

UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS

**EFFECTO DE LA CRIOCONCENTRACIÓN EN PELÍCULA DESCENDENTE SOBRE LOS
COMPONENTES BIOACTIVOS DEL EXTRACTO ACUOSO DE CAFÉ**

Q.A. LADY JOHANA CORREA HIGUERA

Bogotá, Octubre de 2013

UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS

**EFFECTO DE LA CRIOCONCENTRACIÓN EN PELÍCULA DESCENDENTE SOBRE LOS
COMPONENTES BIOACTIVOS DEL EXTRACTO ACUOSO DE CAFÉ**

Q.A. LADY JOHANA CORREA HIGUERA
Trabajo de Grado para optar el título
Magister en Diseño y Gestión de Procesos

Director: MSc FABIÁN LEONARDO MORENO
Co-Director: PhD. RUTH YOLANDA RUÍZ PARDO

Bogotá, Octubre de 2013

DEDICATORIA

A Dios porque su amor, irradia mi vida todos los días y a cada una de las personas que ha puesto en mi camino.

A mi madre y hermanos, que con su confianza, amor y ejemplo me enseñan que la dedicación y el esfuerzo son las herramientas necesarias para alcanzar lo que se quiere.

Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Este libro es solo una pequeña parte de un gran proceso en mi vida, agradezco a todas las personas que me brindaron su apoyo especialmente a:

Mi director; Ingeniero Fabián Leonardo Moreno, por su esfuerzo, dedicación y paciencia, su experiencia y conocimientos fueron un soporte significativo para el desarrollo de esta investigación.

Mi co-directora Dra. Yolanda Ruíz; por su visión crítica, su compromiso y aportes reveladores en la investigación.

A la Dra. María Clementina Cueto; en quien pude ver reflejado un sentido muy humano y afectivo del mundo académico.

A la Profesora Rosa Erlide Prieto Correa, por su colaboración en el desarrollo de las pruebas de actividad antioxidante.

A la ingeniera Yomaira Lisnedy Uscategui, condiscípula de la maestría, por su valiosa colaboración en la etapa experimental de este trabajo, su experiencia y compañía fueron un soporte fundamental para mí.

Al profesor Sergio Andrei Cuervo, por su colaboración en el desarrollo de los ensayos de cromatografía.

A mis compañeros de clase Lina, Yulieth, Augusto y Martín, de quienes recibí una amistad sincera y el apoyo para enfrentar los momentos de crisis.

A mis amigas Marcela y Dimelsa, mi hogar en Bogotá.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPÓTESIS	5
1 MARCO CONCEPTUAL.....	6
1.1 CRIOCONCENTRACIÓN (CC).....	6
1.2 CAFÉ.....	10
1.2.1 COMPOSICIÓN DEL CAFÉ TOSTADO	11
1.2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CAFÉ Y SUBPRODUCTOS.....	17
1.2.3 ANÁLISIS DE CAFÉ.....	20
1.3 ANTIOXIDANTES.....	22
1.3.1 ANTIOXIDANTES NATURALES.....	23
1.3.2 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES	23
1.3.3 OXIDACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS	25
1.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 27	
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 ENSAYOS DE CRIOCONCENTRACIÓN	31
3.1.1 PROTOCOLO DE CRIOCONCENTRACIÓN.....	31
3.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	34
3.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	38
3.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	40
3.3.1 COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	40
3.3.2 METODOLOGÍA ABTS.....	41
3.3.3 METODOLOGÍA DPPH	42
3.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
4 RESULTADOS Y ANÁLISIS	43
4.1 CRIOCONCENTRACIÓN	43
4.1.1 RESULTADOS GLOBALES	43

4.1.2	RESULTADOS POR ETAPAS.....	49
4.2	CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	52
4.2.1	CONTENIDO DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS Y CAFEÍNA	52
4.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	60
4.3.1	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES.....	60
4.3.2	ENSAYOS ABTS Y DPPH.....	64
4.3.3	CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONCENTRACIÓN DE COMUESTOS BIOACTIVOS.....	68
5	CONCLUSIONES.....	71
6	RECOMENDACIONES.....	73
7	BIBLIOGRAFIA.....	74
	ANEXOS.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición (% extracto seco) de los granos de café verde y tostado para las variedades arábica y robusta, así como del café instantáneo.	12
Tabla 2. Parámetros de Crioconcentración	34
Tabla 3. Gradiente fase móvil RP-HPLC	39
Tabla 4. Balance de materia	45
Tabla 5. Variables respuesta del proceso de crioconcentración	49
Tabla 6. Variables respuesta del proceso de crioconcentración por etapas	51
Tabla 7. Contenido de compuestos bioactivos en base húmeda	54
Tabla 8. Contenido de compuestos bioactivos en base seca	56
Tabla 9. Porcentaje de pérdida de compuestos bioactivos en el hielo	60
Tabla 10. Contenido de polifenoles	61
Tabla 11. Porcentaje de pérdida en el hielo de la actividad antioxidante	62
Tabla 12. Actividad antioxidante mediante DPPH y ABTS	65
Tabla 13. Correlación de Pearson para compuestos bioactivos y actividad antioxidante..	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes con actividad biológica presentes en el café.	15
Figura 2. Principales radicales libres y su acción sobre macromoléculas.....	25
Figura 3. Esquema del equipo utilizado	32
Figura 4. Equipo de crioconcentración utilizado	33
Figura 5. Funcionamiento del crioconcentrador utilizado	33
Figura 6. Esquema general del proceso de crioconcentración	35
Figura 7. Diagrama del proceso de crioconcentración.	44
Figura 8. Seguimiento índice de concentración.....	46
Figura 9. Eficiencia	46
Figura 10. Coeficiente de reparto.....	47
Figura 11. Fracción de descongelación.....	48
Figura 12. Seguimiento índice de concentración etapa 1	50
Figura 13. Seguimiento índice de concentración etapa 2.....	51
Figura 14. Cromatograma típico de cafeína	53
Figura 15. Cromatograma típico del 5-CQA y 4-CQA.....	53
Figura 16. Contenido de 5-CQA, 4-CQA y cafeína en la solución inicial, solución y fracción de hielo finales en mg/mL de solución.	55
Figura 17. Contenido de 5-CQA, 4-CQA y cafeína en la solución inicial, solución y fracción de hielo finales en g por cada 100 g de materia seca.	56
Figura 18. Contenido de polifenoles en el extracto crioconcentrado en base húmeda.	61
Figura 19. Contenido de polifenoles en base seca.....	63
Figura 20. Actividad antioxidante en base húmeda.....	65
Figura 21. Actividad antioxidante en base seca	67

RESUMEN

La crioconcentración es una técnica utilizada en la transformación y purificación de soluciones acuosas, cuyo objetivo es incrementar la concentración de solutos vía congelación. Esta tecnología es utilizada en diferentes industrias y tiene particular importancia en el sector agroalimentario, dado que permite conservar las propiedades nutritivas, funcionales y sensoriales del producto debido a las bajas temperaturas que se manejan. La crioconcentración en película es una técnica en desarrollo que se presenta como una alternativa de procesamiento, en la obtención de café soluble que conserva compuestos de interés biológico. Para la definición de las condiciones de operación a las cuales puede ser llevada a cabo la crioconcentración, es requerido conocer su efecto sobre la calidad del producto final. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de la tecnología de crioconcentración sobre los componentes relacionados con las propiedades de interés funcional (antioxidante) de soluciones acuosas de café. Se realizó una evaluación de los efectos de esta técnica sobre los compuestos bioactivos (ácidos clorogénicos y cafeína) y la actividad antioxidante del extracto crio concentrado y el hielo residual frente al extracto sin crio concentrar, partiendo de la separación de la fracción representativa y su posterior identificación y cuantificación por HPLC-FR y ensayos Folin-Ciocalteu, ABTS y DPPH. Se encontró que la crioconcentración en película es un método de separación y purificación de sistemas alimentarios que permite conservar los componentes bioactivos y la actividad antioxidante del extracto de café.

PALABRAS CLAVE: crio concentración, café, ácidos clorogénicos, cafeína, actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de los conocimientos en ciencia de alimentos ha permitido generar nuevas tecnologías o mejorar las ya existentes para la transformación adecuada de materias primas agropecuarias, en búsqueda de la obtención de productos con altos estándares de calidad que son respuesta a las demandas de un mercado en evolución.

Uno de los resultados, es el uso de métodos de extracción de bajo impacto con el fin de eliminar o minimizar la degradación de la calidad nutritiva, organoléptica y funcional de los alimentos. La crioconcentración (CC) se presenta como una alternativa de interés debido a las bajas temperaturas empleadas en el proceso y en la actualidad es usada en la industria de alimentos, para concentrar zumos de frutas, extractos de café y vinos.

El café soluble es un sistema alimentario complejo, sus propiedades sensoriales están dadas por las transformaciones químicas y físicas que experimenta el grano verde durante su proceso de obtención, especialmente durante el tostado, en donde las reacciones de Maillard generadas por las altas temperaturas forman una gran cantidad de compuestos, que en conjunto van definir las características de la bebida final y muchas de sus propiedades funcionales, entre ellas la de antioxidante; atribuidas a compuestos fenólicos y sus derivados, de los cuales los ácidos clorogénicos han demostrado una participación importante. Sin embargo, tratamientos con altas temperaturas posteriores al tostado degradan de manera significativa su estructura y composición. Es por esto que la industria aplica técnicas como la liofilización y la crioconcentración, para minimizar y prevenir el deterioro de la calidad sensorial y funcional. La única técnica de CC disponible industrialmente es la técnica conocida como suspensión, la cual es muy eficiente en la separación de agua lograda pero, es considerada como de alto costo. Se encuentran en desarrollo otras técnicas como la CC en bloque y la técnica en película, con la cual se espera sea posible obtener alta pureza de los productos concentrados y un consumo

menor de energía gracias a la sencillez de los equipos requeridos. (Aider & De Halleux, 2008). La técnica de película presenta diversas variaciones metodológicas que buscan incrementar la eficiencia de la separación. Durante la CC parte de los solutos son retenidos en el hielo formado. Esta retención puede depender de la movilidad de los solutos debida a su tamaño molecular e interacciones polares durante la formación de los cristales de hielo. Aún no se ha estudiado el efecto que pueda tener sobre los componentes bioactivos de interés del extracto de café.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la criocentración sobre los componentes bioactivos del café, para esto se criocentraron soluciones acuosas de café liofilizado (Buencafé), mediante la técnica de película, en un proceso de dos etapas, evaluando el índice de concentración (IC), la eficiencia del proceso, el coeficiente de reparto (K) y fracción de descongelación (f).

El análisis de la actividad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos se aplicó a la fracción acuosa y a la fracción de hielo finales.

La determinación del contenido de 3-CQA, 4-CQA y cafeína se realizó utilizando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, mientras que la capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas se evaluó aplicando las pruebas de Folin-ciocalteau, DPPH y ABTS.

