El primer paso consiste simplemente remover los desechos y componentes indeseables de los granos (tierra, insectos, etc.), pesarlos y almacenarlos. El segundo paso (tostado) inicia colocando los granos en el tostador donde ocurre un proceso endotérmico desde temperatura ambiente hasta alcanzar la temperatura mínima de 175°C. Los procesos varían con temperaturas entre 190 y 280 °C, y los granos son tostados durante un período que se extiende desde algunos minutos hasta cerca de 30 minutos. Los tostadores donde ocurre este proceso suelen ser cilindros que giran horizontalmente y que hacen caer los granos de café verde en una corriente de gases de combustión calientes; los tostadores funcionan tanto en lotes como en modo continuo y pueden utilizar fuego directo o indirecto.

Tabla 8 Ilustraciones y temperaturas de los diferentes tostados del café.

| Sin Tostar | | | |
|---|--|---|---|
|  | <p>22 °C (72 °F), Granos de café verde.</p> <p>Muestra sin procesar.</p> |  | <p>165 °C (329 °F), Secado</p> <p>Granos durante el proceso endotérmico hasta que la mayoría de los componentes volátiles se hayan evaporado.</p> |
| Tostado Ligero | | | |
|  | <p>196 °C (385 °F), Tostado tipo canela</p> <p>Un tostado ligero inmediato a la evaporación de los compuestos. Con cierta dulzura, sabores grasos y cierta acidez.</p> |  | <p>205 °C (401 °F), Tostado Ligero</p> <p>Color café moderado, pero con apariencia aun similar al grano. Presenta sabor ácido complejo.</p> |
| Tostado Medio | | | |
|  | <p>210 °C (410 °F), Tostado Americano.</p> <p>Color Medianamente café. La acidez es retirada significativamente pero el grano conserva la textura del café verde.</p> |  | <p>219 °C (426 °F), Tostado tipo "City"</p> <p>Color medianamente café, La mayoría de los cafés comunes se encuentran de aquí. Comienza a apreciarse la textura del café tostado.</p> |
| Tostado Oscuro | | | |
|  | <p>225 °C (437 °F), Tostado tipo "Full City"</p> <p>Color medianamente café oscuro con ocasional brillo.</p> |  | <p>230 °C (446 °F), Tostado Vienes</p> <p>Color moderadamente café oscuro, con brillo superficial, Sabor caramelizado, sin acidez. Toda característica original del café verde ha sido eclipsada por el tostado a este nivel.</p> |
|  | <p>240 °C (464 °F), Tostado Francés.</p> <p>Color café oscuro, brillante con tono aceitoso, El carácter tostado domina por completo, este ya no presenta ni el aroma o los sabores del café verde.</p> |  | <p>245 °C (473 °F), Tostado Italiano</p> <p>Color casi negro y brillante, Aparición de algunos granos con quemadura.</p> |

Al principio de la aplicación del calor, el color de los granos verdes pasa a amarillo, luego a marrón canela. Es en ese momento cuando el grano pierde humedad, los granos experimentan una pérdida del 28% de su peso debido a la pérdida de agua y los compuestos que se volatilizan. Posteriormente aumentan el tamaño de su volumen debido a que se liberan los compuestos volátiles y se produce dióxido de carbono (Subproducto de la reacción de Maillard) (Eduzan, 2015). Cuando la temperatura en el interior alcanza alrededor de 200 °C, salen los aceites de los granos. En general, cuanto más aceite hay, más sabor tiene el café. Posteriormente comienza un proceso exotérmico siendo este el paso final (Raemy, 1982). La tabla 8 muestra cómo cambia una muestra de café verde de Brasil expuesta a distintas temperaturas (Kennet, 2001).

3.1.2. Cambios en la composición química debido al proceso de tostado

Durante el proceso de tostado existen dos procesos paralelos que cambian los componentes del café una de ellas es la formación de fracciones de alto peso molecular las cuales son en su mayoría melanoidinas. La segunda es la reducción de los polifenoles ya sea por oxidación.

a) Melanoidinas

Las melanoidinas son el producto final de la reacción de Maillard, esta reacción se da por diferentes razones entre la degradación de azúcares y compuestos con un grupo amino libre. Son generalmente definidas como compuestos color café de alto peso molecular que contienen nitrógeno (Wang, 2011).

Durante el tueste, polisacáridos como las arabinoglactosas, polifenoles, proteínas y aminoácidos libres se unen covalentemente unos con otros formando las melanoidinas. La severidad del proceso incrementa la complejidad añadiendo más y más compuestos (Sily, 2010). En productos a base de café, las melanoidinas han sido estimadas en una concentración del 29% de la materia seca. Estos generalmente se cuantifican gracias a su coloración café con el análisis de dilución de color.

A pesar de los esfuerzos realizados para describir la estructura de las melanoidinas del café, aún es desconocida. Ya que debido a la gran cantidad y diversidad de sus estructuras existe gran dificultad en separar las distintas fracciones de las mismas. Sin embargo se han podido extraer diferentes poblaciones de las melanoidinas basados en la naturaleza aniónica de los mismos utilizando cromatografía de fracción anódica sobre fracciones obtenidas a través de etanol (Nunes, 2007).

Debido a su complejidad estructural muchas de las melanoidinas no son solubles en agua o solventes orgánicos por lo que no llegan al cuerpo al momento de ingerir tazas de café y no contribuyen a ninguna función biológica (Vitaglione, 2012).

Algunos estudios han demostrado que arabinogalactantes en forma de proteínas y Galactomamantes forman parte de las principales melanoidinas. (E.K.Bekedam, 2007).

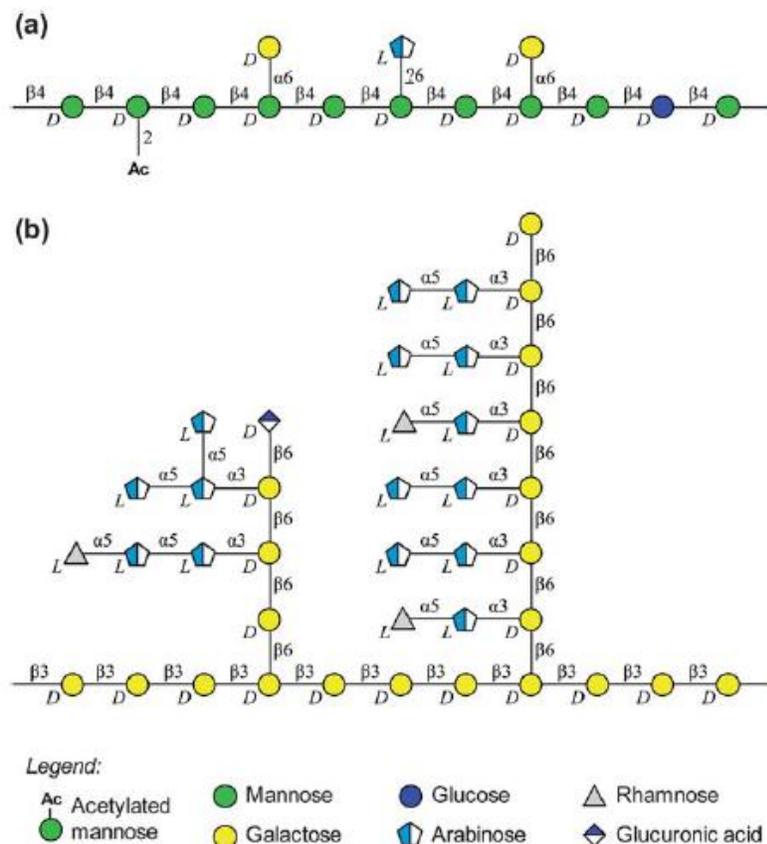


Figura 16 Ilustración de melanoidinas compuestas de Galactomananos (a) y Arabinogalactantes (b) (Figura tomada de Moreira, 2012).

Aunque algunas características de las Melanoidinas en café han sido reconocidos, los mecanismos que involucran su formación aún no han sido comprendidos. Basados en estudios de modelado, existen tres teorías para su formación que se mencionan a continuación (Nunes, 2010).

1) Las melanoidinas son formadas mediante polimerización (por reacciones de policondensación) de compuestos de bajo peso molecular productos de la reacción de Maillard, como furanos y pirroles, formados en avanzadas etapas de la reacción (Hayase, 2006).

2) Las melanoidinas derivan de compuestos de bajo peso molecular de la Reacción de Maillard y se unen a proteínas mediante cadenas de aminoácidos como lisina, arginina y cisteína.

3) El esqueleto de las Melanoidinas está compuesto principalmente por productos de la degradación de azúcar, formados en las primeras etapas de la reacción de Maillard y polimerizados a través de condensación aldólica (Hofman, 2002).

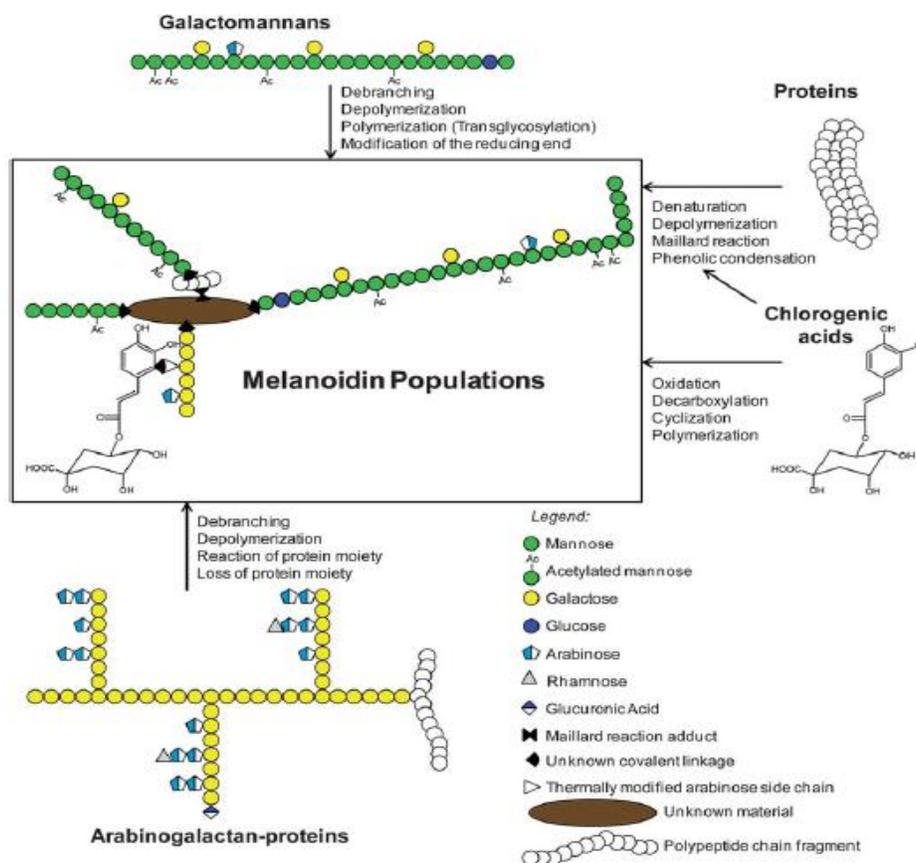


Figura 17 Formación y compuestos principales de las poblaciones de los taninos (Figura tomada de Moreira, 2012).

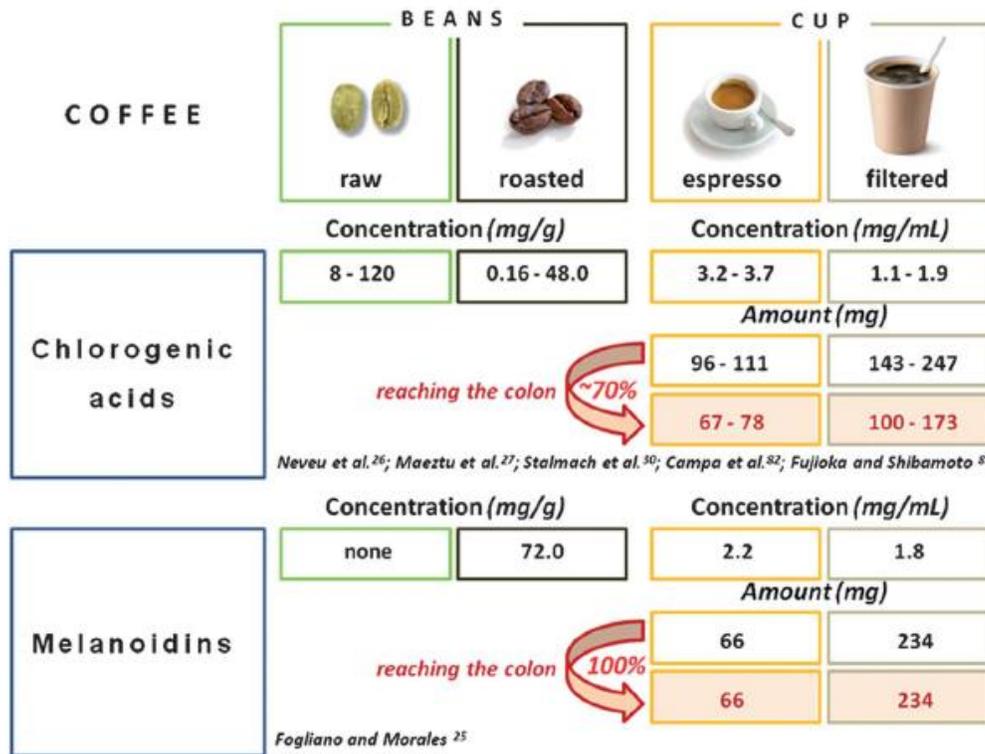


Figura 18 Concentración de ácidos clorogénicos y melanoidinos en café verde y tostado y en tazas de café filtradas en espresso (Vitaglione, 2012).

b) Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es una reacción química entre aminoácidos y azúcares. Generalmente se presenta en el tostado de alimentos la cual brinda sabores distintivos y un color café. Esta reacción típicamente procede de 140 a 165°C. A temperaturas más elevadas la pirolisis es más pronunciada que la reacción de Maillard.

El grupo carbonilo reactivo de los azúcares reacciona con el grupo amino de los aminoácidos el cual tiene un carácter nucleofílico, lo que forma una compleja mezcla de moléculas. Este proceso es acelerado en un ambiente alcalino, posteriormente los grupos amino son desprotonados y nuevamente es posible un ataque nucleofílico. Lo que da origen a múltiples compuestos y moléculas (Morrison, 1998).