JUSTIFICACIÓN

El desarrollo tecnológico y científico en el sector alimentario, se basa en las exigencias de un consumidor, que cada día se preocupa y conoce más acerca del producto que va a adquirir, en consecuencia los estándares que deben mantenerse serán cada día más altos y más completos; el mercado demanda alimentos de excelente calidad nutritiva y sensorial, pero además, dado a las tendencias actuales en alimentación, se espera que

los productos alimenticios contribuyan en el desarrollo adecuado de las funciones biológicas o sirvan para prevenir o tratar algún tipo de enfermedad. En los últimos años, el estudio de la crioconcentración como técnica de obtención de jugos y extractos alimentarios, la presenta como una alternativa de tratamiento para la preservación de componentes nutritivos, sensoriales y funcionales (Aider & De Halleux, 2009); el éxito de este procedimiento y su futuro como tecnología industrial depende del diseño de procesos y equipos adecuados; la crioconcentración garantiza la estabilidad de los componentes termo sensibles de los sistemas alimentarios, con mínimos costos de operación y gracias a la simplicidad de los equipos requeridos muestra ventajas sobre otras técnicas de separación . (Aider & De Halleux, 2008)

En Colombia las exportaciones de café corresponden mayoritariamente al café verde, y es contradictorio que países no productores primarios como Canadá y Alemania, sean proveedores más importantes que nuestro país, de cafés y subproductos transformados (Agrocadenas, 2005). Debe ser prioridad para el sector cafetero fortalecer su dinámica de mercado y es evidente que el reto está en la obtención de café y subproductos con adecuada calidad sensorial, que mantenga las cualidades y que además contenga los compuestos bioactivos que han reportado resultados positivos en el control y prevención de algunas enfermedades crónicas y degenerativas comunes en la actualidad como; desordenes cardiovasculares, diabetes, obesidad, mejora de la respuesta psicoactiva y alteraciones neurodegenerativas. (Nkondjock, 2009) (Muriel & Arauz, 2010)

La determinación de la actividad antioxidante, de soluciones acuosas de café crioconcentradas, será una herramienta que aportará información necesaria para validar el uso de esta técnica, en el desarrollo de productos a base de café, los cuales pueden constituir una alternativa importante en el tratamiento de varias enfermedades de interés mundial, gracias a la permanencia de sus constituyentes fitoquímicos con potencial

bioactivo (Hecimovic, Belscack-Cvitanovic, Horzic, & Komes, 2011), pues el café es una de las principales fuentes de ácidos clorogénicos en la dieta humana (Olthof, Hollman, & Katan, 2006).

El diseño del proceso de crioconcentración se debe abordar desde la perspectiva de la recuperación de solutos, la eficiencia energética y la calidad del producto obtenido. En el caso del café, la calidad funcional está relacionada con la conservación de componentes bioactivos. Se espera que la crioconcentración en película descendente sea una técnica que permita aumentar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos, pero esto aún no ha sido reportado. Con base en esta información, se plantea la siguiente pregunta de investigación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la crioconcentración en película descendente sobre los componentes funcionales (ácidos clorogénicos y cafeína) y la capacidad antioxidante del extracto acuoso de café sometido a este tratamiento?

HIPÓTESIS

La crioconcentración no afecta la disponibilidad de los ácidos clorogénicos y por lo tanto mejora la actividad antioxidante de extracto acuoso de café al incrementar la concentración de componentes antioxidantes.

1 MARCO CONCEPTUAL

1.1 CRIOCONCENTRACIÓN (CC)

La complejidad química de los sistemas alimentarios, ha generado múltiples investigaciones en el desarrollo de técnicas que permitan conservar los compuestos biológicos susceptibles de degradación térmica, tales como proteínas, lípidos, ácidos orgánicos, vitaminas, fenoles y compuestos aromáticos. Puesto que muchos de los procesos industriales de transformación de materias primas agroalimentarias se basan en el uso de altas temperaturas, la calidad nutritiva y sensorial del producto final dista mucho del producto original. La crioconcentración, es una alternativa óptima en la concentración de extractos alimentarios que mantiene su calidad nutricional, sensorial y funcional, gracias a las bajas temperaturas de operación (Aider & De Halleux, 2009).

La crioconcentración es un proceso que permite concentrar sustancias líquidas a través de la congelación y posterior separación de los cristales formados. Cuando una solución acuosa se somete a temperaturas por debajo del punto de congelación, se forma una fase sólida consistente en hielo, con algunas porciones atrapadas de solutos que es retirada para incrementar la concentración de la solución original. La temperatura de operación dependerá de la solución y debe ser mantenida por debajo del punto de congelación de manera controlada para evitar llegar al punto eutéctico en donde todo el conjunto congelaría, se busca obtener un hielo de alta pureza con una mínima cantidad de sólidos disueltos (Raventós, Hernández, Auleda, & Ibarz, 2007).

La eficiencia de la operación esta determina por la separación óptima de las fracciones líquida y sólida, pero a la vez de la pureza del cristal obtenido, que depende de la oclusión de los solutos en el mismo, la definición de las condiciones de operación deberá contemplar la formación de cristales grandes, limpios y de tamaño uniforme.

Un análisis del uso y aplicación de la crioconcentración reporta que el estudio de esta técnica ha crecido en las últimas dos décadas y en los últimos años han aumentado el número de publicaciones sobre el tema. (Ruíz, Sánchez, Auleda, Hernández, & Raventós, 2009). Este estudio recopila las diferentes técnicas de crioconcentración, dentro de las cuales se encuentran: la crioconcentración en suspensión, en película descendente o progresiva y en bloque. La única técnica implementada a nivel industrial es la crioconcentración por suspensión. Las tecnologías emergentes (película, bloque) están aún en fase de desarrollo a nivel laboratorio y a nivel piloto y se muestran como promisorias en cuanto a eficiencia de la separación y bajos costos de operación.

- **CRIOCONCENTRACIÓN EN PELÍCULA**

Se basa en la formación de un cristal de gran tamaño generado a partir de una solución que fluye de manera continua sobre una superficie de intercambio de calor. El cristal formado permanece adherido a la placa haciendo más sencilla la separación de las dos fracciones (Miyawaki, Liu, Shirai, Shakashita, & Kagitani, 2005).

En la crioconcentración en película, también conocida como crioconcentración en placa, la solución a concentrar está en contacto con una superficie refrigerante generalmente vertical sobre la cual el hielo crece capa por capa y la solución se hace más concentrada durante el transcurso de la operación. Los estudios realizados indican que a medida que aumenta la velocidad de formación del cristal se obtienen soluciones más concentradas y al mismo tiempo se incrementa la retención de sólidos en el hielo (Sánchez, Ruíz, Auleda, Hernández, & Raventós, 2009)

Aider y De Haillux (2009) en su revisión sobre las aplicaciones de la crioconcentración en la industria de alimentos, definen las tres principales técnicas actualmente aplicadas para la concentración de alimentos y aguas residuales: La CC en suspensión, en película y en bloque.

La crioconcentración en película puede ser realizada en un equipo de placas o la conocida como CC progresiva. Se basa en la formación de un gran cristal que crece en la superficie del recipiente de crioconcentración, haciendo que el proceso de separación sea más rápido y por ser un sistema simple, los costos decrecen en gran medida. (Miyawaki, Liu, Shirai, Shakashita, & Kagitani, 2005) (Raventós, Hernández, Auleda, & Ibarz, 2007)

- **CRIOCONCENTRACIÓN POR SUSPENSIÓN**

Esta técnica es la de mayor uso a nivel industrial, y consiste en la formación de partículas de hielo suspendidas en la solución concentrada, que posteriormente son separadas, por lo cual se compone de tres etapas: nucleación, maduración y separación de los cristales de hielo, cada una se desarrolla en equipos individuales y con características específicas. Durante la nucleación se generan partículas cristalinas que crecen a partir de cierto tamaño y que en la etapa de maduración se fusionan para formar cristales más grandes. El tamaño de los cristales define la eficiencia del proceso, para su control se necesita un sistema de intercambio de calor y el raspado continuo de su superficie para generar la fracción de hielo semilla y una torre de crecimiento del cristal para la maduración. (Aider & De Halleux, 2008) .

Por lo anterior, esta técnica se presenta como una de las más costosas para la concentración de alimentos líquidos, aun así ha sido aplicada en la concentración de jugos de frutas, extractos de café, leche y aguas residuales. (Sánchez, Ruíz, Auleda, Hernández, & Raventós, 2009)

- **CRIOCONCENTRACIÓN EN BLOQUE**

La crioconcentración en bloque puede ser realizada por dos técnicas, en la primera; la solución a concentrar se introduce en un recipiente de cristalización en donde es congelada parcialmente desde el centro hacia afuera, gracias a un tubo ubicado en el centro por el cual circula el refrigerante, a medida que aumenta el tamaño del bloque de hielo, aumenta la concentración de la solución.

En la segunda técnica la solución se congela completamente y en el centro se mantiene la temperatura por debajo del punto de congelación, luego la solución es descongelada y la solución concentrada es recuperada por acción de la gravedad. (Aider & De Halleux, 2009) (Aider & De Halleux, 2008). La técnica ha sido probada en jugos de frutas, lácteos, jarabe de maple (Aider & De Halleux, 2008) (Aider & De Halleux, 2009). En algunos productos se ha evaluado la conservación de las propiedades funcionales. La técnica ha sido estudiada para café por (Moreno, Robles, Sarmiento, Ruíz, & Pardo, 2013).

La eficiencia del proceso de la crioconcentración en bloque y los mecanismos de descongelación (pasiva y asistida por microondas) fueron analizados por Aider y De Halleux (2008); demostrando que la eficiencia del proceso es determinada por las variables operativas de la CC y que la calidad final del producto, no se ve afectada. Sin embargo, estos resultados son dependientes del tipo de producto a crioconcentrar. De esta manera, la técnica se proyecta como una técnica bajo costo, incrementado su potencial como tratamiento industrial de congelación y concentración (Nakagawa, Nagahama, Meabashi, & Maeda, 2010).

Recientemente (Boaventura, y otros, 2013), estudiaron la potencialización de componentes antioxidantes por crioconcentración del extracto acuoso de mate, encontrando un incremento de los componentes funcionales y la capacidad antioxidante del producto en cinco etapas del proceso, especialmente en la última. Las sustancias

activas fueron identificadas por HPLC y la capacidad antioxidante fue probada por DPPH y FRAP.

La criocentración ha sido comparada con otras técnicas de separación a fin de establecer rendimientos y eficiencia de la operación, y se ha encontrado que frente a procedimientos de osmosis inversa en la remoción de ácidos orgánicos de aguas residuales de la industria textil, el consumo de energía en la criocentración es mayor, ya que la osmosis requiere de energía mecánica, sin embargo el costo y mantenimiento de la membrana de separación en esta última técnica es elevado (Rodríguez, Luque, Alvarez, & Coca, 2000); en sistemas alimentarios la filtración por membranas es una opción para mantener compuestos de sensibilidad térmica como nutrientes y componentes aromáticos, sin embargo las altas presiones requeridas, aumentan el deterioro de la membrana aumentando el costo de operación. (Aider & De Halleux, 2008) En comparación con sistemas de evaporación convencional, para tratar aguas residuales, la criocentración eutéctica presentó una reducción en el consumo de energía del 30% en la purificación de nitrato de sodio y el 65% para el sulfato de cobre, esto confirma que la evaporación del agua grandes cantidades de energía, por lo tanto la criocentración es una alternativa de gran interés en los procesos industriales que han utilizado esta técnica como método de purificación (Vander Ham, Witcamp, Grauw, & Van Rusmalen, 1998).

1.2 CAFÉ

Se conoce con el nombre de café (en grano) a las semillas de plantas del género *Coffea*, perteneciente a la familia de las *Rubeaceae*, desprovistas de sus vainas y en lo posible de sus tegumentos en estado crudo o tostado, enteras o molidas; y también se conoce como café a la bebida preparada con estas semillas (Belitz & Grosh, 2009).

La cuna del café esta en África (Etiopia, Abisinia). Desde allí se difundió por Arabia y Constatinopla hasta Venecia, extendiéndose luego por Europa.

1.2.1 COMPOSICIÓN DEL CAFÉ TOSTADO

El café es uno de los productos alimenticios de mayor consumo a nivel mundial gracias a sus características organolépticas y sensoriales, en la actualidad las propiedades funcionales de sus componentes, principalmente compuestos fenólicos con actividad antioxidante; ácidos hidroxicinámicos (clorogénicos, ferúlicos, cafeícos, cúmaricos), cafeína y otros compuestos volátiles (Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011), intensifican las razones para su consumo.