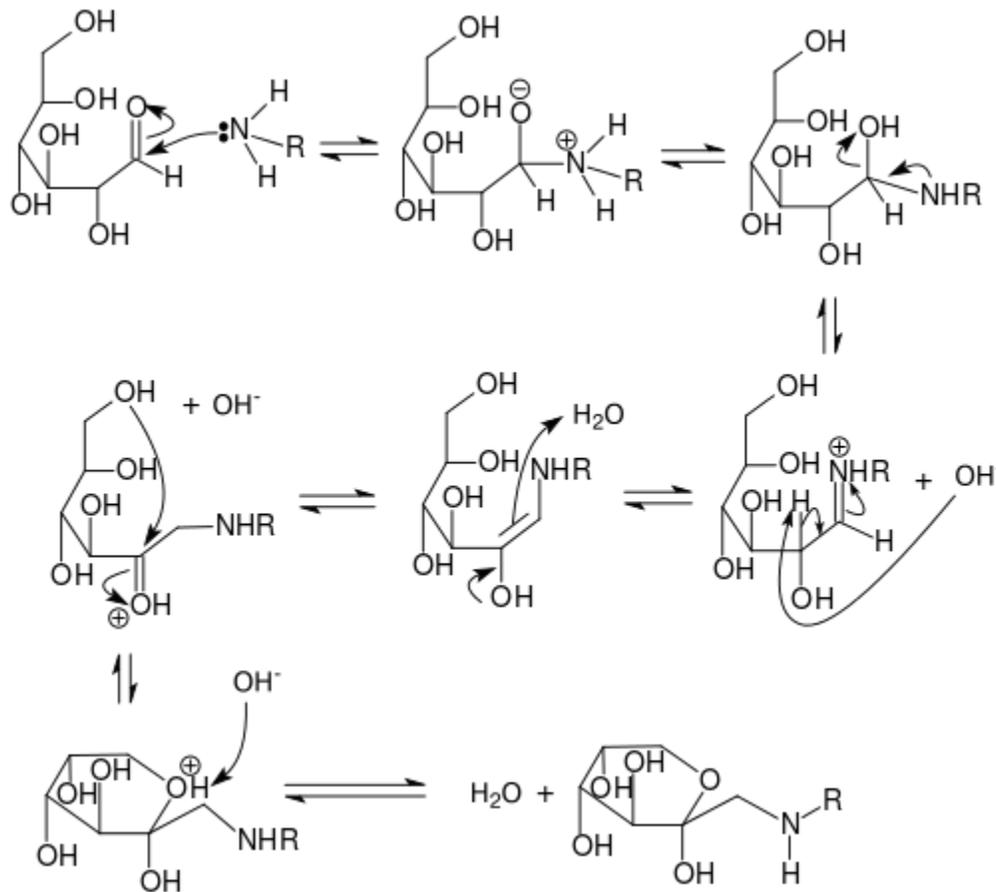


Figura 19 Primera fase del Mecanismo de la Reacción de Maillard

Esta reacción resulta de las reacciones e aminas, aminoácidos, péptidos y proteínas con grupos carbonilos de azúcares reducibles, y esto lleva a la formación de pigmentos cafés o polímeros con color llamados melanoidinas.

La reacción de Maillard se divide en tres etapas: **a)** la condensación de azúcares con aminas para formar una base de Schiff y el re-arreglo de Amadori, **b)** deshidratación y fragmentación de azúcares y la degradación de aminoácidos, y **c)** condensación Aldólica y polimerización de aminas y aldehídos.

La primera reacción de una aldosa o una cetosa con un grupo amino presente en proteínas u otras moléculas lleva a una glicosilamina n-sustituida o una cetosilamina N-sustituida, respectivamente. El primer paso es seguido de la formación de un arreglo de Amadori (1-amino-1-deoxi-2-cetosa) o un producto del re-arreglo de Heyns (2-amino-2-deoxialdosa), respectivamente. El paso donde ocurren el arreglo de Amadori o el de Heyns es conocido como “glicación”.

La formación de productos de Amadori (Compuestos con color) es seguida de la formación de una gran cantidad de compuestos carbonílicos no saturados producidos por la deshidratación del azúcar y la fragmentación del mismo. Posteriormente sucede la degradación de Strecker. La degradación de azúcares y aminoácidos es la mayor fuente de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular. Estos compuestos carbonílicos pueden ser precursores de las melanoidinas. Los azúcares reductores pueden reaccionar con lípidos y ácidos nucleicos para formar bases de Schiff y productos de Amadori, y subsecuentemente melanoidinas (modificaciones químicas irreversibles, unión covalente con proteínas y coloración café). Si la oxidación acompaña la glicación o la formación de compuestos de Amadori, entonces los productos son conocidos como productos de glicosidación. (Por ejemplo la pentosidina unión entre arginina y lisina). El producto donde no existe oxidación es el melanoidinas a pirralina. La peroxidación lipídica forma glioxal que puede ser formado en la reacción de Maillard como melanoidinas. (Yrjo H, 2017).

En la figura 20 se presenta un esquema de los caminos que pueden ocurrir en la reacción de Maillard.

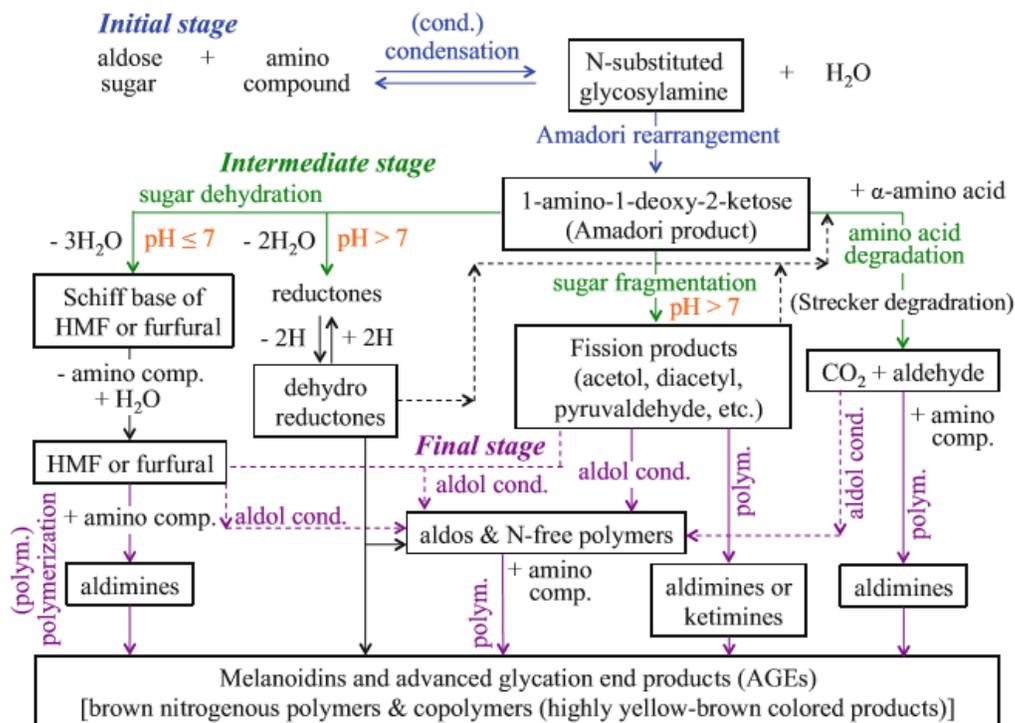


Figura 20 Esquema de los caminos que pueden ocurrir en la reacción de Maillard (Figura tomada de Yrjo H, 2017).

III. Espectroscopía, Absorbancia y Transmitancia.

Los métodos para la cuantificación de sustancias químicas en este trabajo se realizaron por métodos espectroscópicos, por lo que se anexo un breve resumen de los fundamentos del mismo.

4.1 Descripción general

El espectro electromagnético es el conjunto de diverso tipos de ondas en un intervalo de frecuencias y longitudes de onda. El espectro electromagnético es la clasificación de estas ondas de acuerdo a su longitud de onda.

La luz visible es aquella parte del espectro que el ojo humano puede detectar. Sus longitudes corresponden desde el rojo ($\lambda = 7 \times 10^{-7}$ m) hasta el violeta ($\lambda = 4 \times 10^{-7}$ m) (Searway, 2008).

4.2. Cromóforos y auxocromos

Los Cromóforos son la parte o conjunto de átomo de una molécula que provoca la absorción de radiación y confiere color en el espectro. También son definidos como sustancias que tienen muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible y editarse para emitir diversos colores. (Skoog, 2008).

Los auxocromos son grupos funcionales que por sí solos no producen absorciones importantes, pero tienen el efecto de intensificar las bandas de absorción (Skoog, 2008).

4.3. Relación de la luz transmitida

Si se tiene una sustancia y se le expone a una radiación incidente (P_0) la sustancia dejara pasar cierta cantidad de la radiación la cual es la radiación transmitida (P). En este fenómeno pueden suceder tres resultados

- a) La radiación transmitida es igual a cero. Por lo que la sustancia es opaca.
- b) La radiación transmitida es igual a la radiación incidente. La sustancia es transparente
- c) La radiación incidente es mayor a la radiación transmitida. La sustancia es translúcida.

La relación entre la radiación transmitida y la radiación incidente se denomina Transmitancia (T). La denominaríamos como la cantidad de radiación que logro pasar a través de una sustancia. El inverso logarítmico de la Transmitancia se

denomina Absorbancia (A). La cual es la radiación absorbida, la cual es la diferencia entre la radiación incidente y la transmitida. Diferentes sustancias por sus diferentes características presentan distinta absorbancia, la cual es utilizada para identificarlas y calcular sus concentraciones (Skoog, 2008).

4.4. Espectroscopía

La espectroscopía estudio y la interpretación de la información que proporcionan los instrumentos para la detección de la estructura de las moléculas así como la presencia o ausencia de ciertos grupos funcionales (Morrison, 2001). La espectroscopía por absorción molecular en la región ultravioleta y visible del espectro se usa ampliamente en la determinación cuantitativa de una gran cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas. Esta se apoya en la radiación electromagnética de la región de longitud de onda de 19 a 800nm.

Esta espectroscopía se basa en la medición de la transmitancia o la absorbancia de soluciones que tienen una longitud de trayectoria de un número definido de uno. Normalmente la concentración de un analito absorbente se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer.

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

En la siguiente tabla se explican los términos.

Tabla 9 Términos de la Ley de Beer

| Término y símbolo | Definición |
|---|---|
| Potencia radiante incidente P_0 | Radiación en watts que incide en la muestra |
| Potencia radiante transmitida. P | Radiación que transite la muestra |
| Absorbancia. A | $\log \frac{P_0}{P}$ |
| Transmitancia. T | $\frac{P}{P_0}$ |
| Longitud de la trayectoria de la muestra. B | Longitud de la celda. |
| Concentración del analito. C | Concentración. |
| Absortividad | A/bc |

(Skoog, 2008).

Las limitaciones de la ley de Beer tienen que ver con las concentraciones, debido a que a altas concentraciones, el grado de las interacciones soluto-solvente, soluto-soluto o los puentes de hidrogeno pueden afectar el ambiente del analito y su capacidad de absorción. Aunque el efecto de las interacciones moleculares no es importante a concentraciones inferiores a 0.01 M, aparecen algunas excepciones entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes (Skoog, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El café contiene compuestos fenólicos y antioxidantes, además de tocoferoles, resveratrol y tocotrienoles, los cuales tienen una alta capacidad reductora. Sin embargo; en los procesos de tostado de café verde y obtención de licores y productos derivados (café instantáneo en polvo) los antioxidantes pueden presentar reacciones químicas que los transforman, potenciando o perdiendo su poder antioxidante. Por ello es necesario hacer un análisis para cuantificar los compuestos fenólicos y antioxidantes totales de muestras de café verde y café sometido a diferentes tratamientos térmicos y discernir la formación, polimerización o degradación de compuestos químicos que se sintetizan o derivan de los procesos. La propuesta de este trabajo está enfocada en, determinar cuál de las muestras y procesos retienen en el café la mayor concentración de antioxidantes. Un producto elaborado con granos de café sin tostar, sería mucho más sano para los seres humanos y contribuiría de mejor manera para su dieta, además de que se reducirían costos enormemente al utilizar estos granos verdes pues ya no se requeriría de gasto energético para llevar a cabo el tostado. Es necesario demostrar con reacciones químicas y concentración de componentes, que efectivamente el café verde tiene mucho más que aportar a nuestra dieta diaria, puesto que el café tostado contiene menos concentración de compuestos antioxidantes. También se enfocó en tratar de mostrar si es que los compuestos fenólicos y antioxidantes totales contenidos en el café se van perdiendo durante los procesos de torrefacción. Así como los cambios que van ocurriendo en el café y en los compuestos que se forman y cuales se pierden. Además de identificar como las variables de tiempo de tostado y temperatura de tostado afecta a las concentraciones de los compuestos de interés.. Este trabajo a futuro será la base para el tratamiento de una mejor forma de producir y vender el café verde. Darle una razón de peso al consumidor para optar por la opción de los granos de café sin procesar, tener un producto de mejor calidad, un producto de menor coste. Este trabajo también ayudara a verificar la calidad de este café comparándolo con los resultados de otros estudios.

3. HIPÓTESIS

Las muestras de café verde contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos, antioxidantes y taninos que el café tostado, variando considerablemente la cantidad de los mismos en función de las variables involucradas en el proceso.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

- Determinar la concentración de compuestos fenólicos y antioxidantes presentes en las muestras de café verde y café tostado.

4.2. Objetivos específicos:

- Determinar la concentración de compuestos fenólicos totales y antioxidantes de café verde.
- Determinar la concentración de compuestos fenólicos totales y antioxidantes de café verde sometido a diferentes temperaturas y tiempos de tostado.
- Comparar la concentración de compuestos fenólicos totales y antioxidantes de café tostado en laboratorio, en comparación con café tostado obtenido industrialmente.
- Discernir la síntesis y degradación de compuestos químicos formados durante el proceso de tostado de café verde a través del estudio de reacciones químicas ya conocidas.
- Proponer los posibles mecanismos de reacción de compuestos químicos orgánicos formados durante el proceso de tostado del café verde.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Las muestras utilizadas fueron de la variedad: *Coffeaa arábica*, subvariedad típica, las muestras fueron proporcionadas por Rancho Escondido, Ubicado en la localidad San Marcos de León, En el municipio de Xico, Estado de Veracruz

Se utilizaron dos muestras diferentes de la *Coffeaa arábica*, café verde y tostado, la única diferencia entre ellas es el proceso de tostado.

Café Verde: La muestra se corta de la mata, se descascara, se pasa por una máquina despulpadora, la cual desprende la cáscara del café. Las semillas del café se separan, El café despulpado cae en tanques de fermentación, proceso dura de 12 a 72 horas, dependiendo de las condiciones climáticas. A continuación se lava y se seca, La muestra se almacena en costales de fibra natural sobre tarimas de madera. Posteriormente se quita la cubierta y el café se pule.

5.2. Métodos

5.2.1 Tratamiento térmico de muestras de café

Café tostado: la muestra es el resultado de tostar el café verde. Se realiza usando torrefactores de mantenedor, barriles recubiertos de acero inoxidable calentados con flama directa. Las temperaturas de tueste van de los 190 a los 280 grados centígrados o hasta 320°C para un tueste alto. El tiempo va de 20 a 60 min.

Posteriormente fueron pulverizadas en un molino Pulvex y se almacenaron lejos de la luz y al vacío antes de someterlas a los siguientes procedimientos.

5.2.2. Extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes de muestras de café

a) Método de extracción I

Se tomaron 0.50g de muestra (con tres cifras significativas en la medición) de café verde y posteriormente se le adicionaron 20mL de etanol. La mezcla se agito y se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se tomaron 0.1mL del extracto y se colocaron en un vial ámbar hasta la determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

b) Método de extracción II

Se pesaron nuevamente tres muestras de café verde y tostado y se les adicionaron 20mL de etanol. Las muestras se dejaron reposar 30 minutos y posteriormente se filtraron (solución madre). Del líquido filtrado se tomaron 0.1mL de cada una de ellas y se colocaron respectivamente en viales ámbar. Se prepararon muestras adicionales, tomando 0.05mL de solución madre y también se colocaron respectivamente en viales ámbar hasta la determinación de compuestos fenólicos totales y antioxidantes.

c) Método de extracción III

De la misma forma que en el experimento anterior se tomaron muestras de ambos cafés y se les adicionaron 20mL de etanol. En este experimento se dejó reposar las muestras en el etanol por 24h, posteriormente se filtraron y se colocaron en vasos de precipitado. Se tomaron 0.1mL de cada uno de los vasos de precipitados y se colocaron en viales ámbar hasta su determinación de contenido de compuestos fenólicos totales y antioxidantes.

5.2.3. Determinación de compuestos fenólicos totales (método de Folin-Ciocalteu).

a) Preparación de la solución de reactivo de Folin Ciocalteu

Se tomaron 0.5mL del reactivo de Folin (Hycel, S. A de C.V, México) y se llevó a un volumen de 4.5mL con agua destilada dando como resultado una solución diluida (FD). Este procedimiento se repitió para preparar las soluciones FD en cada una de las determinaciones realizadas para este trabajo. Se tomó una alícuota de cada extracto realizado de acuerdo a lo que se indica en el apartado 6.2.2. y se adicionaron 0.75mL de solución FD, se dejó reposar 5 minutos. Una vez terminado el reposo se le adicionó 0.75mL de NaHCO_3 , se agitó y se dejó reposar durante 90 minutos (tiempo en el que se lleva a cabo la reacción). La absorbancia de las muestras se determinó en un espectrofotómetro de UV-Vis (Científica Vela Quin, VW 5600UV, AIII2001, México). (Se colocó el aparato a 750nm y se ajustó a cero con la solución FD). Este procedimiento se llevó a cabo en todas las muestras para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales en alícuotas de extractos de café verde y tostado. Los datos fueron ajustados a una curva de calibración de ácido gálico como se muestra en el anexo 1

5.2.4. Determinación de capacidad antioxidante por el método del radical ABTS

Se pesaron exactamente 0.0065g de persulfato de potasio en un vial ámbar y se adicionaron 0.0384g de ABTS (Sigma, S. A de C.V, E.U.A.). Posteriormente se adicionaron 10mL de agua. La solución preparada y se dejó reposar 24 horas en refrigeración constante ($5\pm 1^\circ\text{C}$). Posteriormente se tomaron 0.5mL de la solución anterior y se aforó a un volumen de 25mL con etanol anhidro (solución madre). De la solución madre se tomaron 1.98mL y se colocaron en una celda de cuarzo. Una alícuota de cada una de las muestras preparadas mediante los métodos de extracción I, II y III y la absorbancia de las muestras se determinó a 734nm en un espectrofotómetro de UV-Vis (Científica Vela Quin, VW 5600UV, AIII2001, México).

Previamente a la determinación, la solución madre se ajustó hasta obtener una absorbancia constante (0.700 ± 0.02) por lo menos hasta 7 minutos. A los datos obtenidos de cada una de las muestras se restó el efecto del etanol en la solución madre, y se consideró para los cálculos, sin embargo este no fue significativo. (Los resultados de estos experimentos se muestran en la siguiente tabla). Cabe mencionar que los datos obtenidos fueron ajustados a una curva de calibración de Trolox, que se encuentra en el anexo 2.

Tabla 10 Comprobación de la estabilidad de la solución madre y absorbancia de la solución madre con etanol.

| <i>Absorbancia Solución Madre (nm)</i> | <i>Tiempo (minutos)</i> | <i>Absorbancia de la solución madre + etanol (nm)</i> |
|---|--------------------------------|--|
| 0.719 | 0 | 0.716 |
| 0.719 | 1 | 0.714 |
| 0.720 | 2 | 0.716 |
| 0.717 | 3 | 0.713 |
| 0.716 | 4 | 0.710 |
| 0.717 | 5 | 0.709 |
| 0.716 | 6 | 0.706 |
| 0.716 | 7 | 0.707 |

5.2.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.

Se pesaron 0.0025mg del reactivo de DPPH y se aforó hasta 100mL con metanol (Solución DPPH). A 3.9mL de solución DPPH se le adicionaron 0.05mL de los extractos obtenidos en el apartado 6.2.2. y la absorbancia se determinó al tiempo inicial y después de 30 minutos de reposo a una absorbancia de 517nm. Cabe mencionar que para los cálculos se consideró el efecto del disolvente de extracción contenido en las muestras. Los datos de absorbancia fueron ajustados a las curvas de calibración que se muestran en el anexo 3.

5.2.6. Determinación de taninos condensados

Se pesaron 10 ± 0.1 g dos muestras de café verde y dos de café tostado. Tratadas de la misma forma que en los procesos descritos en el punto 6.2.2. Se adicionaron 10mL de agua y 10mL de etanol y se le adicionó agua caliente a 60°C. Este método se realizó de acuerdo a una variación del Método de Stiasny (Rosales, 2003).

Debido a que la temperatura puede ser la causa de la degradación de Taninos se realizó un segundo experimento donde en lugar de agua caliente se utilizó agua a temperatura ambiente.

5.2.7. Estudio de la influencia del tiempo y temperatura en el proceso de tostado

Con la finalidad de describir de qué manera influye la temperatura, así como el tiempo a los que se expone el café en el proceso de tostado, se llevaron a cabo pruebas con temperaturas del horno de 100, 150, 180, 200, 250 y 300°C y se llevaron a cabo pruebas con tiempo en el horno de 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos. En el primer experimento, se sometieron las muestras a una temperatura variable, manteniendo el tiempo constante, mientras que en el segundo, se mantuvo constante la temperatura y el tiempo de exposición de la muestra a la temperatura fue variable.

a) Ensayo de tiempo variable, y temperatura constante

Se tomaron muestras de café verde, se registraron los pesos y posteriormente se colocaron en un horno de convección (San Son, Convection Plus HCXI, México) a una temperatura de 150°C. Cada 30 minutos se retiró una muestra del horno y se almacenó en bolsas herméticas hasta su posterior análisis. Las muestras se extrajeron de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 6.2.2. y se analizaron respecto a su contenido en compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante y taninos.

b) Ensayo de temperatura variable

Se tomaron muestras del café verde, se registraron los pesos y se colocó cada muestra a una temperatura diferente por 30 minutos, en intervalos de 100 a 300°C (100, 150, 180, 200, 250, 300°C). Las muestras se extrajeron con etanol y se dejaron reposar 24 horas. Posteriormente se realizaron los análisis correspondientes a contenido de compuestos fenólicos totales, antioxidantes y taninos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu

a) Resultados de compuestos fenólicos extraídos por el método I

Los resultados del experimento I se presentan en la tabla 11

Tabla 11 Absorbancias encontradas por método de Folin-Ciocalteu, Experimento I

| Ensayo | Muestra | Absorbancia |
|--------|--------------|-------------|
| 1 | Café Verde | 1.68 |
| 2 | Café Verde | 1.586 |
| 3 | Café Tostado | 0.833 |
| 4 | Café Tostado | 0.664 |

Como se puede observar, la concentración de compuestos fenólicos totales excedía el valor de 1, por lo que no cumplía con la ley de Beer, las muestras no fueron filtradas y contenían además una alta concentración en compuestos, los sólidos dispersos no permitieron una determinación adecuada. Por lo tanto, se procedió a modificar el método de extracción, sin embargo; de este experimento se puede apreciar claramente que existe una diferencia importante en las concentraciones de compuestos fenólicos que presentan del café verde con respecto al café tostado el cual fue sometido a calentamiento que va de los 190 a los 280 grados centígrados El tiempo va de 20 a 60 min. Esto se debe que al encontrarse una concentración de compuestos fenólicos mayor en la muestra, reducen totalmente al reactivo de Folin, el cual en su forma reducida presenta una absorbancia de mayor intensidad (García, 2003).

b) Resultados de compuestos fenólicos extraídos por el método II

En la tabla 11 se presentan los resultados de concentración de compuestos fenólicos totales con los extractos obtenidos por el método de extracción II, utilizando 0.1mL del extracto.

Tabla 12 Concentración de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu

| Muestras 0.1ml | mg de ácido gálico (AG) | Concentración mg de ácido gálico (AG) /g de café | Desviación Estándar | Muestras 0.05mL | mg de ácido gálico (AG) | Concentración mg de ácido gálico (AG)/g de café | Desviación Estándar |
|-------------------|-------------------------|--|---------------------|-------------------|-------------------------|---|---------------------|
| V1 | 2.288 | 91.53 | 7.18 | V1 | 1.37 | 54.83 | 3.08 |
| V2 | 1.935 | 78.14 | 7.18 | V2 | 1.29 | 51.69 | 3.08 |
| V3 | 2.333 | 89.35 | 7.18 | V3 | 1.20 | 48.66 | 3.08 |
| T1 | 1.564 | 62.58 | 7.47 | T1 | 1.27 | 50.96 | 4.46 |
| T2 | 1.889 | 75.56 | 7.47 | T2 | 1.30 | 52.25 | 4.46 |
| T3 | 1.566 | 62.66 | 7.47 | T3 | 1.09 | 43.95 | 4.46 |
| Promedio V | 2.185 | 86.34 | 7.18 | Promedio V | 1.28 | 51.72 | 3.08 |
| Promedio T | 1.673 | 66.93 | 7.47 | Promedio T | 1.22 | 49.05 | 4.46 |

V: muestras de café verde

T: muestras de café tostado

A.G: Ácido Gálico

En este experimento se puede observar que las muestras filtradas presentaron valores menores de absorbancia, en comparación con el método de extracción I. Esto indica que los remanentes de sólidos eran los que alteraban los resultados de manera significativa.

Comparando los resultados de las muestras de 0.1 y 0.05 se observa que la concentración de mg de AG en promedio es la mitad del otro.

En las muestras de 0.1mL de las muestras de café verde en promedio presentan 20mg de AG /g de café más que los del café tostado.

En todos los casos se observa que el café verde tiene una mayor concentración de compuestos fenólicos que el tostado.

Experimento III

Nuevamente se observa que las muestras de café verde presentan valores más altos, en comparación con las de café tostado, con una diferencia de 20mg de A. G/g de café.

Tabla 13 Resultados de concentración Método Folin-Ciocalteu, Experimento III.

| Muestra 0.1ml | mg Ag | Concentración mg Ag/g de café | Muestras 0.05ml | mg Ag | Concentración mg Ag/g de café |
|-----------------------------|--------------|--|-----------------------------|--------------|--|
| Verde1 | 2.316 | 92.66 | Verde1 | 0.997 | 39.91 |
| Verde2 | 2.153 | 86.12 | Verde2 | 1.225 | 49.03 |
| Verde3 | 2.296 | 91.85 | Verde3 | 1.1 | 44.03 |
| Tostado1 | 1.519 | 60.56 | Tostado1 | 0.762 | 30.48 |
| Tostado2 | 1.52 | 60.8 | Tostado2 | 0.731 | 29.27 |
| Tostado3 | 2.153 | 86.12 | Tostado3 | 0.758 | 30.32 |
| Promedio Verde | 2.255 | 90.21 | Promedio Verde | 1.107 | 44.32 |
| Promedio Tostado | 1.730 | 69.16 | Promedio Tostado | 0.750 | 30.02 |

A continuación se muestra una tabla que recopila los promedios del experimento II y III.

Tabla 14 Resultados generales del método Folin-Ciocalteu.

| Muestras | Concentración compuestos fenólicos / gramos de café | Molaridad | %de Fenólicos en muestra. | Desviación estándar. |
|---------------------------|--|------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| II, Verde, 0.1 | 86.34 | 21.58 | 8.63 | 2.00 |
| II, Tostado, 0.1 | 66.93 | 16.67 | 6.69 | 4.51 |
| II, Verde, 0.05 | 51.52 | 25.75 | 8.46 | 2.00 |
| II, Tostado, 0.05 | 49.05 | 24.88 | 6.00 | 4.51 |
| III, Verde, 0.1 | 90.21 | 22.53 | 9.02 | 2.00 |
| III, Tostado, 0.1 | 69.16 | 16.10 | 6.91 | 4.51 |
| III, Verde, 0.05 | 44.32 | 21.46 | 8.86 | 2.00 |
| III, Tostado, 0.05 | 30.02 | 15.06 | 6.00 | 4.51 |

El porcentaje de compuestos fenólicos en las muestras de café verde determinados experimentalmente, son similares con los reportados en la literatura (Farah, 2006), mientras que si comparamos la concentración de compuestos fenólicos en mg nos damos cuenta que esta muestra de café verde contiene similar concentración de compuestos fenólicos (Vitalione, 2012). Aunque otros estudios reportan que hay menor concentración de compuestos encontrados en este estudio (Margarita, 2013). Si comparamos la concentración de compuestos fenólicos del café tostado con los reportados en la literatura (Vitaglione, 2012), observamos que tiene el doble de concentración. Comparando la concentración de compuestos fenólicos en ambas muestras, observamos que las muestras de café verde presentan un 2% más de compuesto fenólicos por gramo de muestra que las muestras de café tostado, en casi 20 mg más. Esto nos indica dos posibilidades; que estos compuestos fenólicos se transforman por oxidación a quinonas; o bien en melanoidinas por medio de la reacción de Maillard.

6.2. Resultados de actividad antioxidante por el radical ABTS

Para la determinación de actividad antioxidante por el método de actividad antioxidante del radical ABTS, se utilizó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de inhibición de los compuestos, mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Ast_0 - Ast_f}{Ast_0 - \left(\frac{Adt_0 - Adt_f}{Adt_0} \right)} \right) \times 100$$

Dónde:

Ast_0 y Ast_f Es la absorbancia de la muestra a tiempo inicial y final respectivamente.

Adt_0 y Adt_f Es la absorbancia del disolvente a tiempo inicial y final. En este trabajo estos valores son de Etanol anhidro, los valores correspondientes son $Adt_0 = 0.716$ y $Adt_f = 0.707$

Tabla 15 Resultados de actividad antioxidante por el método ABTS

| Muestra | %Inhibición | mM de Trolox | mM trolox/g de café | Desviación Estándar |
|------------------|-------------|--------------|---------------------|---------------------|
| Verde1 | 29.53 | 6.36 | 254.70 | 1.24 |
| Verde2 | 29.79 | 6.42 | 257.02 | 1.24 |
| Verde3 | 32.29 | 6.98 | 279.33 | 1.24 |
| Tostado1 | 15.36 | 3.20 | 128.30 | 1.93 |
| Tostado2 | 11.83 | 2.42 | 96.81 | 1.93 |
| Tostado3 | 16.35 | 3.42 | 137.13 | 1.93 |
| Promedio Verde | 30.53 | 6.59 | 263.62 | 1.24 |
| Promedio Tostado | 14.51 | 3.01 | 120.71 | 1.93 |

En la tabla 12 se muestran los resultados de actividad antioxidante por el radical ABTS. Los resultados se expresan en mmoles de Trolox, ya que se utilizó una gráfica de mmoles de trolos contra porcentaje de inhibición (Anexo 2) para calcular las concentraciones.