Las variedades más cultivadas son *coffee arabica* (Arabica) y *coffee canephora* (Robusta), la segunda presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos y cafeína, sin embargo después de los tratamientos industriales las diferencias entre las dos especies nos son significativas (Richelle, Tavazzi, & Offord, 2001).

El tratamiento de los granos verdes a temperaturas de 200-250°C, induce en el café diversas transformaciones, caracterizadas por un aumento en el volumen (50-80%), modificaciones estructurales y de color, disminución del peso (13-20%) y especialmente por la formación de un aroma típico que no existe en el grano crudo (Belitz & Grosh, 2009), simultáneamente se disminuye el peso especifico, el café tostado flota en el superficie del agua al agregarse a ésta, a diferencia de los granos crudos, los granos tostados se hacen quebradizos y blandos.

En general el tostado se caracteriza por la disminución de los componentes originales y por la aparición de otros nuevos, que pueden variar notablemente de acuerdo con la clase y el grado de tostado del producto.

El grano de café constituye una matriz alimentaria compleja debido a la gran variedad y diferencia entre sus componentes; que dependen directamente de factores como la especie, condiciones de cultivo, grado de madurez, prácticas agrícolas, calidad del suelo y condiciones de almacenamiento entre otras. Durante cada etapa de los procesos de transformación, dichos componentes experimentan una interacción constante de la cual resultan las sustancias de mayor incidencia en el perfil aromático del café tostado y su fracción soluble junto con las características sensoriales más importantes para el consumidor; aroma, cuerpo, acidez y sabor.

En la tabla 1, se encuentra la composición en porcentaje en base seca de las dos variedades de café más comunes en estado verde y tostado, junto con la composición de café instantáneo.

Tabla 1. Composición (% extracto seco) de los granos de café verde y tostado para las variedades arábica y robusta, así como del café instantáneo.

COMPONENTES	CAFÉ ARABICA		CAFÉ ROBUSTA		INSTANTÁNEO
	VERDE	TOSTADO	VERDE	TOSTADO	
MINERALES	3.0 -4.2	3.5 - 4.5	4.0 - 4.5	4.5 - 5.0	9.0 - 10.0
CAFEÍNA	0.9 - 1.2	1.0	1.6 - 2.4	2.0	4.5 - 5.1
TRIGONELINA	1.0 - 1.2	0.5 - 1.0	0.6 - 0.75	0.3 - 0.6	-
LÍPIDOS	12.0 - 18.0	14.5 - 20.0	9.0 - 13.0	11.0 -16.0	1.5 - 1.6
AC.CLOROGÉNICOS	1.5 - 1.6	1.2 - 2.3	7.0 - 10.0	3.9 - 4.6	5.2 - 7.4
AC. ALIFATICOS	1.5 -2.0	1.0 - 1.5	1.5 - 2.0	1.0 - 1.5	-
OLIGASACARIDOS	6.0 - 8.0	0 - 3.5	5.0 - 7.0	0 - 3.5	0.7 - 5.2
POLISACARIDOS T	50.0 - 55.0	24.0 - 39.0	37.0 - 47.0	-	65 - 68
AMINOACIDOS	2.0	0	2.0	0	0
PROTEÍNAS	11.0 - 13.0	13.0 - 15.0	11.0 - 13.0	13.0 15.0	16.0 - 21.0
AC. HÚMICOS	-	16.0 - 17.0	-	16.0 - 17.0	15.0

FUENTE (Montero Rodríguez, Talon Marquéz, & Sánchez Muniz, 1999); (Bejarano, y otros, 2013)

Durante el tostado se producen los compuestos responsables del aroma y color de las bebidas de café, principalmente como resultado de las reacciones de Maillard, las melanoidinas, son compuestos de alto peso molecular solubles en agua y constituyen más del 25% del peso del café seco, se derivan de la interacción de oligosacáridos con proteínas y aminoácidos libres que se destruyen totalmente dando origen a las características finales del producto, convirtiendo a los aminoácidos libres en los compuestos de mayor importancia relacionados en la formación del aroma del café. (Del Pino, 2011)

Los compuestos solubles en agua del café verde que más se afectan por el tostado son las proteínas, azúcares, cenizas y ácidos clorogénicos; en general el contenido de azúcares disminuye, la mayor parte de la sacarosa desaparece dando origen a furanos y los azúcares simples como glucosa, fructosa y arabinosa se destruyen progresivamente (Montero Rodríguez, Talon Marquéz, & Sánchez Muniz, 1999) contribuyendo a la formación de melanoidinas; la cafeína se pierde mínimamente, mientras que la Trigonelina siendo el precursor del ácido nicotínico rápidamente se degrada, además la pirólisis de este compuesto en conjunto con proteínas da paso a la formación de compuestos volátiles como piridinas (De Maria, Trugo, Aquino Neto, Moreira, & Aliviano, 1996).

Los ácidos clorogénicos son los principales polifenoles del café especialmente el ácido 5-O-cafeoilquinico (Fujioka & Shibamoto, 2008), durante el tostado hay una disminución debido a que las altas temperaturas inducen su polimerización dando lugar a nuevas estructuras, algunas de ellas colaboran en la formación de melanoidinas (Del Pino, 2011), sin embargo el aporte de ácidos clorogénicos en el café instantáneo sigue siendo importante a pesar de estas degradaciones.

La capacidad antioxidante de las bebidas de café es atribuida a compuestos fenólicos y compuestos inducidos por el tostado como melanoidinas, cafeína y ácidos clorogénicos.

Dentro de los ácidos clorogénicos con mayor presencia en el café se encuentran ácidos cafeoilquínicos (CQA), ácidos dicafeoilquínicos (diCQA) y ácidos feruloilquínicos (FQA), su concentración final en la bebida es importante para la evaluación de su calidad. (Kwan, SunYoo, & Takayuri, 2009)

El café es la principal fuente de ácidos clorogénicos para el ser humano, este es un ester formado entre el ácido cafeíco y el ácido quinico que gracias a los grupos hidroxilos del residuo aromático atacan las especies de oxígeno reactivas y contribuyen a actividades mutagénicas, carcinogénicas y antioxidantes in vitro. (Hecimovic, Belscack-Cvitanovic, Horzic, & Komes, 2011)

Los derivados de ácidos clorogénicos se presentan por el carbono en el cual se encuentra el enlace entre las moléculas y el número de moléculas del ácido fenólico presente. El ácido clorogénico mas abundante es el ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA) junto a sus isómeros de posición 4-CQA y 3-CQA. El contenido de estos compuestos en la bebida presenta el siguiente orden decreciente 5-CQA, 4-CQA y 3-CQA (Nisiteo, Komes, Belzac-Cvitanovic, Horzic, & Budec, 2012) aunque existen más de 17 diferentes ácidos clorogénicos estos son considerados los de mayor abundancia e importancia en el café y sus derivados. Su formula molecular es $C_{16}H_{18}O_9$ y su peso molecular es 354,387 g/mol.

En la figura 1 se encuentran las estructuras de los principales compuestos de interés funcional en el café y sus subproductos.

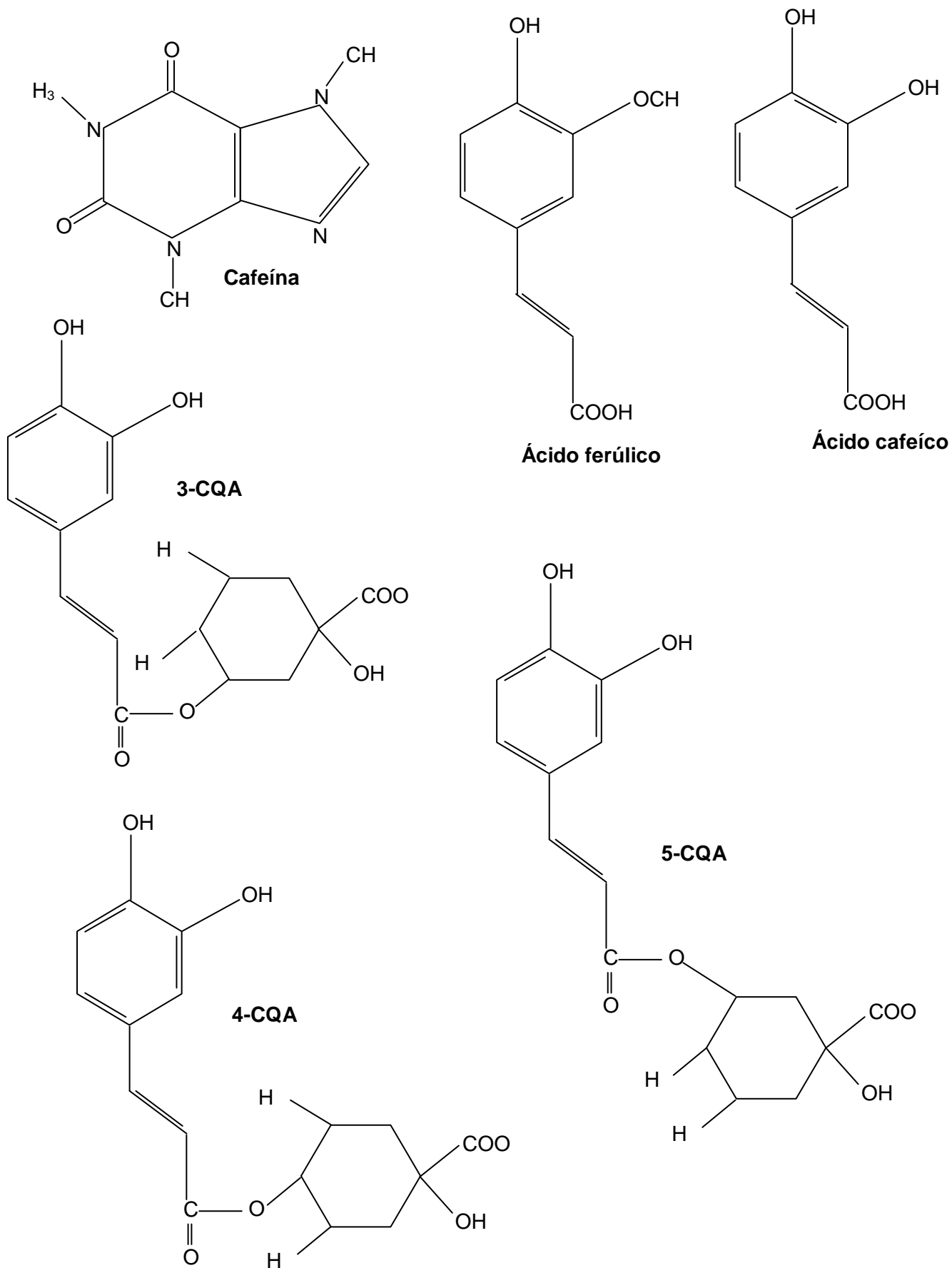


Figura 1. Componentes con actividad biológica presentes en el café.