Las concentración de antioxidantes en las muestras de café verde concuerdan con lo reportado en la bibliografía (Margarita, 2012). La capacidad antioxidante de las muestras de café verde son en promedio más del doble de la que presentan las muestras de café tostado. Esto es un indicador de que al término del proceso del tostado se perdieron compuestos con capacidad antioxidante, esto mayormente debido a la reacción de Maillard y a las degradaciones que sufren los compuestos con capacidades antioxidantes, los cuales se degradan para convertirse en melanoidinas y en caso de que las condiciones de tostado sean muy severas se convierten en productos derivados de la degradación de azúcar y posteriormente en productos de una pirolisis.

La metodología para determinar la capacidad antioxidante por este método se basa en el ensayo ABTS o protocolo TEAC, el cual se basa en que una muestra reaccione con el ABTS. (Vitaly, 2005).

6.3 Resultados de actividad antioxidante por el método de DPPH

En la tabla 16 se muestran los resultados de actividad antioxidante por el método de DPPH en café verde y tostado.

Tabla 16 Resultados de actividad antioxidante por el método de DPPH.

| Muestra | Concentración miligramos AC | Concentración mg ácido cítrico/gramos de café | Desviación estándar. |
|-------------------------|------------------------------------|--|-----------------------------|
| Verde1 | 37384.62 | 37.38 | 21.78 |
| Verde2 | 46923.08 | 46.92 | 21.78 |
| Verde3 | 48153.85 | 48.15 | 21.78 |
| Tostado1 | 17384.62 | 17.38 | 9.41 |
| Tostado2 | 20153.85 | 20.15 | 9.41 |
| Tostado3 | 18000 | 18 | 9.41 |
| Promedio Verde | 44153.85 | 44.15 | 21.78 |
| Promedio Tostado | 18512.82 | 18.51 | 9.41 |

Del experimento anterior se observa que la capacidad antioxidante de la muestra del café verde es mucho mayor que la del café tostado. Estos resultados nos indican que el proceso de tostado al cual fue sometida la muestra de café tostado provocó que la capacidad antioxidante disminuyera. Si analizamos el porcentaje en promedio de la muestra que se obtuvo de este experimento en el café verde y la comparamos con el porcentaje que se obtuvo en el método de Folin (Tabla 15) se observa que el porcentaje es casi el mismo, lo cual indica que son los compuestos fenólicos los responsables de la capacidad antioxidante de la muestra. Sin embargo si comparamos los porcentajes del promedio de la muestra del café tostado de este experimento con los de Folin (Tabla 17). Observamos que existe una diferencia de 2.8%. Las observaciones anteriores nos indican que en un inicio la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos son los mismos, pero una vez terminado el proceso del tueste estos compuestos presentan varias transformaciones como son la oxidación del anillo aromático y las reacciones de Maillard. Estos procesos ocurren paralelamente y una prueba de ello es la diferencia en capacidad antioxidante y compuestos fenólicos después del tueste.

Debido a que las reacciones de Maillard como se ve en la figura 38 dejan intacto el anillo aromático, Es la oxidación de los compuestos fenólicos lo que transforma este anillo. Esto significa que los productos de las reacciones de Maillard, no afectan la concentración de compuestos fenólicos, sin embargo si cambia la concentración de compuestos con capacidad antioxidante.

6.4 Resultados del ensayo de taninos condensables

En la tabla 17 se muestran los resultados de tantinos en las muestras de café verde y tostado. Se calculó los miligramos de Taninos por gramo de café (De acuerdo al anexo 4).

Tabla 17 Determinación de Taninos, Resultados Generales.

| Muestra | Gramos de taninos en la muestra | mg Taninos / g. de café | % de Taninos en Muestra |
|--------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| Verde con calor | 0.1986 | 19.86 | 1.986 |
| Tostado con calor | 0.0058 | 0.58 | 0.058 |
| Verde sin calor | 0.1366 | 13.66 | 1.366 |
| Tostado sin calor | 0.0774 | 7.74 | 0.774 |

Se observó que las muestras con las reacciones cambiaron de color rápidamente a una coloración más pálida.

De los resultados en la tabla anterior se observa que el porcentaje de taninos en la muestra está dentro del promedio establecido por la literatura (Del 0.8-2.8%, Rojas, 2003). La diferencia que existe entre los taninos en la muestra de café verde y tostado es mayor en todos los experimentos, esto se explica de la siguiente manera: los taninos presentes en el café son compuestos grandes formados de más de tres unidades de ácidos clorogénicos por lo que estos compuestos se degradan fácilmente en las unidades correspondientes de ácidos clorogénicos. De ahí pierden su identidad como taninos, los taninos se van degradando por la oxidación de los anillos aromáticos en su estructura para formar una quinona y dos equivalentes de compuestos fenólicos.

Se observa también que el uso de agua caliente como medio de extracción aumenta la concentración de taninos en gran medida. El calor provoca que los ácidos clorogénicos sencillos comiencen a polimerizarse y generar mayor cantidad de taninos (Farah, 2006).

En contraste con el café tostado el calor del agua para su extracción en esta muestra mostró un decremento en la concentración de taninos, lo que indica (respaldado por los resultados de Folin, Tabla 14) que los taninos en el café verde y en el tostado no son los mismos, además de que la cantidad de compuestos fenólicos libres ya no es alta por lo que, si bien existe el calor necesario para la extracción ya no existen los compuestos para formar más taninos y los pocos que se encontraban aun presentes fueron degradados por este mismo calor.

6.5. Efecto del tiempo y temperatura en el proceso de tostado en los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

En la figura 21 se observan las muestras de café verde sometidas a diferentes tratamientos de tostado del café verde.



Figura 21 Fotografía de las muestras a diferentes tiempos en el horno, empezando en la izquierda superior avanzando hacia la derecha, muestra 100, 150, 180, 200,250 Y 300°C respectivamente.

De las muestras sometidas a diferentes temperatura se pueden apreciar los cambios de color que van ocurriendo conforme la temperatura aumenta, este cambio de color es debido a la generación de melanoidinas producidos por la reacción de Maillard, dicho cambio inicia a partir de la segunda muestra (150°C), posteriormente se observa que conforme se eleva la temperatura, el color se intensifica hasta convertirse en un color negro intenso (a 250°C) y finalmente comienza la aparición de cenizas las cuales muestran pirolisis.

a) Efecto del tiempo en la concentración de compuestos fenólicos totales

De la misma forma que en la parte anterior de este trabajo para calcular las concentraciones de los compuestos fenólicos se utilizó una curva de ácido gálico y el mismo procedimiento, de lo cual se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 18 Concentración de compuestos fenólicos totales a diferentes tiempos de horneado de café verde

| Tiempo (minutos en el horno) | mg de A.G. / gramos de café | %de Fenólicos en la muestra. |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 90 | 93.14 | 9.31451613 |
| 120 | 86.37 | 8.63709677 |
| 150 | 83.70 | 8.37096774 |
| 180 | 81.85 | 8.18548387 |
| 210 | 81.29 | 8.12903226 |
| 240 | 78.54 | 7.85483871 |

Se graficaron los resultados contra los ya obtenidos.

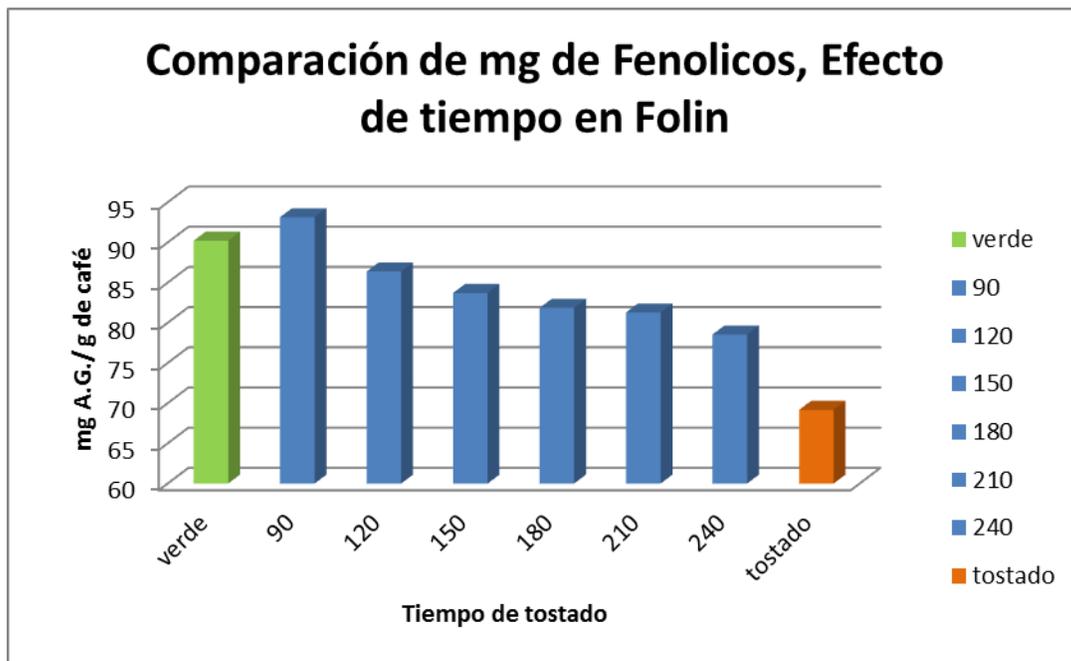


Figura 22 Comparación de mg de fenólicos, Efecto de tiempo en Folin,

En la figura anterior se muestra un ligero aumento en la concentración de compuestos fenólicos en el minuto 90, esto indica que a esta temperatura no

existe degradación de compuestos fenólicos por el contrario podrían estarse sintetizando nuevos componentes lo cual aumenta su potencial antioxidante, esto indica que este tiempo de tratamiento durante el proceso de tostado en el horno promovió no solo la síntesis de compuestos, si no la migración de estos fenólicos hacia el disolvente de extracción. En el tratamiento efectuado a temperatura de 120°C comienza la degradación de los compuestos fenólicos, esta degradación es constante. Lo que indica que una temperatura de 100°C con el paso del tiempo logra la perdida de los compuestos fenólicos de forma semi-lineal.

También podemos observar que el café tostado (barra anaranjada) cuyo calor fue aplicado por el tratamiento descrito en el apartado 6.2.1 tiene una cantidad mucho menor de compuestos fenólicos totales que todas las muestras tratadas en el Horno de convección aun comparada con las muestras que estuvieron mayor tiempo en el horno. Por lo que las condiciones industriales demuestran ser mucho más severas.

b) Efecto de tiempo de tostado en la capacidad antioxidante por medio del método ABTS

En la tabla 20 se muestran los resultados de capacidad antioxidante de las muestras de café verde sometidas a diferente tratamientos térmicos durante 240 minutos.

Tabla 19 Capacidad antioxidante por método ABTS de café verde a diferentes tiempos en el horno.

| Tiempo (minutos en el horno) | %Inhibición | mM de Trolox | mg de Trolox/g de café |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------|
| 90 | 94.97 | 20.96 | 838.55 |
| 120 | 87.46 | 19.28 | 771.49 |
| 150 | 15.77 | 3.29 | 131.96 |
| 180 | 12.92 | 2.66 | 106.55 |
| 210 | 24.46 | 5.23 | 209.48 |
| 240 | 4.06 | 0.68 | 27.56 |

De acuerdo a la figura 24 y a la tabla 19 podemos observar primeramente que la capacidad antioxidante aumenta a los 120°C. Esto corresponde a lo reportado con la literatura la cual indica que la capacidad antioxidante aumenta en el proceso del tostado y posteriormente disminuye (Moreira, 2012). En la figura 24 se observa un gran incremento en la actividad antioxidante a los 90 y 120 minutos comparado con el café verde y como el café tostado contiene mayor cantidad de capacidad antioxidante que las muestras al tiempo 240 minutos.

Este aumento de actividad antioxidante nos indica que existe transformación de compuestos, es debido a la formación de melanoidinas lo que explica el aumento en la actividad antioxidante, pues estas presentan capacidad antioxidante. Este efecto también se debe en parte a la formación de lactonas y la isomerización de los ácidos Clorogénicos, pues a estas temperaturas es posible la formación de dichos compuestos, los cuales son más estables que sus predecesores por lo que son más resistentes a la degradación. Posteriormente existe una caída en la gráfica, que correspondería con el término de formación de las lactonas y melanoidinas y comienza con la síntesis de productos de peso molecular bajo debido a las reacciones de Maillard (Yrhjo, 2017).

Al tiempo de 200 minutos existe un ligero incremento de la capacidad antioxidante, el cual nuevamente es explicado por la formación de melanoidinas de mayor tamaño y por productos de cadena sencilla de la reacción de Maillard los cuales si bien ya no son compuestos fenólicos si presentan actividad antioxidante. Finalmente existe una caída en la actividad antioxidante.

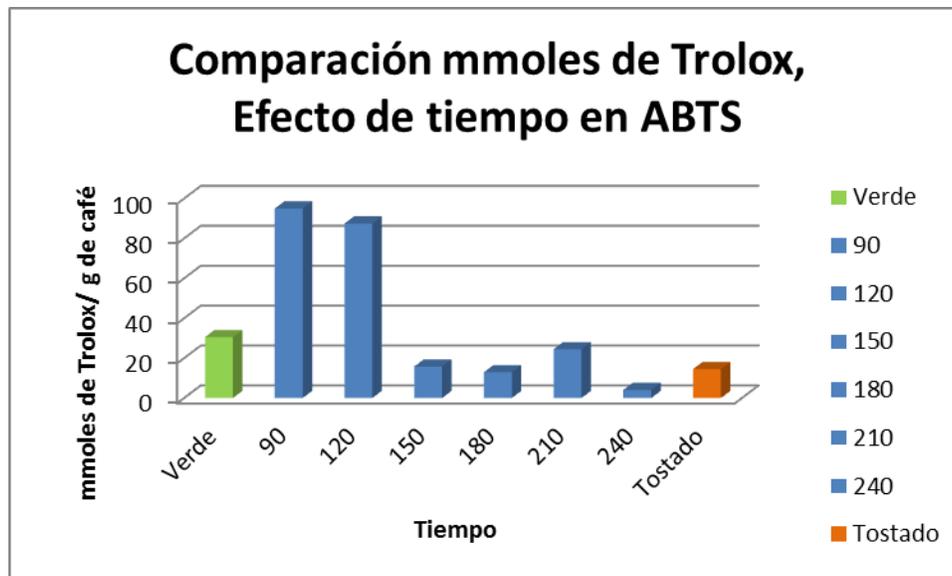


Figura 23 Comparación de mg, Efecto de tiempo en ABTS

Se observa de igual manera en la figura 25 que el café tostado (barra anaranjada) cuyo calor fue aplicado por el tratamiento descrito en el apartado 6.2.1 tiene una cantidad de mmoles de Trolox mucho menor a las muestras tratadas en el Horno de convección que presentan el mismo tiempo a exposición con la llama. Lo que muestra que las condiciones fueron mucho más adversas para que exista una concentración de mmoles de Trolox.

c) Efecto de tiempo de tostado de café verde en la capacidad antioxidante por el método DPPH

En la tabla 20 se muestran los datos de capacidad antioxidante de las muestras de café verde tostado a diferentes tiempos, por medio del método DPPH. Los resultados están expresados como mg de ácido cítrico por gramo de café.

Tabla 20 Capacidad antioxidante por método DPPH de café verde a diferentes tiempos en el horno.

| Tiempo (minutos en el horno) | $\mu\text{g A.C.}$ | mg AC/g de café |
|------------------------------|--------------------|-----------------|
| 90 | 59.42 | 47.53 |
| 120 | 78.65 | 62.92 |
| 150 | 42.11 | 33.69 |
| 180 | 72.88 | 58.30 |
| 210 | 60.96 | 48.76 |
| 240 | 15.96 | 12.76 |

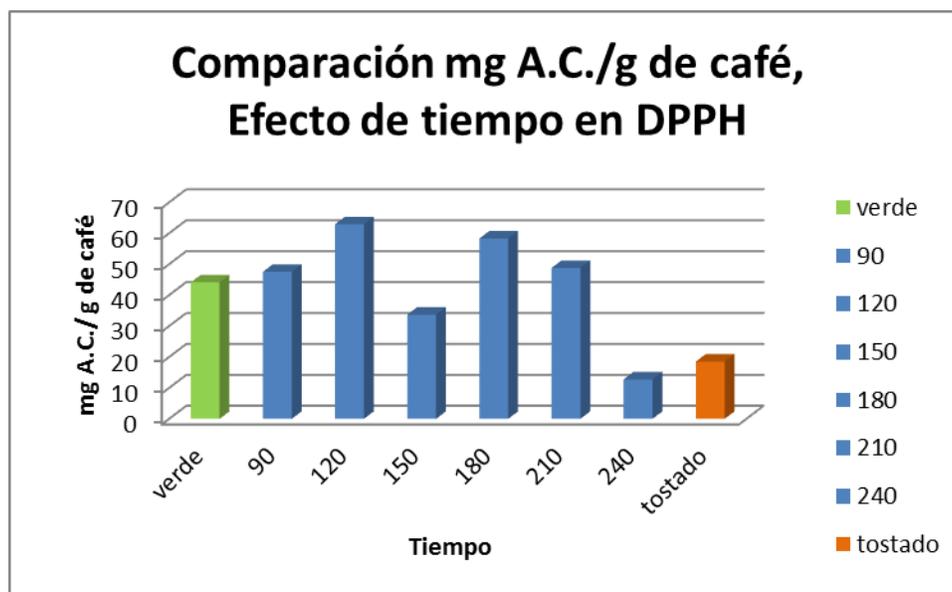


Figura 24 Comparación de mg A.C./ g de café, Efecto de tiempo en DPPH

Si bien es cierto que ambos métodos determinan actividad antioxidante, los reactivos utilizados en los mismos se comportan de diferente manera esto es debido a que el ABTS reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado independientemente del verdadero potencial oxidativo. De hecho la prueba de ABTS se reduce a la reacción del mismo con grupos aromáticos OH, incluyendo grupos OH, que no contribuyen realmente a la antioxidación.

Mientras que el DPPH es mas selectivo que el ABTS, ya que el DPPH reacciona solo con OH activos y no reacciona con flavonoides (los cuales solo tiene grupos OH en anillos b) ni con ácidos aromáticos que contienen solo un grupo OH. (Vitaly, 2003).

Finalmente se observa que el café tostado (barra anaranjada) cuyo calor fue aplicado por el tratamiento descrito en el apartado 6.2.1 tiene una cantidad de mg de A.C. mucho menor a las muestras tratadas en el Horno de convección que presentan el mismo tiempo a exposición con la llama. Lo que muestra que las condiciones industriales afectan de mayor medida la capacidad antioxidante presentada por este método.

d) Efecto del tiempo de tostado del café verde en la concentración de taninos

En la tabla 22 se muestran los resultados del contenido de taninos en las muestras de café verde tratadas a diferentes tiempos.

Tabla 21 Concentración de taninos en las muestras de café sometidas a diferentes tiempos de tratamiento de tostado

| Tiempo (minutos en el horno) | mg Taninos / g. de café | Porcentaje de taninos en la muestra |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| 90 | 6.8 | 0.68% |
| 120 | 16.5 | 1.65% |
| 150 | 44.2 | 4.42% |
| 180 | 12.1 | 1.21% |
| 210 | 65.8 | 6.58% |
| 240 | 9.9 | 0.99% |

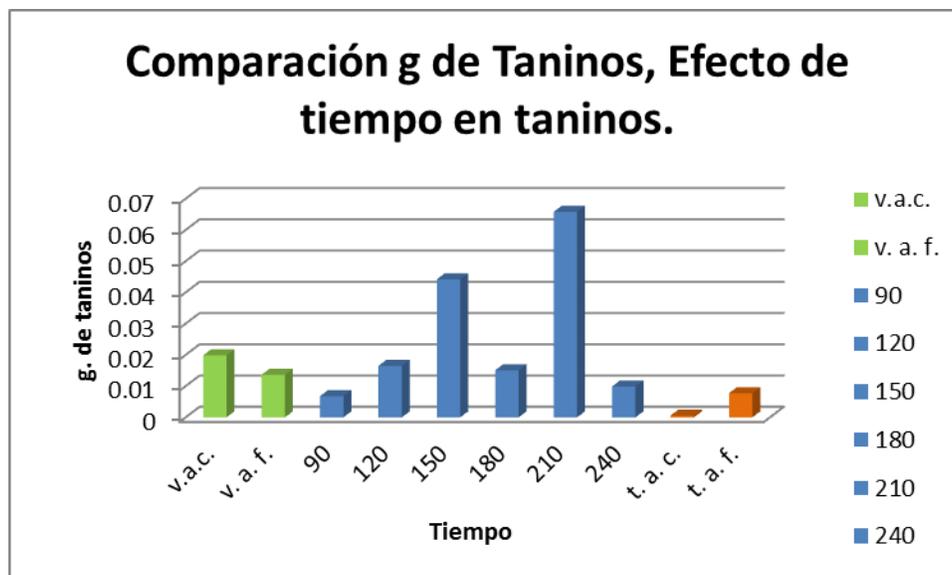


Figura 25 Comparación de mg, Efecto de tiempo en Taninos

En la figura 28 y 29 se observa un aumento en la concentración de taninos hasta el minuto 150. Esto se explica debido a que la temperatura en este punto no es lo suficientemente grande para degradar los taninos, pero es lo suficiente para promover la polimerización de los ácidos clorogénicos libres y formar nuevos taninos. En el minuto 180 se observa una caída lo que sugiere que en este punto la reacción de Maillard ha dado inicio y se comienzan a degradar los taninos en ácidos clorogénicos libres, posteriormente estos compuestos vuelven a polimerizarse pues se nota un aumento en la gráfica, finalmente al minuto 240 se observa una caída esta vez más pronunciada, lo que indica que nuevamente hay reacciones que degradan las moléculas previamente sintetizadas.

e) Efecto de la temperatura de tostado de café verde en la concentración de compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu

En la tabla 22 se observa la concentración de compuestos fenólicos en función de la temperatura de tratamiento.

Tabla 22 Concentración de compuestos fenólicos totales a diferentes temperaturas de horneado de café verde

| Tiempo (minutos en el horno) | Concentración compuestos fenólicos / gramos de café | %de Fenólicos en Muestra. |
|------------------------------|---|---------------------------|
| 100 | 88.95 | 8.89 |
| 150 | 87.50 | 8.75 |
| 180 | 81.85 | 8.18 |
| 200 | 70.24 | 7.02 |
| 250 | 76.69 | 7.66 |
| 300 | 72.66 | 7.26 |

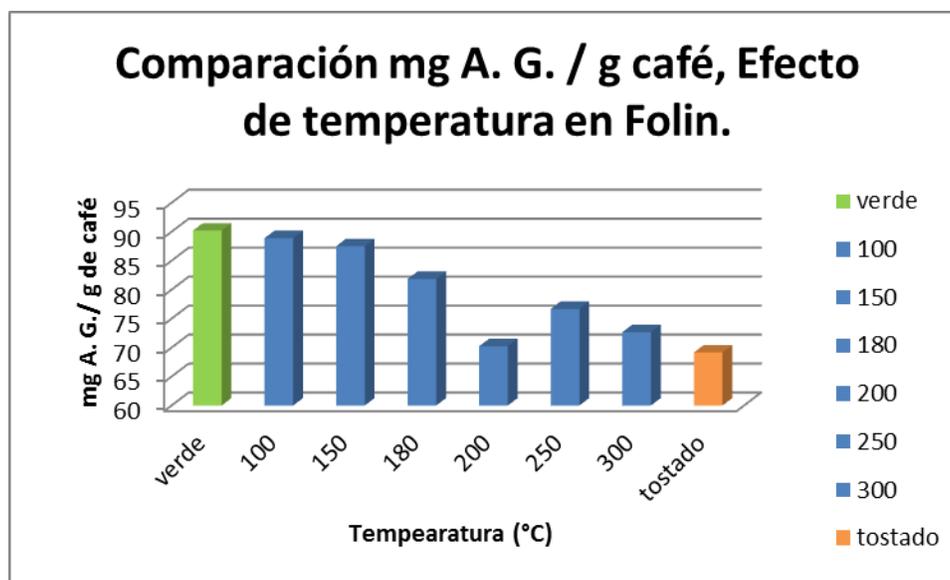


Figura 26 Comparación de mg de fenólicos, Efecto de Temperatura en Folin

En la figura 30 se observa que el efecto que produce la temperatura sobre la concentración de los compuestos fenólicos es relativamente lineal. Esto se explica debido a que los compuestos fenólicos soportan cierta temperatura sin presentar cambios en su estructura molecular. A temperatura de 150°C se observa un ligero incremento a la degradación de los compuestos fenólicos, esto debido a la formación de lactonas a partir de los ácidos clorogénicos. Posteriormente se observa una caída similar al incremento debido a la desaparición de estas lactonas causada por la reacción de Maillard, la cual no ataca al anillo polifenólico, pero sí a las cadenas laterales unidas a este. La aplicación de intervalos de temperatura más alta (por arriba de 200°C) se comienza a degradar los compuestos fenólicos, es decir; comienza una despolimerización de las estructuras, formando otras nuevas que presentan mayor capacidad antioxidante, en comparación con las estructuras nativas. Cuando las muestras se someten a temperaturas por arriba de 250°C nuevamente hay una despolimerización de los componentes.

f) Efecto de la temperatura de tostado en los antioxidantes, determinación por el método del radical ABTS

En la tabla 23 se muestran los datos de capacidad antioxidante de las muestras de café verde sometido a diferentes temperaturas de tostado. En esta se puede observar que a temperatura de tostado de 150°C se presenta el máximo de capacidad antioxidante, esto es debido a que la reacción de Maillard tiene una presencia mucho mayor en las temperaturas de 140-165°C (Maillard, 1912), los productos de la misma son en su mayoría melanoidinas las cuales presentan una actividad antioxidante (Margarita, 2012), y son causantes de que la actividad antioxidante presente su máximo a estas temperaturas (Moreira, 2012). A 180°C (30°C más arriba) inicia un decremento de la capacidad antioxidante, esto podría ser debido a que la temperatura empieza a despolimerizar los compuestos fenólicos y/o antioxidantes contenidos en las muestras de café. A temperaturas bajas (100°C) el café todavía no expone sus compuestos antioxidantes, pues los

compuestos fenólicos están unidos a diferentes componentes, como son proteínas, carbohidratos, etc., y estas interacciones químicas necesitan ser desfragmentadas para que los compuestos antioxidantes puedan detectarse por el método analítico propuesto. Entre las temperaturas 180°C a 200°C, existe una reducción abrupta de la capacidad antioxidante de los compuestos; es decir, los compuestos fenólicos empiezan a degradarse y se ve reflejado en la cuantificación de compuestos antioxidantes, es en este punto cuando la reacción de Maillard deja de ser la principal reacción en la matriz y los subproductos que fueron los ácidos clorogénicos libres y los compuestos de cadena sencilla ya se empiezan a presentar a causa de la degradación. Finalmente a los 250 se encuentra una caída aún más pronunciada, a esta temperatura se detienen todos los procesos de tostado pues es en este momento cuando la pirolisis comienza a manifestarse en gran medida y degrada completamente los compuestos (Kennet, 2001).

A 300°C, la concentración de compuestos con capacidad antioxidante es ya muy baja, en este punto ya es visible la presencia de cenizas en la muestra (Figura 23), esto es; una degradación completa de los compuestos.

Tabla 23 Capacidad antioxidante por método ABTS de café verde a diferentes temperaturas en el horno

| Temperatura del Horno | %Inhibición | mmoles de Trolox | mmoles de Trolox/g de café |
|------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 100 | 3.89 | 0.64 | 25.98 |
| 150 | 8.70 | 1.72 | 68.95 |
| 180 | 6.52 | 1.23 | 49.52 |
| 200 | 4.47 | 0.78 | 31.20 |
| 250 | 3.57 | 0.57 | 23.16 |
| 300 | 1.59 | 0.13 | 5.49 |

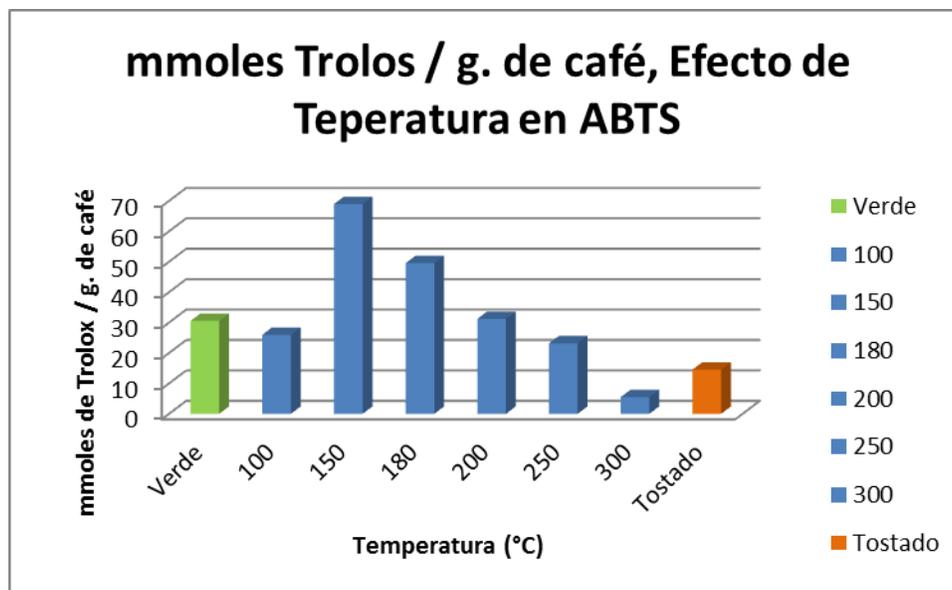


Figura 27 Comparación de mg de, Efecto de Temperatura en ABTS

g) Efecto del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante por el método DPPH

En la tabla 24 se muestran los datos de capacidad antioxidante por el método DPPH, cuando las muestras de café verde se sometieron a procesos de tostado a diferentes temperaturas.