Los polisacáridos; galactomananos, arabinogalactanos y celulosa, son los principales constituyentes del grano de café verde y son los precursores del aroma del café tostado, contribuyen a la calidad organoléptica de la bebida, imparten cuerpo, estabilizan la espuma del expreso y su presencia aumenta la viscosidad en la fabricación del café soluble (Bolivar, 2009). La degradación de estos compuestos, presentes principalmente en la pared celular del grano verde, es importante para la solubilidad de los mismos; durante el calentamiento se hidrolizan las cadenas de polisacáridos disminuyendo de manera significativa su peso molecular, de igual manera se produce una remoción de azúcares de las cadenas laterales lo que genera una reducción de la interacción de las proteínas con la matriz de estos polímeros, facilitando la solubilidad en agua caliente, la celulosa no sufre degradación mientras que los mananos lineales precipitan fácilmente por la formación de cristales a través de puentes de hidrógeno entre ellos, esta es la causa de la formación de sedimentos durante la fabricación del café soluble, en bebidas y extractos. Los arabinogalactanos poseen estructura helicoidal con ramificaciones de galactano que aportan solubilidad en agua. (Bolivar, 2009)

La fracción lipídica del café, experimenta ligeros cambios durante el tostado. Entre los ácidos grasos predomina el ácido linoleico, seguido del ácido palmítico; además contiene entre otros productos, algunos derivados de ácidos grasos, como araquico, lignocérico y behénico. Entre los diterpenos están el kahweol y cafestol y sus derivados, que constituyen aproximadamente entre el 10 y el 20% de la fracción lipídica del café tostado (Campanha, Diaz, & Benassi, 2010). Los componentes mayoritarios de los esteroides, están compuestos por estigmasterol y sitosterol.

La sustancia nitrogenada más conocida por sus propiedades farmacológicas presente en el café, es la cafeína, aunque existen especies exentas de cafeína. La cafeína forma parte de un complejo molecular hidrófobo con el ácido clorogénico en la proporción molar 1:1.

En el café para beber se encuentra en esta forma alrededor del 1% de la cafeína y el 6% del ácido clorogénico. Con el tostado disminuye solo escasamente la cantidad de cafeína.

La fracción volátil del café tostado tiene una composición muy compleja. En el grupo de compuestos alifáticos se hallan hidrocarburos, alcoholes y sobre todo, compuestos carbonilo, que se originan en el tostado por fragmentación de los carbohidratos. También se encuentran compuestos alicíclicos como diversas ciclopentonas.

Los compuestos aromáticos incluyen abundantes fenoles, que proceden primordialmente de la degradación térmica de los ácidos clorogénicos. Productos de la pirolisis de la sacarosa y otros azúcares se han hallado pirroles, pirazinas, tiofenos tiazoles y oxasoles.

El aroma del café no es estable, cambia con la variedad, el tratamiento y las condiciones de almacenamiento.

1.2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CAFÉ Y SUBPRODUCTOS

La oxidación celular es una de las posibles causas de múltiples enfermedades y del envejecimiento, debido a que el metabolismo celular aeróbico, utiliza dioxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, la producción de especies reactivas de oxígeno conlleva a su reacción con macromoléculas que estén a su alcance (DNA, proteínas, lípidos), alterando su estructura y funcionalidad. (Díaz Acosta & Membrillo Hernandez, 2006)

Diversos estudios a lo largo de la historia, relacionan la calidad de la salud directamente con la dieta, es por esto que las investigaciones en ciencia y tecnología de alimentos se han enfocado en la comprobación de la actividad biológica de sus componentes, en el caso del café, se ha propuesto que el consumo regular de la bebida previene la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer (Nkondjock, 2009), gracias a

su alto contenido en polifenoles, de los cuales los ácidos clorogénicos, se encuentran en cantidad importante respecto a otros alimentos.

Los estudios sobre la actividad antioxidante de café han incluido el grano verde, el grano tostado y la bebida. La extracción de los compuestos antioxidantes de café verde de las especies *Robusta* y *Canephora* y el estudio de su actividad, demostraron que el extracto contenía un total de 31,7% y 32,2% respectivamente de compuestos fenólicos totales, los cuales fueron analizados por el método de Folin-Ciocalteu, aplicando las técnicas DPPH y de actividad atrapadora de radicales OH, se pudo determinar la capacidad antioxidante de estas especies, que fue de 92% y 88%, mientras que el patrón de referencia BHA presentó un 95% de actividad, esto comprueba el efecto positivo de los componentes del grano verde (Madhava, Sulochanamma, Samptu, & Srinivas, 2008), en esta investigación se purificó la fracción de ácidos clorogénicos, ya que a estos compuestos se le atribuye la actividad antioxidante de este alimento.

Los métodos de preparación de la bebida, influyen en la remoción o retención de los compuestos aromáticos y funcionales del café tostado; esta idea motivo a proponer algunas investigaciones sobre la fracción residual de la bebida y su contenido de compuestos fenólicos (Mussatto I., Ballesteros, Martins, & Texeira, 2011), los extractos metanólicos del residuo de bebidas de café comerciales evidencian un contenido máximo de fenólicos correspondiente a 18 mg equivalentes de ácido gálico por gramo material residual seco y una extracción del 89% para estos compuestos, representados por ácidos clorogénicos, flavonoides y protocatequinas. La comparación del efecto de la técnica de extracción de compuestos fenólicos sobre su capacidad antioxidante (Bravo, Monente, Juaníz, De Peña, & Concepción, 2013) permitieron establecer que utilizando agua con un pH cercano a la neutralidad y una cafetera convencional, se obtiene la mayor actividad antioxidante del residuo aplicando las pruebas DPPH y ABTS, los datos reportados son

de 92.98 – 140.30 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de material en ABTS y 38.65- 82.40 $\mu\text{mol Trolox/ g}$ de material e DPPH; estos estudios indican que las técnicas y variables de separación de la fracción soluble del café, condicionan su actividad biológica, por lo que se deben analizar y formular procesos que contribuyan a mantener una composición adecuada.

El análisis del efecto del grado de tostado del café y la capacidad antioxidante de la bebida final (Duarte, De Abreu, De Menezes, Dos Santos, & Gouvea, 2005) demuestra que, esta actividad biológica es directamente dependiente de la concentración de la bebida y que el contenido de polifenoles y ácidos clorogénicos disminuye al aumentar el grado de tostado del grano, estas conclusiones confirman la inestabilidad térmica de estos compuestos, y además permiten establecer la hipótesis que las soluciones concentradas de café presentan una capacidad antioxidante mayor.

El café es una de las bebidas de mayor consumo en el mundo y junto con el té y el vino constituye una de las fuentes potenciales de antioxidantes, sin embargo el método de preparación de la bebida también altera su composición; dentro de los métodos más comunes se encuentran la decocción, infusión y métodos por presión, cada uno de ellos está relacionado con la granulometría del polvo, la relación café/agua, el tiempo y la temperatura de preparación, el estudio de estas condiciones (Nisiteo, Komes, Belzac-Cvitanovic, Horzic, & Budec, 2012) determinó que el café filtrado presenta un contenido menor de compuestos fenólicos y por lo tanto su capacidad antioxidante es menor que la de el café instantáneo, en cuyo orden predominan los ácidos 5-CQA, 4-CQA y 3-CQA, de igual manera se precisa que la adición de leche disminuye la actividad antioxidante del café gracias a la presencia de un complejo formado por los compuestos fenólicos, las proteínas del suero y las caseínas.

1.2.3 ANÁLISIS DE CAFÉ

El uso de la criocentración sobre extractos de café, y el análisis de los efectos generados sobre los componentes térmicamente sensibles, abre la posibilidad de comprobar las bondades de esta tecnología en la obtención de alimentos con excelente calidad nutricional y organoléptica, a continuación se presentan algunos estudios realizados en el análisis de los componentes funcionales del café y otros sistemas alimentarios.

El análisis realizado para determinar la absorción de ácidos clorogénicos (Olthof, Hollman, & Katan, 2006), informa que la fracción de ácidos clorogénicos y ácido cafeico podría inducir a efectos biológicos en la circulación de la sangre ya que inhiben la oxidación del LDL in vitro y podría entonces tener efecto protector contra enfermedades cardiovasculares, en estudio con humanos se encontraron ácidos clorogénicos y ácidos cafeicos en la orina, lo que sugiere que una pequeña parte podría estar presente en la sangre y ser absorbido por tracto gastrointestinal. El ácido clorogénico es el mayor componente fenólico en el café, un tercio es absorbido y puede tener efecto positivo en la circulación, la fracción no absorbida podría tener efectos biológicos en el colón.

En el estudio sobre la influencia del grado de tostado sobre los ácidos clorogénicos (Kwan, SunYoo, & Takayuri, 2009), se utilizó extracción por solventes (metanol:agua 7:3), presentando alta eficiencia de recuperación de estos compuestos, la posterior identificación se llevo a cabo por HPLC. Esta investigación comprobó que la concentración de ácidos clorogénicos se ve afectada por el grado de tostado e identificó que el 5 -CQA es el más abundante CQA en el café y presenta una actividad antioxidante moderada a niveles de 10 µg/ml, esto sugiere que un contenido de 50 – 60 µg/ml en la bebida final podrá tener un efecto medicinal.

El contenido de compuestos fenólicos en diferentes variedades de café con tres grados de tostado, la cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante fueron determinados por métodos de espectroscopia uv-vis mientras el contenido de ácidos clorogénicos y sus derivados fue determinado por HPLC; altos contenidos de ácidos clorogénicos y sus derivados fueron encontrados en los cafés con tostado suave y medio, de la misma manera la capacidad antioxidante correspondió a este patrón de tratamiento. (Hecimovic, Belscack-Cvitanovic, Horzic, & Komes, 2011)

El cafestol y kahweol, son componentes que forman parte de la fracción lipídica del café, los cuales presentan actividad anticarcinogénica y antioxidante; (Campanha, Diaz, & Benassi, 2010) evaluaron la presencia de estos compuestos en muestras de café arábica y café canéfora tostados en diferentes condiciones; el método de extracción fue la saponificación con KOH seguida por una extracción con metil-terbutil-metil éter y limpiada con agua; para la identificación y cuantificación la herramienta fue HPLC inversa, utilizando estándares comerciales de referencia; en esta investigación se pudo concluir que el C+K, no sufren alteraciones significativas con el tostado y que las diferencias en la concentración de cada especie, puede ser un método para su clasificación.

1.3 ANTIOXIDANTES

Las sustancias antioxidantes son aquellas con la capacidad de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, estos son compuestos exógenos (naturales o sintéticos) o endógenos, que actúan por diversos mecanismos como: donando electrones, eliminando la especie oxidante o sus precursores o inhibiendo la formación de especies reactivas; así el sistema antioxidante está formado por compuestos de naturaleza enzimática: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y sustancias no enzimáticas: vitamina E, betacarotenos, Vitamina C, flavonoides y metales de transición (Se , Cu y Zn) (Gilgun-Sherki, Rosenbaum, Melamed, & Offen, 2002).

De acuerdo a (Agudo, 2010), los antioxidantes se pueden clasificar según el modo de acción así:

- **PRIMARIOS:** impiden la formación de radicales libres, debido a la captación de EROs, con esto frenan las reacciones en cadena.
- **SECUNDARIOS:** interrumpen las reacciones de propagación o desplazan a las especies reactivas de oxígeno.
- **TERCIARIOS:** reparan el daño causado por los radicales libres o eliminan las moléculas que se han alterado.

Algunos de los antioxidantes identificados en los productos vegetales son; vitaminas A, C, E, los tocoferoles y la vitamina D son compuestos liposolubles que protegen a la célula de la acción de los radicales libres; flavonoides como la quercitina y catequina, antocianinas están presentes en los frutos de colores, rojo y violeta también mejoran la capacidad de regeneración celular, carotenoides y ácidos fenólicos donde se ubican los ácidos cafeícos y clorogénicos cuya principal fuente es el café y el té inhiben la actividad de agentes mutagénicos y poseen actividad bactericida (Drago, Lopez, & Sainz, 2006).

1.3.1 ANTIOXIDANTES NATURALES

Las plantas se han considerado desde la antigüedad, como una de las fuentes más confiable y al alcance de muchas culturas para la obtención de cura a múltiples enfermedades; estas propiedades farmacológicas son atribuidas a la acción de los metabolitos secundarios producto de reacciones químicas e intervenciones enzimáticas de oxidación, reducción, metilación, isomerización entre otras, de las macromoléculas precursoras; su función celular es aun indefinida, sin embargo, muchas de estas sustancias intervienen en procesos de defensa, evolución y adaptabilidad de las especies. Una de las más importantes actividades biológicas de los vegetales es su capacidad antioxidante, está demostrado que el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides contribuye de manera positiva en los procesos de oxidación celular y al combate de radicales libres (RL).

1.3.2 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

La mayoría de las moléculas biológicas tienen en su estructura enlaces de tipo covalente, en el cual dos átomos comparten un par de electrones en un orbital molecular, sin embargo algunas reacciones del metabolismo celular rompen estos enlaces de manera heterolítica, lo que conlleva a que una de las partes conserve el par electrónico y la otra quede en desequilibrio, como resultado se generan dos nuevas especies estables conocidas como anión y catión respectivamente.

En otras ocasiones, se da un rompimiento homolítico, en el cual cada parte conserva un electrón desapareado, inestable y que son los llamados radicales libres (RL). Estos compuestos pueden tener uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y son totalmente independientes, debido a su alta reactividad arrancan electrones de

moléculas estables, a las cuales oxida, para alcanzar su propia estabilidad, en este proceso la molécula oxidada es ahora un nuevo radical libre ya que tiene un electrón desapareado que se propagará de la misma manera, generando así una reacción en cadena (Quintanar & Calderon, 2009).

El metabolismo normal de las células es capaz de generar radicales libres oxigenados altamente reactivos; los cuales son sustancias que poseen un electrón desapareado y que pueden existir independientemente, ocasionando desordenes en los procesos biológicos normales. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) incluyen el radical superóxido O_2^- , el ozono O_3 , el peróxido de hidrogeno H_2O_2 , el radical óxido nítrico NO_2 , y el radical hidroxilo OH^- , estando implicados en la fisiopatología de varios desordenes clínicos (Castañeda, Ramos, & Ibañez, 2008). También participan de estas reacciones las especies reactivas de nitrógeno (ERN) y los radicales libres, muchos de los cuales pueden generar reacciones en cadena. Las ERN más comunes son; óxido nítrico NO^- , radical del dióxido de nitrógeno (NO_2^-), ácido peroxinitroso $ONOOH$, trióxido de dinitrógeno N_2O_3 .

Las funciones biológicas que pueden generar este tipo de sustancias son respiración mitocondrial, proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, sistemas de defensa, retículo endoplasmático, neurotransmisión, relajación muscular, síntesis de compuestos biológicos (Quintanar & Calderon, 2009), entre otras; pero muchas de las actividades cotidianas también pueden producir radicales libres, entre ellas se encuentran exposición a radiaciones, partículas contaminantes, actividad física intensa, humo de tabaco, dietas y fármacos.

1.3.3 OXIDACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Químicamente la oxidación es definida como la pérdida de electrones, hidrógenos o ganancia de oxígeno para un compuesto, mientras que la reducción es el proceso contrario; por lo tanto una sustancia oxidante es aquella que se reduce al interactuar con otra que se oxida. Este sistema oxido-reducción rige las reacciones de transferencia de electrones en los sistemas biológicos. La figura 2 representa el esquema de formación de radicales libres y las moléculas sobre las cuales actúan.

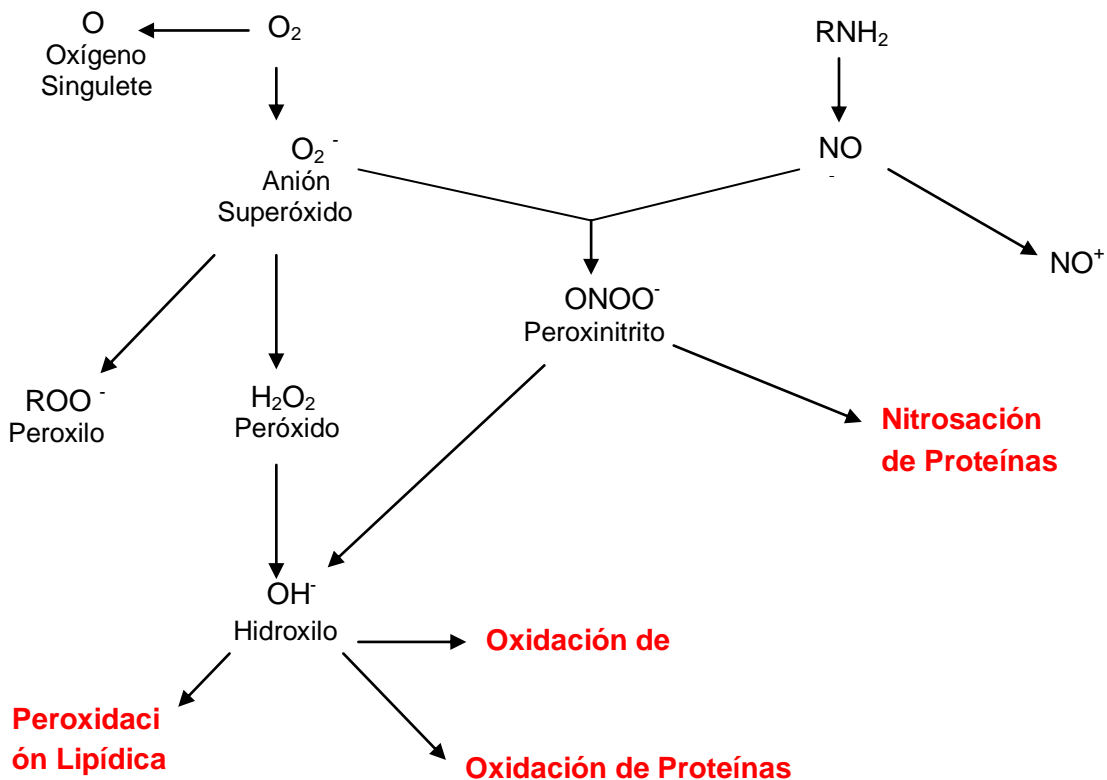


Figura 2. Principales radicales libres y su acción sobre macromoléculas

La oxidación de las moléculas biológicas (proteínas, lípidos, ácidos nucleídos y carbohidratos) es consecuencia de su interacción con el oxígeno y la intervención de

radicales libres; estas macromoléculas son de naturaleza nucleofílica, es decir que tienen electrones en orbitales superficiales los cuales están disponibles para ser compartidos o capturados (oxidación) en reacciones nucleofílicas para formar nuevos compuestos. Los agentes oxidantes son sustancias electrófilas, por lo cual tienen atracción alta por las moléculas nucleofílicas. A bajas concentraciones los radicales libres son necesarios para mantener el buen funcionamiento celular pero su concentración en exceso es lo que conlleva a su toxicidad, de igual manera existen sistemas naturales de defensa que combaten la acción de los RL, sin embargo cuando no son suficientes, se pueden alterar de manera significativa moléculas biológicas y en consecuencia se producen patologías tales como obesidad, diabetes, trastornos neurodegenerativos, cáncer, hipertensión, anemia, entre otros.

- **DAÑO EN EL ADN:** los RL alteran la estructura del ADN por diferentes mecanismos; pueden ser por entrecruzamiento de cromátidas hermanas, daño en la estructura de la desoxirribosa- fosfato, oxidación de bases nitrogenadas, apertura de anillos, liberación de bases y fractura de cadenas. Debido a la naturaleza oxidativa de la mitocondria este ADN presenta mayores modificaciones que el nuclear. La oxidación de las bases nitrogenadas resulta en mutaciones o carcinogénesis, por pérdida de expresión o síntesis de una proteína alterada.
- **DAÑO A PROTEÍNAS:** los ERO alteran la estructura de las proteínas y con ello sus funciones biológicas como las de transporte, regulación e inmunoprotección. Las modificaciones principales se dan por la generación de nuevos enlaces lo que provoca entrecruzamientos, agregaciones y compuestos derivados.
- **DAÑO A LÍPIDOS:** La lipoperoxidación afecta de manera directa la estructura de las membranas celulares haciendo que se pierda su fluidez, permeabilidad e integridad. Los radicales hidroxilo atacan a los ácidos grasos, lipoproteínas,

generando nuevos radicales libres que se propagaran en forma de hidroperóxido y nuevas moléculas de OH, aumentando la oxidación. En este proceso también se pueden formar compuestos volátiles como aldehídos y cetonas que se difunden a otras regiones, dañando así a otras macromoléculas.

- **DAÑO A CARBOHIDRATOS:** en el caso de estos compuestos el daño es menos agresivo, los radicales libres pueden reaccionar con algunos mono y disacáridos para formar sustancias más reactivas, algunos polisacáridos que conforman estructuras biológicas pueden ser fragmentados, alterando sus funciones biológicas.

1.4 METÓDOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La medida de la actividad antioxidante se basa en el efecto de una muestra sobre un radical libre determinado; esta interacción genera cambios que pueden ser detectados instrumentalmente. En general los métodos de determinación deben tener un mecanismo de acción claramente establecido, deben ser sencillos, reproducibles y reaccionar con sustancias de naturaleza lipofílica e hidrofílica. Esta determinación puede ser directa o indirecta, en función de la estrategia utilizada. (Apak, y otros, 2013)

En la determinación directa, el radical libre emite una señal analítica que se puede cuantificar, el antioxidante agregado producirá la disminución de dicha señal, la reacción se contabiliza desde la adición del antioxidante (ABTS, DPPH).

En los métodos indirectos, el antioxidante agregado produce la aparición de un nuevo compuesto o la eliminación de uno ya existente, de esta manera se generan aumentos o disminución en la señal emitida (ORAC, FRAP).

En esta investigación se aplicaron las técnicas de medición directa, que a continuación se describen:

- **METÓDO ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico)**

El fundamento de esta técnica está en la capacidad de las sustancias antioxidantes para estabilizar el radical $ABTS^+$, que es obtenido por oxidación del ABTS; esta oxidación se puede lograr de tres maneras: por acción enzimática (mioglobina, peroxidasas), químicamente (persulfato de potasio, dióxido de manganeso, radicales peroxilo) o por electroquímica.

El radical generado es color azul-verdoso, inestable a luz y con un espectro de absorción en uv-vis. Se puede utilizar en muestras hidrosolubles y liposolubles, solo debe seleccionarse el solvente adecuado.

La adición del antioxidante genera una disminución en la absorbancia a 734 nm, como resultado de la estabilización del radical, que puede darse por transferencia de electrones o de átomos de hidrogeno. Los resultados son expresados como equivalentes de trolox TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity). Se utiliza una curva de calibración. También se pueden expresar como EC_{50} que es la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar el 50% del radical.

- **METÓDO DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazilo)**

El DPPH^{*} es un radical orgánico estable, color violeta que a diferencia del anterior no debe generarse ya que se encuentra disponible en el mercado, en esta técnica también se determina la capacidad del antioxidante para estabilizar el radical libre, gracias a la detección de una disminución en la absorbancia a 517 nm. La interacción entre los compuestos involucrados puede estar determinada por una transferencia de electrones o

de átomos de hidrogeno.los resultados se expresan como equivalentes de trolox. Se hace necesario el uso de una curva de calibración.

- **METÓDO FOLIN-CIICALTEAU**

Este método no determina específicamente actividad antioxidante, aunque esté basado en la capacidad redox de los polifenoles, su estrecha relación con técnicas como DPPH, permiten establecerlo como una herramienta sencilla para predecir esta propiedad.