A diferencia del método de determinación por ABTS, en el método DPPH determina solamente grupos OH activos. En este se observa una tendencia diferente, es decir; a medida que la temperatura se incrementa, existe un decremento de la concentración de compuestos antioxidantes.

Tabla 24 Capacidad antioxidante por método DPPH de café verde a diferentes temperaturas en el horno

| Temperatura del Horno | μgAC | mg de AC/g de café |
|-----------------------|-----------|--------------------|
| 100 | 128.653 | 102.923 |
| 150 | 120.961 | 96.769 |
| 180 | 59.807 | 47.846 |
| 200 | 37.500 | 30 |
| 250 | 17.115 | 13.692 |
| 300 | 10.576 | 8.461 |

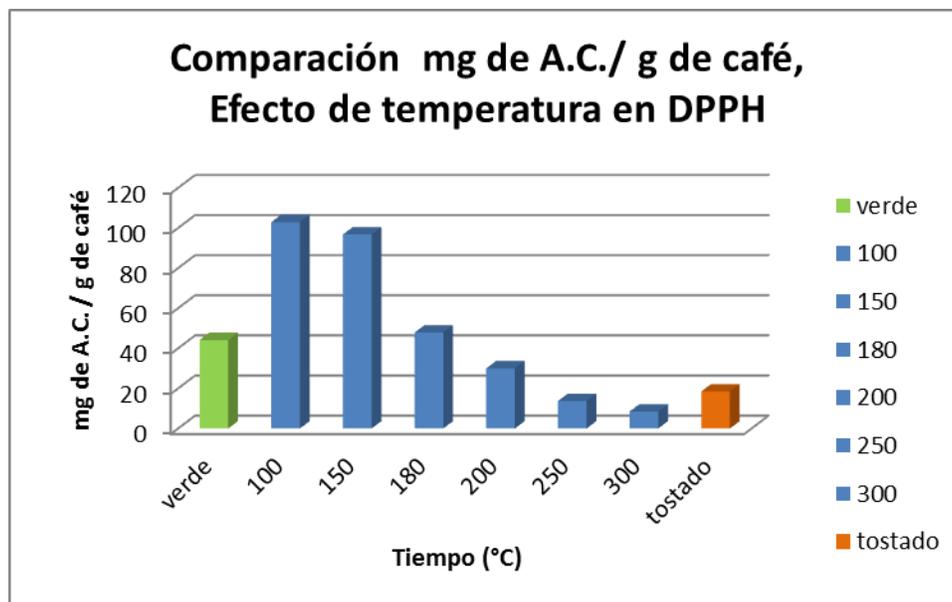


Figura 28 Comparación de mg, Efecto de Temperatura en DPPH

h) Efecto del proceso de tostado en la concentración de taninos

En la tabla 25 se muestra la concentración de taninos en las diferentes muestras de café sometidas a tratamiento térmico. Los taninos representan un grupo de compuestos que a menudo se asocia con el sabor amargo del café

Tabla 25 Concentración de taninos en café verde sometido a diferentes tratamientos térmicos

| Temperatura del Horno | Muestra | Mg Taninos / g. de café | Porcentaje de taninos en la muestra |
|-----------------------|---------|-------------------------|-------------------------------------|
| 100 | 3 | 8.2 | 0.82% |
| 150 | 4 | 10.5 | 1.05% |
| 180 | 5 | 14.7 | 1.47% |
| 200 | 6 | 2.3 | 0.23% |
| 250 | 7 | 1.3 | 0.13% |
| 300 | 8 | 0.01 | 0.00% |

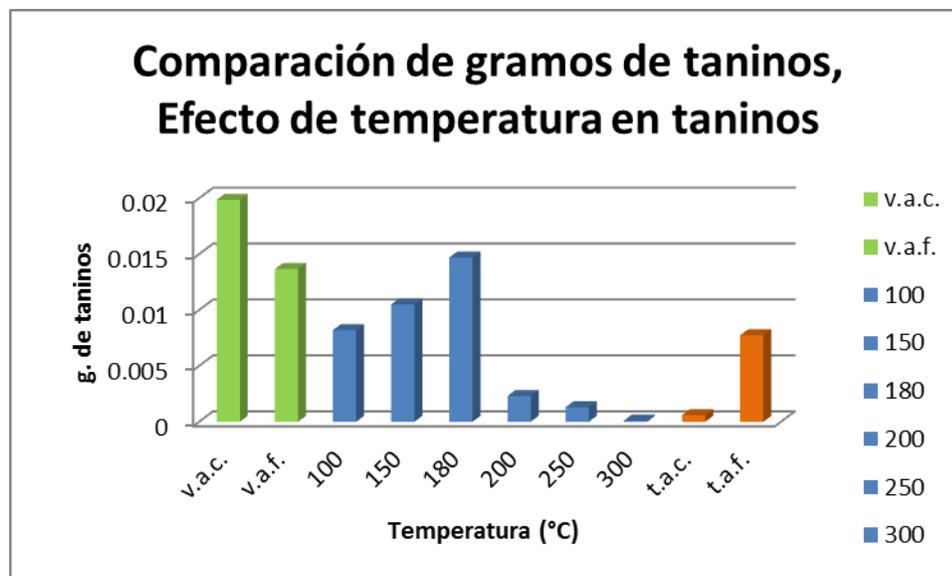
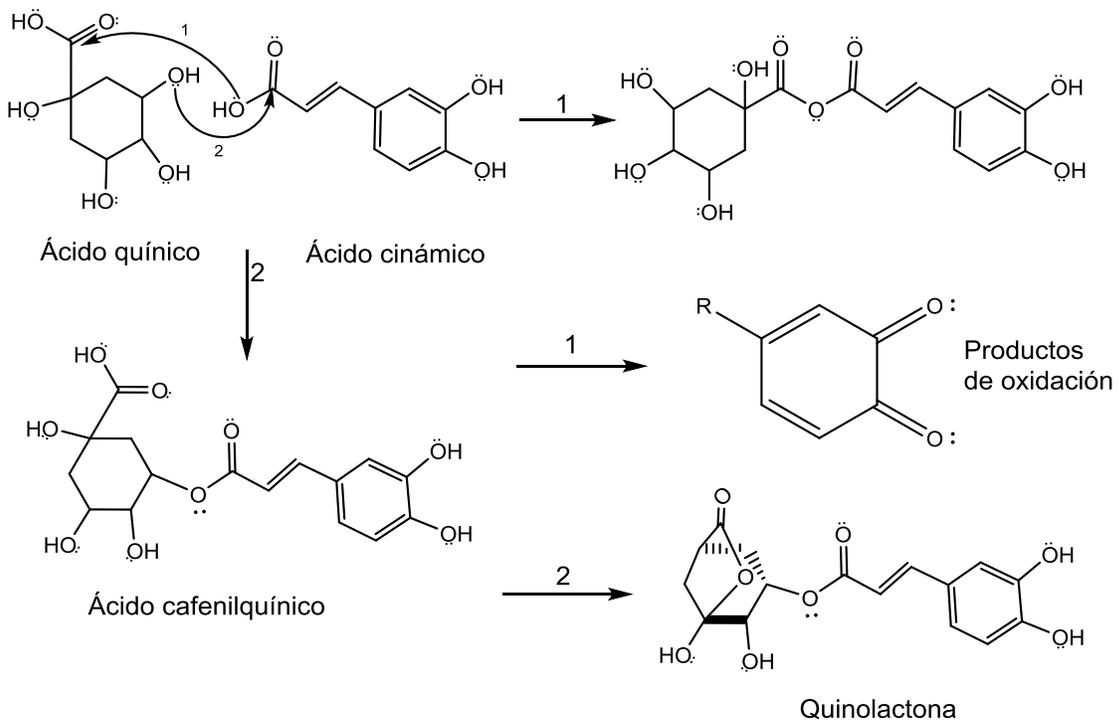


Figura 29 Comparación de mg, Efecto de Temperatura en Taninos

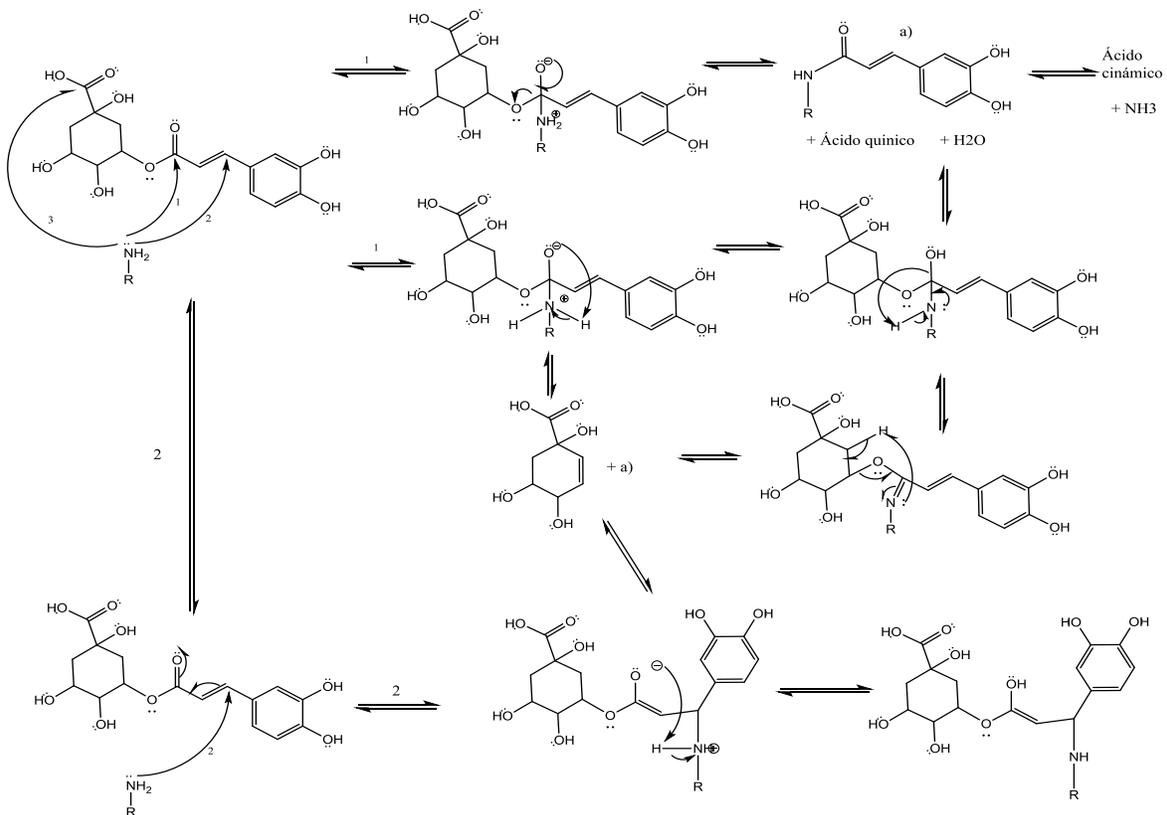
En la figura 38 y 39 podemos observar el efecto que tiene el calor sobre los Taninos que esta tabla nuevamente viene a corroborar que primeramente se tiene un efecto de aumento de taninos. De 100 a 180°C se observa un aumento causado por la polimerización de los compuestos fenólicos libres. La cual se beneficia enormemente de la reacción de Maillard pues unos de sus subproductos son los ácidos Clorogénicos libres y las proteínas libres, las cuales se polimerizan para formar taninos. La tendencia a la alza se detiene abruptamente a los 180°C, lo cual es comprensible pues la reacción de Maillard deja de ser la principal reacción a los 165°C, por lo que a los 180 se observa como los reactivos para la formación de taninos desaparecen y abruptamente todos los taninos se descomponen. La tendencia de descomposición no cambia hacia el final del experimento.

Discusión general del Proceso de tostado y mecanismos de reacción

Durante el proceso de tostado, ocurren diversas reacciones químicas orgánicas de forma simultánea, en donde se sintetizan y degradan diferentes compuestos orgánicos. En la figura 38 se muestran los mecanismos de reacción propuestos en este trabajo, de acuerdo a la reacción del ácido cloragénico, durante el desarrollo de la reacción de Maillard.



3 Reacción de Maillard



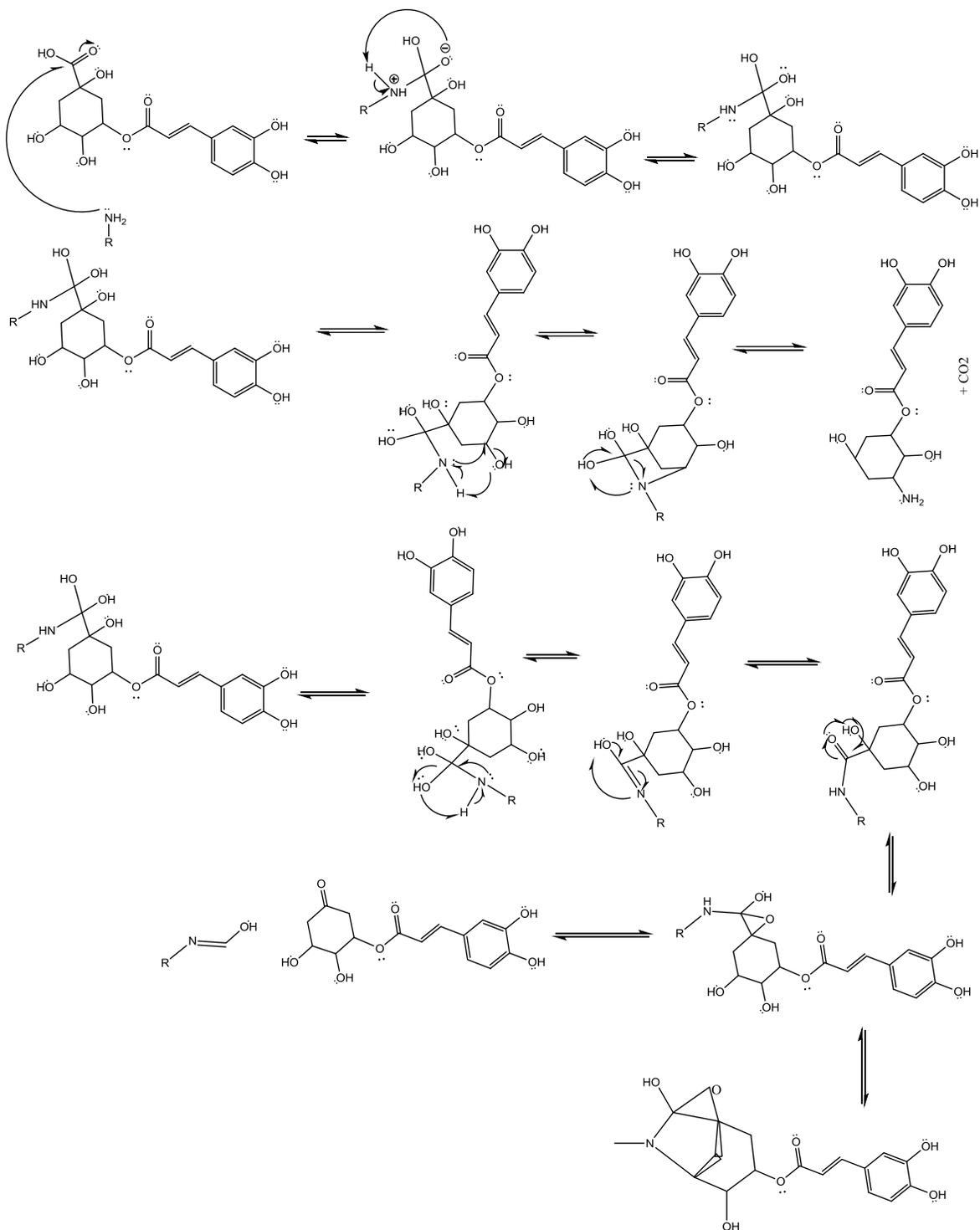


Figura 30 Mecanismos de reacción de ácido clorogénico en el proceso de tostado.