Se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos por acción del polianión molibdotungstofosforico (Mo VI a Mo V) , produciendo un cambio de color de amarillo a azul, que se mide en el espectrofotómetro a 765 nm.

Los resultados se expresan generalmente como equivalentes de ácido gálico GAE, aunque se pueden utilizar otros patrones como catequinas, ácido cafeíco, ácido ferúlico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la crioconcentración en película descendente, sobre los componentes bioactivos (ácidos clorogénicos y cafeína) y la actividad antioxidante de extractos acuosos de café.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de la crioconcentración en película descendente sobre la concentración de ácidos clorogénicos, cafeína y compuestos fenólicos totales de extracto acuoso de café.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto acuoso de café crioconcentrado en un intervalo de 5 a 10 %mm.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ENSAYOS DE CRIOCONCENTRACIÓN

MATERIALES

Las soluciones de café fueron preparadas a partir de extracto de café liofilizado (Buencafé, Colombia) a una concentración inicial de sólidos totales del 5% m/m. El café fue disuelto en agua destilada a una temperatura 30 °C y sometido a agitación durante 20 minutos para alcanzar la total disolución de los sólidos. La solución obtenida fue refrigerada a 4 °C durante 12 horas. En el momento de iniciar los ensayos, la concentración de sólidos fue ajustada por medición con refractometría.

3.1.1 PROTOCOLO DE CRIOCONCENTRACIÓN

La crioconcentración fue realizada utilizando la técnica de película descendente reportada por (Raventós, Hernández, Auleda, & Ibarz, 2007), (Sánchez, Ruíz, Auleda, Hernández, & Raventós, 2009). La técnica se basa en la formación de un cristal de hielo sobre una placa de enfriamiento en la cual desciende el fluido a crioconcentrar.

Para el experimento se utilizó un equipo de placas mostrado en la figura 3 y detallado en la figura 4. El equipo consta de una placa de enfriamiento (1) de acero inoxidable, dentro de la cual circula de manera continua una mezcla etilenglicol-agua al 53% m que se usó como fluido refrigerante y que ingresa por el punto (6) , y retorna por el punto (7) . La temperatura del fluido fue controlada por medio de una baño termostático (2) (Polystat, USA) con intervalo de temperaturas de -30 a 150 °C \pm 0.01°C.

La solución de café es dispersada desde un tubo de PVC (3) provisto de orificios circulares dispuestos de forma lineal a lo largo de éste, de tal manera, se logra que el

líquido forme una fina capa sobre la placa de enfriamiento y caiga en el recipiente de almacenamiento(4) como se observa en la figura 5 . La solución de café es recirculada de forma continua dentro del equipo mediante una bomba peristáltica (5) (Master Flex, Mode 77601-10, USA) con un rango de 0-18 L/min, operada a un caudal entre 40 – 60 mL/s, a través de un sistema de conducción (8) que permite la conexión del tanque de almacenamiento con el tubo dispersante de la muestra. Durante este proceso el agua contenida en la muestra entra en contacto con la placa y se congela (10). El equipo está cubierto por una placa de separación (9) que mantiene el sistema térmicamente aislado.

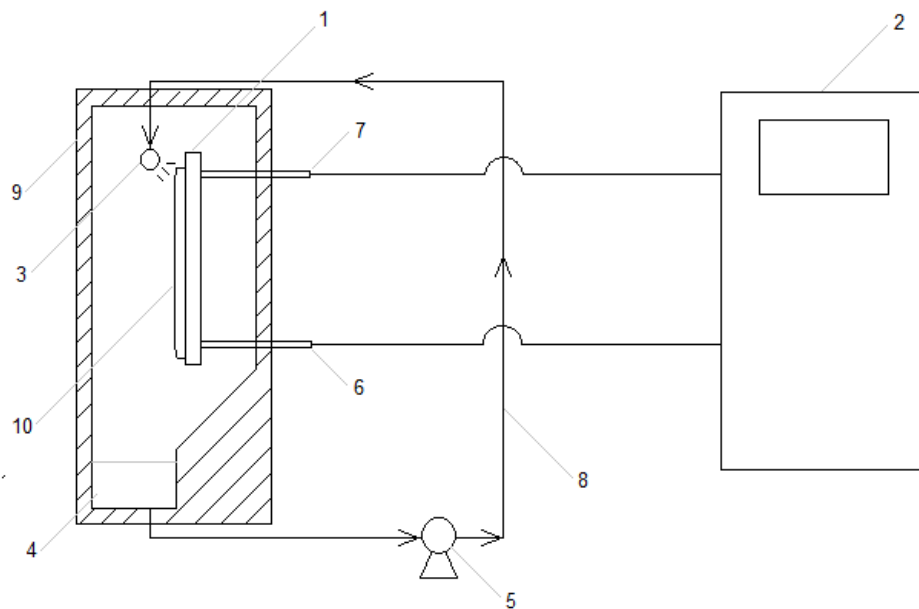


Figura 3. Esquema del equipo utilizado



Figura 4. Equipo de crioconcentración utilizado

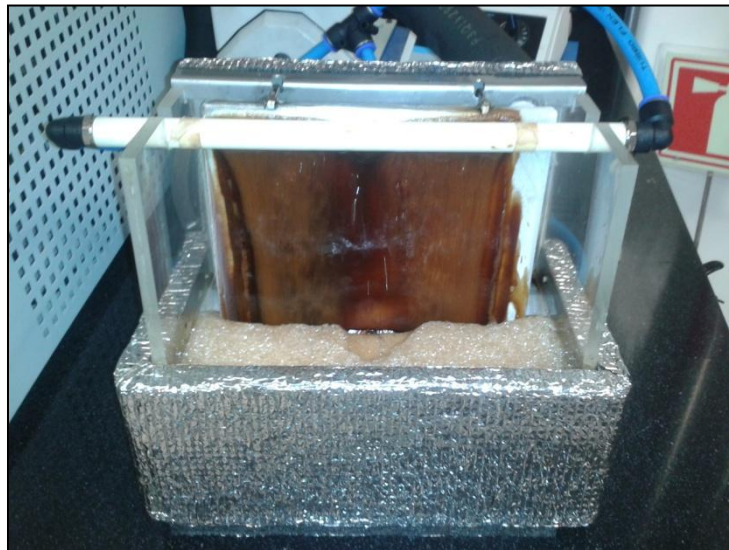


Figura 5. Funcionamiento del crioconcentrador utilizado

Los parámetros del ensayo de CC se muestran en la tabla 2. Se ajustó la temperatura del fluido refrigerante y una vez alcanzado este valor la solución de café preparada fue cargada al equipo y se inició el bombeo. La solución concentrada fue recuperada en el fondo del equipo y separada a través de mangueras por acción de la gravedad. Los cristales de hielo formados en la placa fueron retirados aumentando la temperatura del sistema de refrigeración hasta 10 °C.

Tabla 2. Parámetros de Crioconcentración

Masa inicial	800 g
Concentración inicial	5 % m/m
Temperatura refrigerante	-20°C
Caudal de la solución de café	42,5 – 59,7 mL/s

3.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las soluciones de café fueron concentradas en dos etapas de acuerdo con el esquema mostrado en la figura 6. Haciendo un seguimiento en el contenido de sólidos disueltos en la solución cada 30 minutos, para lo cual se utilizó un refractómetro POCKET PAL-BX/RI (Atago, Japón). Los grados Brix medidos en las muestras fueron convertidos a porcentaje de sólidos totales utilizando la relación $\%Sólidos = 0.87 \cdot Brix$, reportada por (Moreno, Robles, Sarmiento, Ruíz, & Pardo, 2013). Cada etapa fue finalizada cuando se alcanzó un índice de concentración entre 1,4 y 1,5. Se determinó el índice de refracción y las masas para la solución concentrada y la fracción de hielo obtenidas en cada etapa y finalmente fueron almacenadas en frascos ámbar a temperatura de refrigeración para el análisis posterior de componentes bioactivos. Se realizaron tres réplicas de cada etapa.

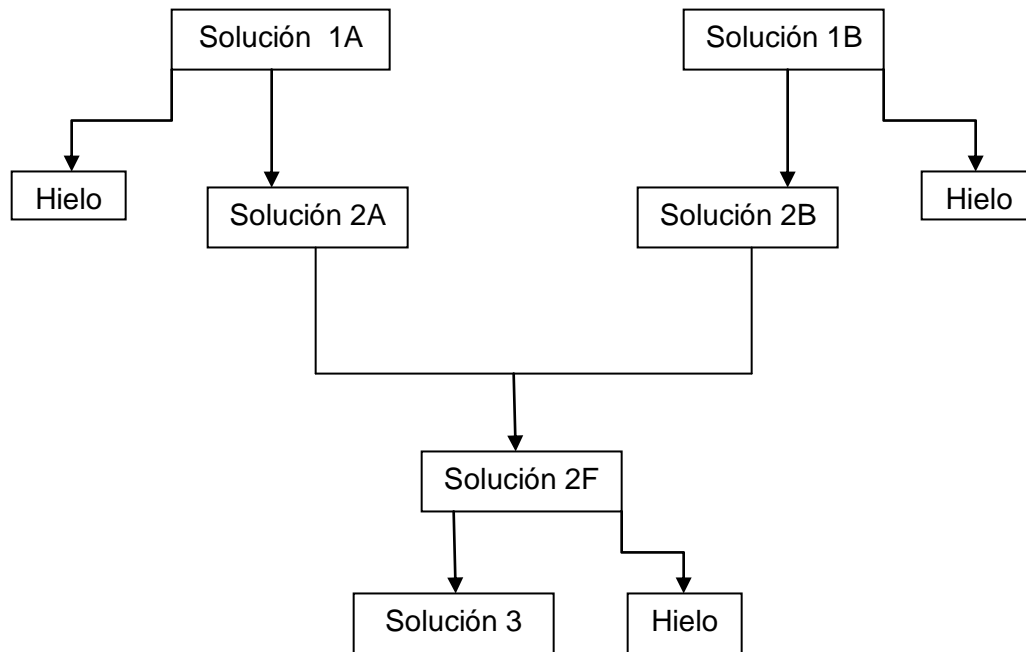


Figura 6. Esquema general del proceso de criocentración

3.1.3. VARIABLES DE RESPUESTA

Para las soluciones concentradas y la fracción de hielo obtenidas en cada etapa y de manera global fueron determinados los siguientes parámetros de criocentración:

COEFICIENTE DE REPARTO K

Es una medida de la cantidad de soluto que está ocluido en el hielo. Se define por la ecuación 1: (Miyawaki, Liu, Shirai, Shakashita, & Kagitani, 2005).

$$K = \frac{ch_f}{Cs_f} \quad (\text{Ec 1.})$$

Donde:

Csf = concentración de sólidos en la solución final.

Chf = concentración de sólidos en el hielo obtenido.

EFICIENCIA DE CRIOCONCENTRACIÓN (eff)

Es una medida de la recuperación de sólidos en la solución crioconcentrada respecto a la cantidad de sólidos que se ha atrapado en el hielo. Se define por la ecuación 2 (Raventós, Hernández, Auleda, & Ibarz, 2007).

$$eff = \frac{C_{sf} - C_{hf}}{C_{sf}} * 100 \quad (\text{Ec 2.})$$

Donde:

Csf = concentración de sólidos en la solución final.

Chf = concentración de sólidos en el hielo obtenido.

FRACCIÓN DE DESCONGELACIÓN (f)

Es la cantidad de solución que permanece en estado líquido respecto a la solución original, es un indicativo del rendimiento de la operación en cuanto a la masa recuperada (Nakagawa, Nagahama, Meabashi, & Maeda, 2010).

$$f = \frac{m_{snf}}{m_{sni}} \quad (\text{Ec 3.})$$

Donde:

m_{snf} = masa de la solución final.

m_{sni} = masa de la solución inicial.

ÍNDICE DE CONCENTRACIÓN (IC)

Representa la cantidad de veces que ha sido incrementada la concentración de la solución. Se define por la ecuación 4 (Miyawaki, Liu, Shirai, Shakashita, & Kagitani, 2005).

$$IC = \frac{c_{sf}}{c_{si}} \quad (\text{Ec 4.})$$

Donde;

C_{sf} = concentración de la solución final.

C_{si} = concentración de la solución inicial.

EFICIENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Indica el aumento de polifenoles en la solución concentrada con relación al total de polifenoles que se retienen en el hielo. (Belén, Sánchez, Hernández, Auleda, & Raventós, 2012).

$$PE = \frac{PCCn - PCLn}{PCCn} * 100 \quad (\text{Ec 5.})$$

Donde;

PCCn: mg de polifenoles por mL en fluido concentrado.

PCL: mg de polifenoles por mL en el hielo.

3.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

MATERIALES

Para la identificación y cuantificación de las señales se usaron como patrones de referencia soluciones de concentración conocida de ácidos 3-O-cafeoilquínico (Sigma-Aldrich), 4-O-cafeoilquínico (Sigma-Aldrich) y cafeína (Sigma-Aldrich). La cuantificación fue llevada a cabo mediante interpolación de la señal de las muestras en curva de calibración preparada con soluciones de concentración conocida de cada uno de los patrones de referencia preparados en mezcla de metanol:ácido acético 2% (4:6). Se analizó la solución inicial, la solución final y su fracción de hielo.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se llevó a cabo la identificación y cuantificación de los ácidos clorogénicos 3-O-cafeoilquínico, 4-O-cafeoilquínico y cafeína, mediante RP-HPLC, en muestras acuosas de café, con base en la metodología utilizada por Fujioka y Shibamoto, 2008 para análisis de bebidas de café.

Para la preparación de las soluciones analizadas se tomaron 5 mL de las muestras acuosas de café, se transfirieron a balón aforado de 25 mL, se agregaron 10 mL de metanol, se llevaron a ultrasonido por 10 minutos con agitación ocasional y se completaron a volumen con ácido acético 2%. Las muestras fueron filtradas por membrana de 0,45 µm para eliminar partículas sólidas remanentes y se inyectaron 25 µL de cada una en el cromatógrafo.

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un cromatógrafo LaChrom (Merck-Hitachi, Germany-Japan) equipado con una bomba cuaternaria, sistema de desgasificación en línea y un detector de arreglo de diodos (UV/VIS). La separación fue llevada a cabo en

una columna de fase inversa Gemini C18 de 250 mm x 4.6 mm y 5 μ m (Phenomenex, USA) a una temperatura de 25 °C, a un flujo de 1,0 mL/min. y detección a 325 nm para ácidos clorogénicos y 276 nm para cafeína. La fase móvil usada consistió en un gradiente de fase móvil A (ácido acético 2%) y fase móvil B (metanol) de acuerdo al programa presente en la tabla 3:

Tabla 3. Gradiente fase móvil RP-HPLC

Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
0	96	4
10	96	4
65	85	15
75	75	25
85	25	75

Mediante este método fue posible la separación, identificación y cuantificación de los ácidos clorogénicos y la cafeína presentes en las muestras. La identificación de los distintos compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los tiempos de retención de las señales en las muestras con los obtenidos para las señales de los estándares.

3.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.3.1 COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos, cada una de las muestras obtenidas en el proceso de crioconcentración en las etapas 1 y 2 (solución inicial, solución concentrada y fracción de hielo) fueron diluidas 1:100 con agua destilada. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro v-vis (IMARK microplate reader, BIO-RAD.). Las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas.

PROTOCOLO DE OPERACIÓN

La determinación de compuestos fenólicos se realizó utilizando el método Folin-Ciocalteu, descrito por (Ramalakshmi, Rao, Takano-Ishikawa, & Goto, 2009) con algunas modificaciones. En este ensayo, 10 μL de cada muestra (solución inicial, soluciones concentradas y fracción de hielo) fueron diluidas con agua destilada 1:100; posteriormente fueron adicionados en cada pozo del microplato 180 μL de agua destilada, 30 μL de muestra; 15 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) y 45 μL de carbonato de sodio (2%pv), completando el volumen con 30 μL de agua destilada. Las muestras fueron incubadas por dos horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia a 750 nm.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por interpolación de las lecturas de las muestras en la curva de calibración de ácido gálico (Merck) en metanol con concentraciones de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 75 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los patrones fueron tratados de igual manera que la muestra. El resultado se expresó como

equivalentes de ácido gálico (GEA) en mg por 100 g de materia seca de café y mg GEA / mL de solución. El ensayo se realizó por triplicado.

3.3.2 METODOLOGÍA ABTS

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para la determinación de la actividad antioxidante, cada una de las muestras obtenidas en el proceso de crioconcentración en las etapas 1 y 2 (solución inicial, solución concentrada y fracción de hielo) fueron diluidas 1:1000 con agua destilada. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro v-vis (IMARK microplate reader, BIO-RAD.). Las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas.

PROTOCOLO DE OPERACIÓN

Para el desarrollo de este ensayo se utilizó radical ABTS (Merck), el cual fue necesario activar; esto se logró adicionando persulfato de potasio 12.5 mM preparado en 10% de buffer fosfato pH 7,4 y agua destilada, a una solución de ABTS 3,5 mM preparada con anterioridad, posteriormente se almaceno a 4°C en completa oscuridad durante 12 horas. La solución obtenida es estable por 48 horas. Antes del análisis la absorbancia de la solución fue ajustada a $0,8 \pm 0,2$ nm .

Para la determinación de la actividad antioxidante; 200 µL de ABTS + fueron adicionados a 50 µL de muestra y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos en completa oscuridad; transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la absorbancia a 735 nm.

La curva de calibración se realizó con trolox (ácido 6 – hidroxil- 2,5,7,8 –tetrametilcroman carboxílico) marca Sigma – Aldrich, a diferentes concentraciones (3µL/mL; 6µL/mL; 7,5 µL /mL; 9µL/mL; 12µL/mL ; 15µL/mL) y la capacidad antioxidante se expresó como concentración equivalente a la actividad de trolox (TEAC) en g / 100 gramos de materia seca de café esto para base seca y mg TEAC/ mL para base solución. (Bravo, Monente, Juaníz, De Peña, & Concepción, 2013). Las muestras fueron analizadas por triplicado utilizando metanol como blanco.

3.3.3 METODOLOGÍA DPPH

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para la determinación de la actividad antioxidante, cada una de las muestras obtenidas en el proceso de crioconcentración en las etapas 1 y 2 (solución inicial, solución concentrada y fracción de hielo) fueron diluidas 1:1000 con agua destilada. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro v-vis (IMARK microplate reader, BIO-RAD.). Las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas.

PROTOCOLO DE OPERACIÓN

La solución de DPPH fue preparada a una concentración de 0,6 mM en metanol (Merck); la absorbancia fue ajustada a 1,1 nm antes del ensayo. Para el análisis, 50 uL de DPPH fueron adicionados a 75 µL de cada muestra; se midió la absorbancia a 515 nm después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en completa oscuridad.

La calibración se realizó con trolox Sigma-Aldrich a diferentes concentraciones (3µL/mL; 6µL/mL; 7,5µL/mL; 9µL/mL; 12µL/mL ; 15µL/mL) y la capacidad antioxidante se expresó

como g TEAC trolox/100 gramos de materia seca de café y mg TEAC/ mL de solución. El ensayo se realizó por triplicado utilizando metanol como blanco.

3.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis fueron desarrollados por triplicado y los resultados se muestran como el valor de la media y su desviación estándar. Se estableció una correlación entre las variables por medio de la prueba de correlación de Pearson. Los análisis fueron desarrollados usando el software SPSS.

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 CRIOCONCENTRACIÓN

4.1.1 RESULTADOS GLOBALES

El seguimiento de la evolución del proceso de crioconcentración se realizó mediante la determinación de las variables de respuesta. El contenido de sólidos en la solución concentrada y en la fracción de hielo obtenidas permitió establecer la eficiencia de la operación.

La figura 7 corresponde al diagrama de proceso de la crioconcentración; en él se reportan los flujos de entrada y salida en cada etapa y su respectiva concentración de sólidos en porcentaje.

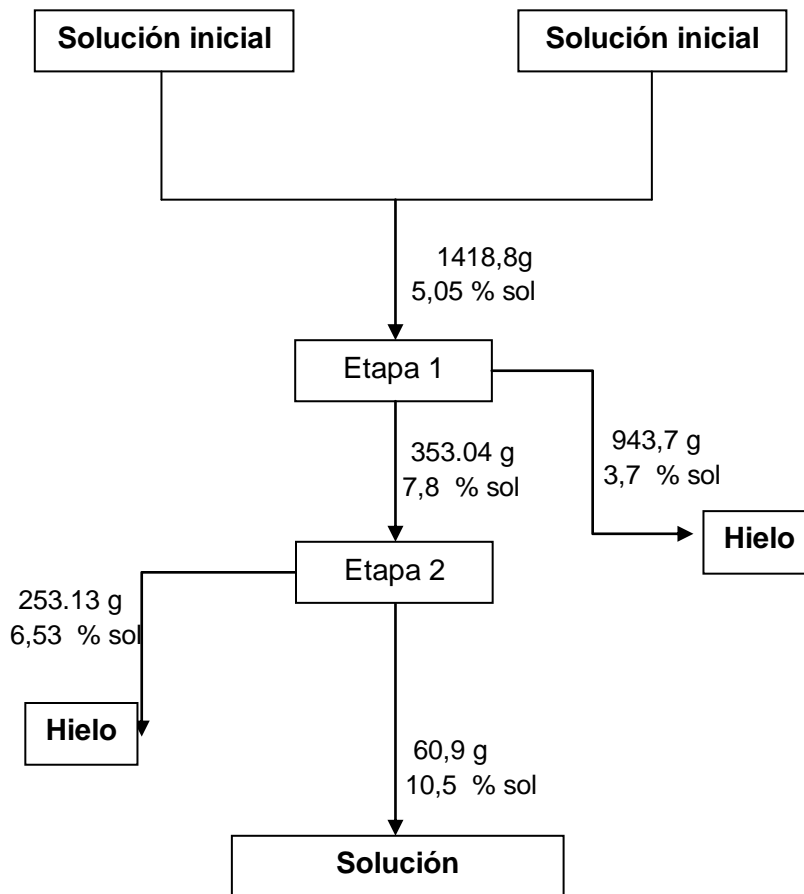


Figura 7. Diagrama del proceso de crioconcentración.

Los datos reportados para el balance de materia (Tabla 4) demuestran que la cantidad de sólidos totales en la solución aumentó 154,45% en la etapa 1 y 208,51% en la etapa 2 con respecto a la solución inicial, el contenido de sólidos retenidos en el hielo aumentó progresivamente 74,06% en la etapa 1 y 129,30% en la etapa 2 comparando con la solución inicial, estos datos permiten comprobar que el aumento de la concentración en la solución influye en la pureza de los cristales de hielo obtenidos en la crioconcentración. Las diferencias entre la masa de la solución inicial y las masas de solución final y hielo corresponde a las pérdidas generados por el equipo correspondientes al producto que queda atrapado en los ductos y en el equipo.