Para poder discutir a fondo los siguientes resultados se elaboro los posibles mecanismos de reacción referentes al principal compuesto fenólico el ácido cafeilquínico.

En la estructura tenemos dos componentes principales que reaccionan ante los compuestos presentes en la matriz, uno de ellos los grupos carbonílicos que principalmente reaccionan ante las aminas para formar reacciones de Maillard reaccionan con los compuestos OH para formar proteínas y compuestos provenientes de la degradación de azúcares. Finalmente las cadenas cortas se oxidan hasta formar CO_2 y agua. El otro grupo es el anillo fenólico el cual esta poderosamente activado por los grupos OH y esto lleva a reacciones de sustitución Electrofílica aromática, y a cambios en los mismo grupo OH. Si bien es correcto que primeramente reaccionan los compuestos carbonílicos por ser reacciones SN_2 , las reacciones de Maillard comienzan a presentarse a los $130^\circ C$, mientras que las oxidaciones se dan en todo momento mientras exista un agente oxidante. En las reacciones de Maillard se observa cómo es que son solamente las cadenas y no el anillo las que se van degradando y modificando, lo cual nos indica que mientras el anillo no sea modificado la actividad aromática y su identidad como compuestos fenólicos no se modifica.

Es entonces las reacciones que sufre el anillo las que modifican la cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se encontró que el café verde sometido a diferentes condiciones (tiempo y temperatura) de tostado reduce su contenido en compuestos fenólicos totales y antioxidantes. La determinación de compuestos fenólicos totales, así como la de antioxidantes por las técnicas de ABTS y DPPH dan tendencias no lineales en el proceso de tostado, esto es debido a la complejidad de la muestra, es decir; mientras se somete a un proceso de tostado, parte de los compuestos se degradan, mientras que al mismo tiempo otros se están sintetizando, por los derivados que genera la reacción. En este trabajo se proponen los mecanismos de reacción por medio de los cuales los compuestos fenólicos se transforman. Cabe mencionar que este estudio nos da pauta para saber que el consumo de infusiones de café verde sería más benéfico para la salud que el café previamente procesado.

7. Referencias

Abuja, P. M., Albertini, R., Esterbauer H. (1998). Simulation of the induction of oxidation of low-density lipoprotein by high copper concentrations: evidence for a nonconstant rate of initiation. The free radical theory of aging matures.

Adriana Farah & Carmen Marino Donangelo. (2006). Phenolic compounds in coffee.

Ana S. P. Moreira, Fernando M. Nunes, M. Rosario Dominguesa & Manuel A. Coimbra. (2012). Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health Impacts.

Castenmiller, J. (2000). Spinach as a source of carotenoids, folate and antioxidant activity. Thesis Wageningen University,

Clifford MN, (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*

Clifford MN. (2003). Hierarchical Scheme for LC-MS n Identification of Chlorogenic acids. *J. Agric. Food. Chem.*

Cilliers, J. J. L.; Singleton, V. L. (1989). Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food. Chem.*

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.*, 1001-1043.

Dai, J., Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Mol*; 7313-7352,

Dejian Huang, Boxin OU, & Ronald L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Food Science and Technology Program, Department of Chemistry, National University of Singapore, Singapore.

Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crauch. . (2008). Principios de Análisis Instrumental. México: Cengage Learning.

Duke JA. Phytochemical and ethnobotanical databases chemicals in: Cofeeaa arábica L. (Rubiaceae) – Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/duke/>. Fecha de acceso.03 de Enero del 2017.

E. K. Bekedam, M. P. F. C. De Laat, (2007). H. A. Schols, M. A. J. S. Van Boekel & G. Smit, *J. Agric. Food Chem*, 55, 761–768.

Edzuan, A. M. Fareez; Aliah, A. M. Noor; Bong, H. L. (2015). Physical and Chemical Property Changes of Coffee Beans during Roasting. *A. J. Chem.*

- Elbs, K., Ueber. (1893). Nitrohydrochinon. *J. Prakt. Chem*, 48, 179.
- F. Hayase, T. Usui and H. Watanabe. (2006). *Mol*
- F. M. Nunes & M. A. Coimbra, (2007) *J. Agric. Food Chem*,
- García Martínez, Eva. (2003). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, ETSIAMN. Universitat Politècnica de València,
- H.-Y. Wang, H. Qian and W.-R. Yao, (2011). *Food Chem*
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end.
- Harborne, J. B. (1980). Plant phenolics. In Bell, E. A.; *Charlwood, B. V. Encyclopædia of Plant Physiology*, 8, 329–395. .
- J. M. Silvan, F. J. Morales and F. Saura-Calixto. (2010). *J. Agric. Food Chem*.
- Jeremy, J., Shukla, N., Muzaffar, S., Handley, A., Angelini, G. (2004). Reactive oxygen species, vascular disease and cardiovascular surgery. *Curr. Vasc. Pharmacol*, 2, 229-236. .
- Kar Ashutosh. (2003). Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology, New Age International.
- Kenneth Davids. (2001). Glossary of Coffee and Espresso Terms. *Coffe Review*.
- Lee, J., Koo, N., Min, D. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals.
- Leng, P., Qi, J. (2003). Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress.
- Maillard, L. C. (1912). Formation of Melanoidins in a Methodical Way, *Compt. Rend.* 154, 66.
- McRae JM, Kennedy JA. (2011). Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Mol*.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., Davies M. J., Gopinathan, V. Milner. (1993). A Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*,4, 147.
- Michalak, A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J.* 5, 78

Pandey, K., Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*.

Paola Vitaglione,^a Vincenzo Fogliano^a and Nicoletta Pellegrini^{*b}, Coffee, colon function and colorectal cancer,

Raemy A, Lambelet P. (2012). A calorimetric study of self-heating in coffee and chicory. *IJ Food Sci & Tech*, 4, 198.

Raymond A. Serwy, John W. Jewett. . (2008). Física para ciencias e ingeniería con Física Moderna. México: Cengage Learning.

Re, R.; Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 5, 74.

Salisbury, F., Ross, C. (1994). Fisiología vegetal. *Grupo editorial Iberoamericana, México*. 5. 356 -358.

Shingh, A., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G., Pasakdee, S. (2009). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chem.* 114, 955-961.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, (1999). R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*.

T. Hofmann, W. Bors & K. Stettmaier, in *Free Radicals in Food*, ed. F. S. Michael J. Morello, Chi-Tang.

Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology*. U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.

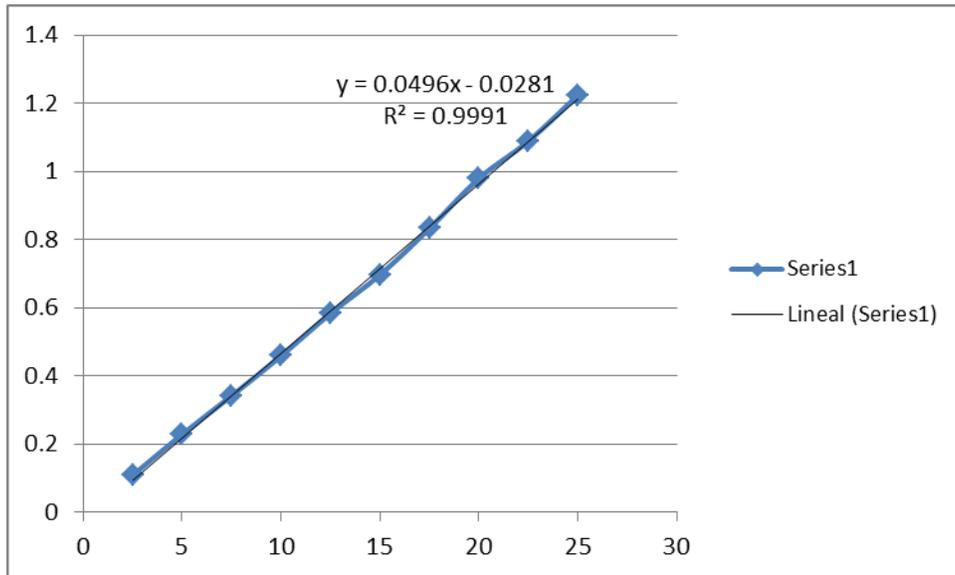
Ukers, William Harrison. (1922). *All About Coffee*. *Tea and Coffee Trade Journal Company*. . 615.

W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier & C. Berset. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.

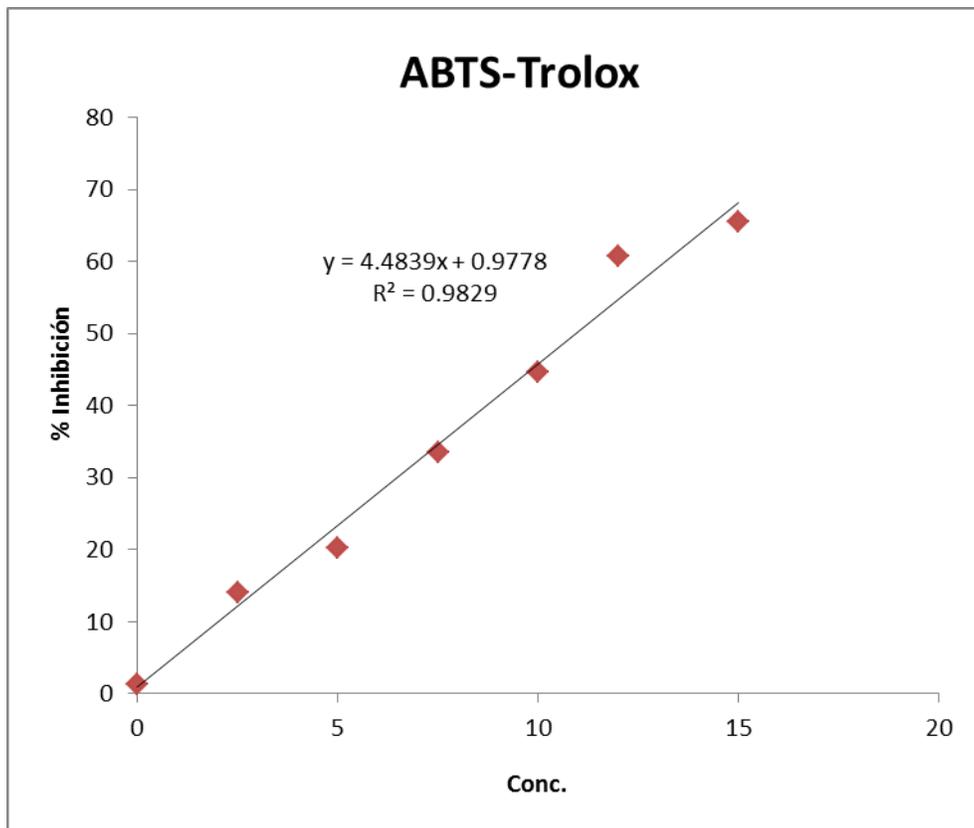
Yrjo H. Roos, Yoav D. Livne. (2017). Food Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery, *Food Engineering*, 5, 87-91.

8. Anexos

Anexo 1. Curva de Ácido Gálico



Anexo 2 Curva de Trolox



Anexo 3 Construcción de curva de calibración de Ácido Cítrico

La curva se elaboró por triplicado de la siguiente manera.

Se pesó 0.0025mg de DPP y se llevo a 100ml de Etanol (Solución DPPA).

Se pesó 0.0005g de Ácido Gálico y se disolvió en 2ml, lo cual produjo una solución de $\frac{250\mu g}{ml}$ (Solución 1). De la cual se obtuvieron soluciones de

$\frac{125\mu g}{ml}$ (Solución 2), $\frac{50\mu g}{ml}$ (Solución 3), $\frac{25\mu g}{ml}$ (Solución 4),
 $\frac{10\mu g}{ml}$ (Solución 5) y $\frac{5\mu g}{ml}$ (Solución 6) Para la elaboración de la curva.

Se tomó 0.1ml de la solución 1 y se le agrego 3.9ml de solución DPPA, Se dejó reposar 30minutos en un vial ámbar se leyó la absorbancia de la solución.

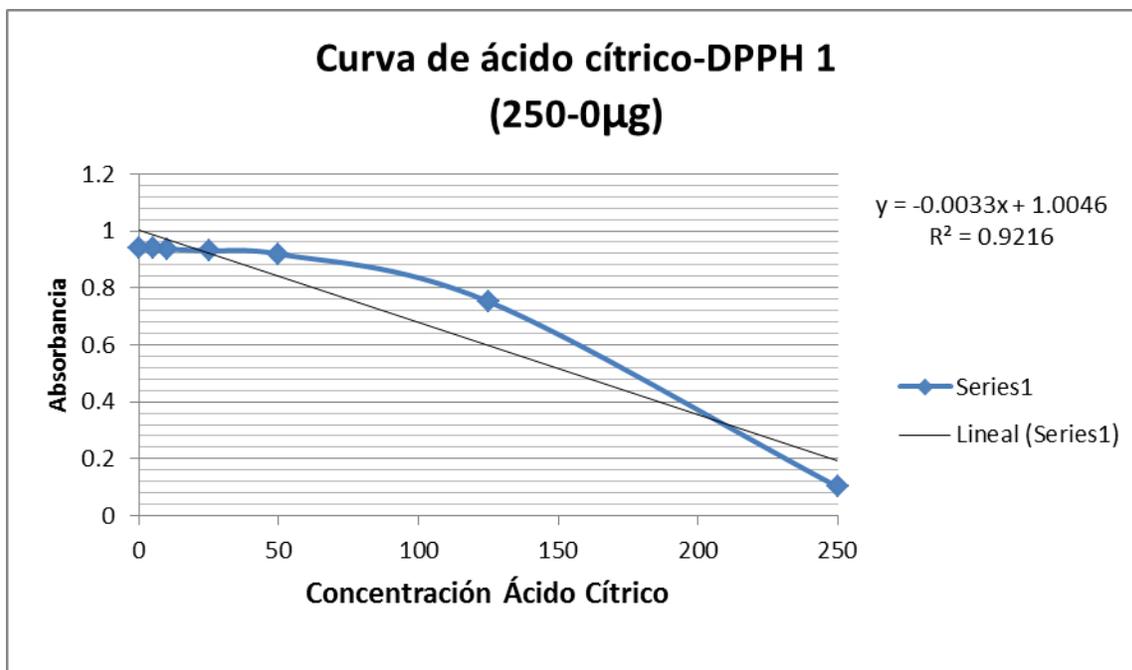
Se repitió el mismo procedimiento con las demás soluciones.

Las absorbancias obtenidas fueron las siguientes.

| Concentración de Ácido Cítrico ($\mu g/ml$) | Absorbance |
|---|------------|
| 250 | 0.101 |
| 125 | 0.752 |
| 50 | 0.919 |
| 25 | 0.93 |
| 10 | 0.936 |
| 5 | 0.94 |
| 0 | 0.942 |

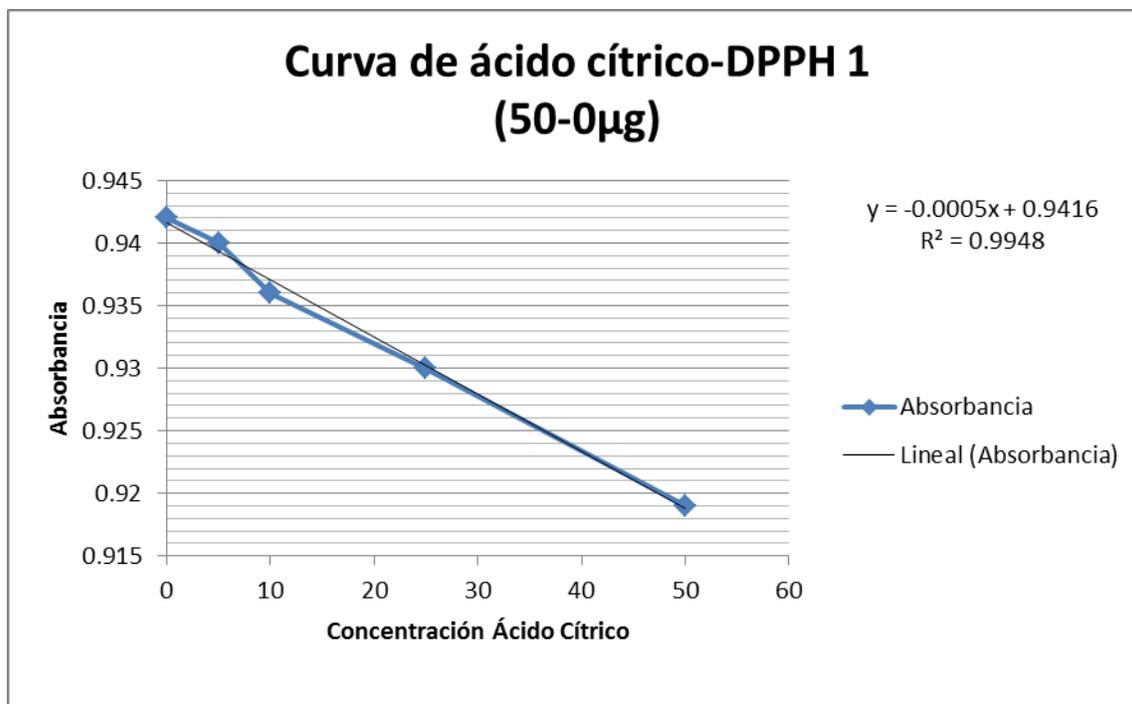
Absorbancias obtenidas para la construcción de Curva de Calibración de Ácido Cítrico.

Con las absorbancias anteriores se graficó la siguiente curva.



Curva de Ácido Cítrico 1 (puntos 250 a 0).

Lo puntos observados de la solución 1 y 2 se encuentran muy dispersos comparados con los demás, por lo que se graficó de nueva cuenta eliminando estos puntos y se obtuvo la siguiente gráfica.



Curva de Ácido Cítrico 1 (puntos 50 a 0).

Que sin estos la gráfica presenta una regresión lineal de 0.9984. Sumado a esto la solución de 250 presento un color amarillo lo que implica que el DPPA reacciono completamente y se produjo un producto amarillo, el cual contrasta con el color del DPPA que es morado y el color del DPPA inhibido que es blanco por lo que estas concentraciones de ácido cítrico no son óptimas para la curva de calibración.

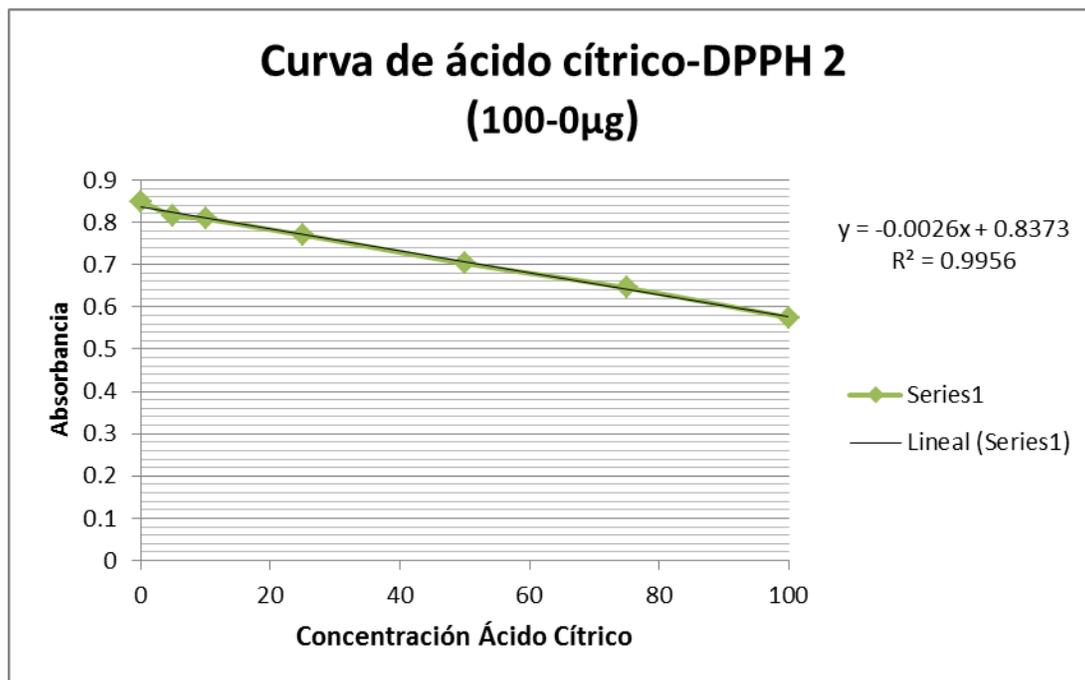
Debido a lo anterior se cambiaron las concentraciones de las soluciones quedando las soluciones de la siguiente manera.

$\frac{100\mu g}{ml}$ (Solución 1). De la cual se obtuvieron soluciones de
 $\frac{75\mu g}{ml}$ (Solución 2), $\frac{50\mu g}{ml}$ (Solución 3), $\frac{25\mu g}{ml}$ (Solución 4),
 $\frac{10\mu g}{ml}$ (Solución 5) y $\frac{5\mu g}{ml}$ (Solución 6).

Se trataron las soluciones de la misma forma que a curva anterior y presento las siguientes absorbancias.

| Concentración de Ácido Cítrico (µg/ml) | Absorbancia |
|--|-------------|
| 100 | 0.575 |
| 75 | 0.645 |
| 50 | 0.703 |
| 25 | 0.77 |
| 10 | 0.808 |
| 5 | 0.816 |
| 0 | 0.85 |

Absorbancias obtenidas para la construcción de Curva de Calibración de Ácido Cítrico Número 2.

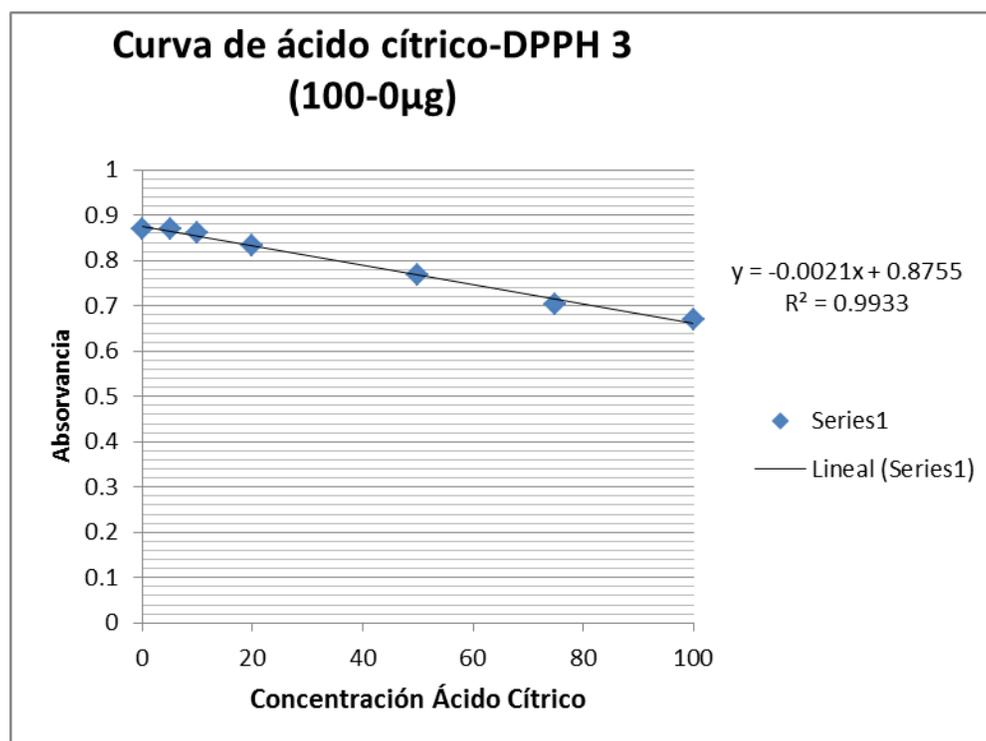


Curva de Ácido Cítrico 2 (puntos 100 a 0).

Se repitió una tercera vez la curva con las concentraciones de la segunda y presento las siguientes absorbancias.

| Concentración de Ácido Cítrico ($\mu\text{g/ml}$) | Absorbancia |
|---|-------------|
| 100 | 0.67 |
| 75 | 0.704 |
| 50 | 0.768 |
| 20 | 0.832 |
| 10 | 0.86 |
| 5 | 0.869 |
| 0 | 0.87 |

Absorbancias para Curva de Ácido Cítrico 3

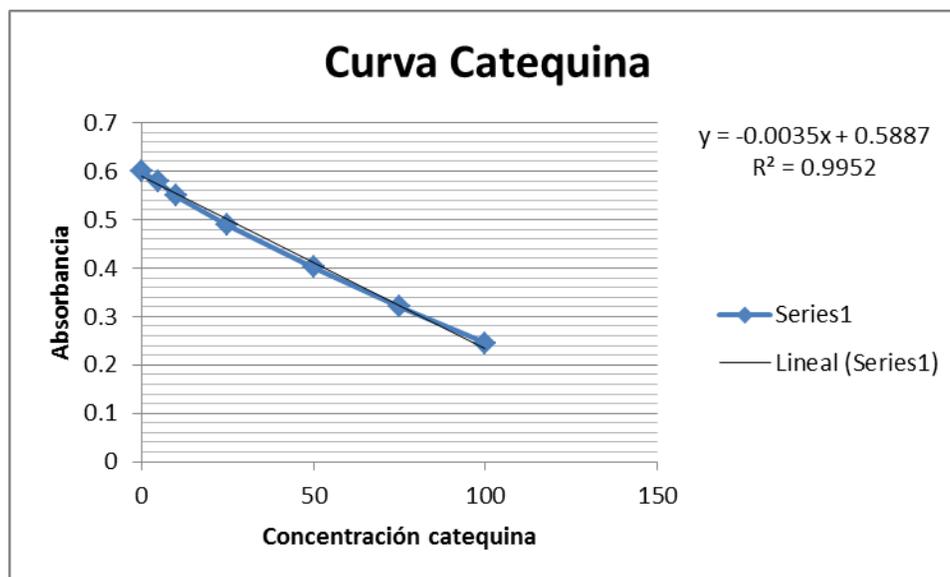


Curva de Ácido Cítrico 3 (puntos 100 a 0).

Adicionalmente se realizó una curva con Catequina con concentraciones de $\frac{100\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $\frac{75\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $\frac{50\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $\frac{25\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $\frac{10\mu\text{g}}{\text{ml}}$ y $\frac{5\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Las cuales presentaron las siguientes absorbancias y curva.

| Concentración de Catequina (µg/ml) | Absorbancia |
|------------------------------------|-------------|
| 100 | 0.245 |
| 75 | 0.32 |
| 50 | 0.402 |
| 25 | 0.489 |
| 10 | 0.549 |
| 5 | 0.578 |
| 0 | 0.6 |

Absorbancias para Curva de Catequina.



Curva de Catequina.

Anexo 4

Calculo de concentraciones de Taninos

A2-A1 Muestra con calor

$$\left(\frac{0.1986g \text{ de taninos}}{10g \text{ de café}} \right) = \frac{0.01986g \text{ de taninos}}{g \text{ de café}} \left(\frac{1000mg}{1g} \right) = \frac{19.86mg \text{ de taninos}}{g \text{ de café}}$$

$$\text{Porcentaje en muestra} = \frac{0.01986g \text{ de taninos}}{g \text{ de café}} (1g \text{ de café}) * 100 = 1.986\%$$

Determinación de Taninos, Gramos de Taninos en las Muestras.

| Comparación de vasos | Diferencia de pesos | Gramos de taninos en la muestra |
|-----------------------------|----------------------------|--|
| A2-A1 | 0.2249-0.0263 | 0.1986 |
| B2-B1 | 0.0437-0.0379 | 0.0058 |
| C2-C1 | 0.2069-.00703 | 0.1366 |
| D2-D1 | 0.1232-0.0458 | 0.0774 |