Tabla 4. Balance de materia

BALANCE DE MATERIA								
Etapa	Muestra	Peso (g)	DE	Volumen (mL)	% Sólidos	DE	Cont. sólidos (g)	DE
1	Sln i	1418,83	43,2	1361,64	5,05	0	71,59	2,2
	Sln c	353,04	20,6	338,81	7,80	0,431	27,50	0,9
	Hielo	934,76	78,2	897,09	3,74	0,185	35,05	4,4
2	Sln i	336,26	8,2	322,71	7,74	0,452	26,03	1,5
	Sln c	60,99	7,0	58,53	10,53	0,314	6,44	0,9
	Hielo	253,13	23,9	242,92	6,53	0,44	16,45	0,5

***Promedio de tres medidas y su desviación estándar.**

El índice de concentración presentó un aumento lineal (fig. 8) durante el proceso, al finalizar la etapa 2 se logró duplicar (IC 2,09) la concentración de la solución como se indica en la tabla 4, en un tiempo promedio de cuatro horas. En el estudio realizado por Hernández et al. 2009 para crioconcentración de jugo de manzana y pera se obtuvo un CI de 2,08 y 2,35 en 14 horas, partiendo de soluciones de concentración inicial de 14,5 y 13,1 °Bx; la diferencia en el tiempo de operación se debe a la concentración de las soluciones de partida, debido a que viscosidades altas limitan la eficiencia de este proceso y también a la diferencia en la escala de operación.

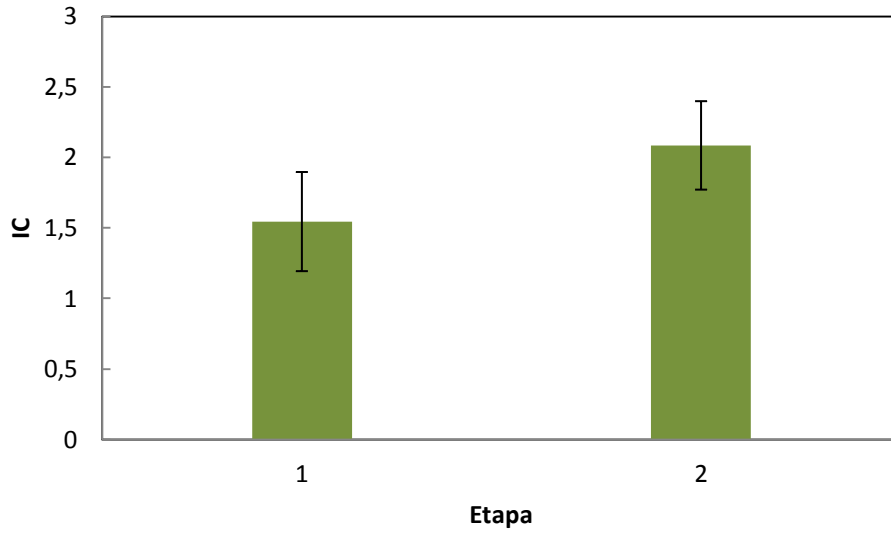


Figura 8. Seguimiento índice de concentración.

La eficiencia de crioconcentración decreció con el aumento de la concentración en la solución inicial (fig. 9); para las etapas 1 y 2 se alcanzaron valores de 51,92% y 38,06% respectivamente.

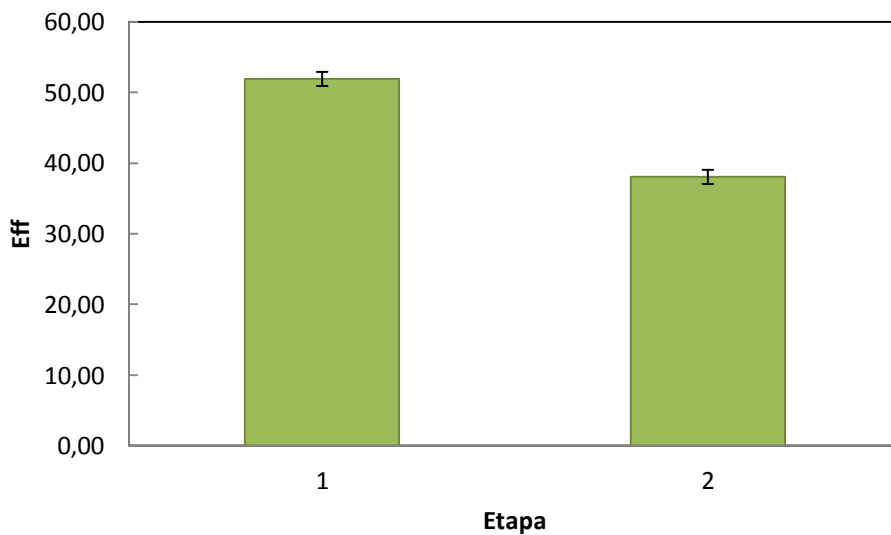


Figura 9. Eficiencia

La disminución de la eficiencia de crioconcentración se explica por la mayor concentración de sólidos presentes en la etapa 2. Con el aumento de la concentración en la solución, los solutos tienden a desplazarse por difusión hacia la fracción de menor concentración, los sólidos presentes en la interfase liquido-sólido tienen gran dificultad para moverse y quedan fácilmente atrapados en el hielo que se está formando (Hernández, Raventós, Auleda, & Ibarz, 2009), por lo tanto el contenido de solutos retenidos en la fase sólida aumenta a medida que se logra concentrar la solución en cada etapa y con esto la eficiencia tiende a disminuir.

La disminución de la eficiencia se demuestra por la mayor oclusión de sólidos, como lo indica el aumento del coeficiente de reparto que presentó valores de 0,48 en la etapa 1 y 0,62 en la etapa 2; según se observa en la figura 10.

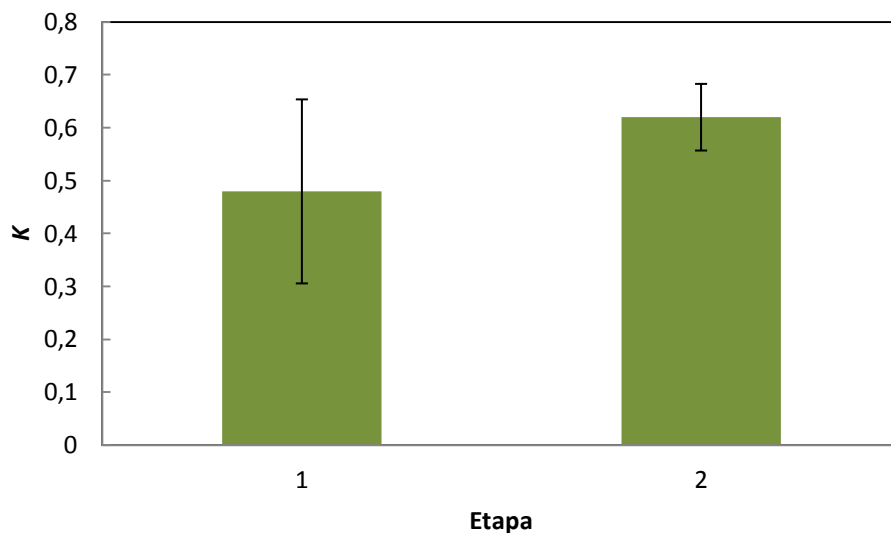


Figura 10. Coeficiente de reparto

La oclusión de los sólidos se incrementó debido a que un mayor contenido de sólidos genera una mayor interacción con la red de cristales de hielo que se está formando. De igual manera las melanoidinas que son compuestos de alto peso molecular solubles en

agua y están presentes en un 25% del peso del café seco (Del Pino, 2011) podrían disminuir la velocidad de flujo de los solutos debido a su tamaño lo que contribuye a favorecer su oclusión dentro de las fracciones de hielo en formación.

El rendimiento de la operación también se determina en términos de la fracción de descongelación, que fue de 0,25 y 0,04 en la etapa 1 y 2 respectivamente. La cantidad de solución que permaneció en estado líquido respecto de la solución original decreció durante el transcurso de las etapas, lo que se puede observar en la figura 11.

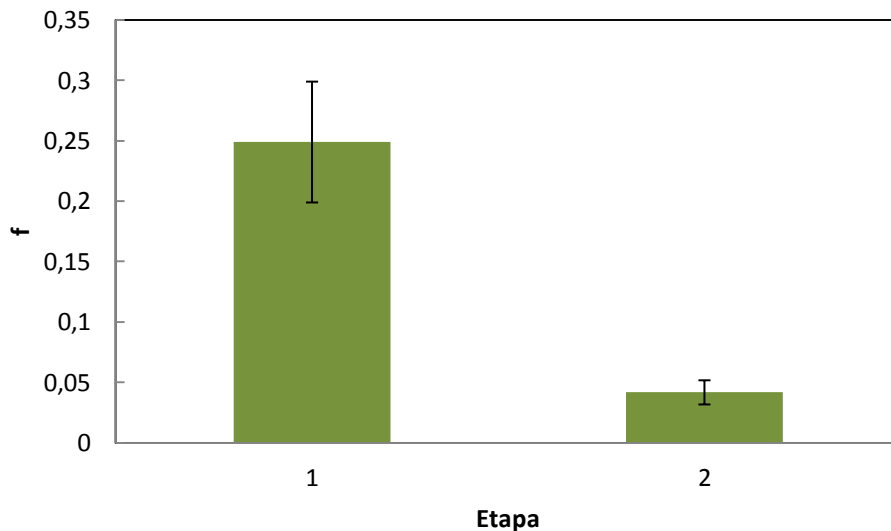


Figura 11. Fracción de descongelación

Durante la operación la masa de hielo formada fue superior a la fracción líquida recuperada, de otro lado la gran cantidad de espuma formada y congelada sobre el hielo atrapó una cantidad significativa de líquido sumado a las pérdidas por operación del equipo. En la primera etapa la solución concentrada correspondió al 24,88% de la masa inicial del flujo mientras que el hielo obtenido representó el 66,51%; en la segunda etapa la fracción de hielo aumento al 75,2% y el porcentaje de líquido concentrado disminuyó a

18,13%. De manera global la solución final obtenida equivale al 4,29% de la solución de partida.

Una recomendación de importancia para la implementación de la crioconcentración en película descendente es evitar la formación de espuma con el adecuado diseño de los equipos y la posibilidad de utilizar antiespumantes aprobados para productos alimentarios, con el fin de mejorar el desarrollo de la operación.

En los primeros minutos del proceso se pudo observar que la caída del extracto sobre el recipiente de recolección en el equipo, favoreció la incorporación de aire en la matriz generando formación de espuma, la cual alteró la distribución del fluido y la transferencia de calor sobre la placa.

En la tabla 5 se muestra el resumen de las principales variables de respuesta del proceso global de la crioconcentración.

Tabla 5. Variables respuesta del proceso de crioconcentración

Etapa	Cl	Xs	eff	f	K
0	1	5,05			0
1	1,55	7,8	51,92	0,25	0,48
2	2,09	10,53	38,06	0,04	0,62

4.1.2 RESULTADOS POR ETAPAS

A continuación se presenta el análisis de cada etapa de manera individual.

El desarrollo de la crioconcentración se realizó en dos etapas consecutivas, aunque debido al tamaño del equipo y su capacidad, fue necesario realizar dos lotes para la

primera etapa, cada uno con un volumen aproximado de 700 a 750 mL en cada replica para obtener en promedio 338, 81 mL de solución final.

La figura 12 corresponde a la evolución del índice de concentración de las tres replicas para la etapa 1; el criterio establecido para determinar su finalización fue el IC. En esta figura se puede observar un aumento progresivo con el transcurso del tiempo, sin embargo los tiempos utilizados para alcanzar un IC de 1,5 fueron diferentes, en la réplica 1 después de 150 min, no hubo un aumento en la concentración.

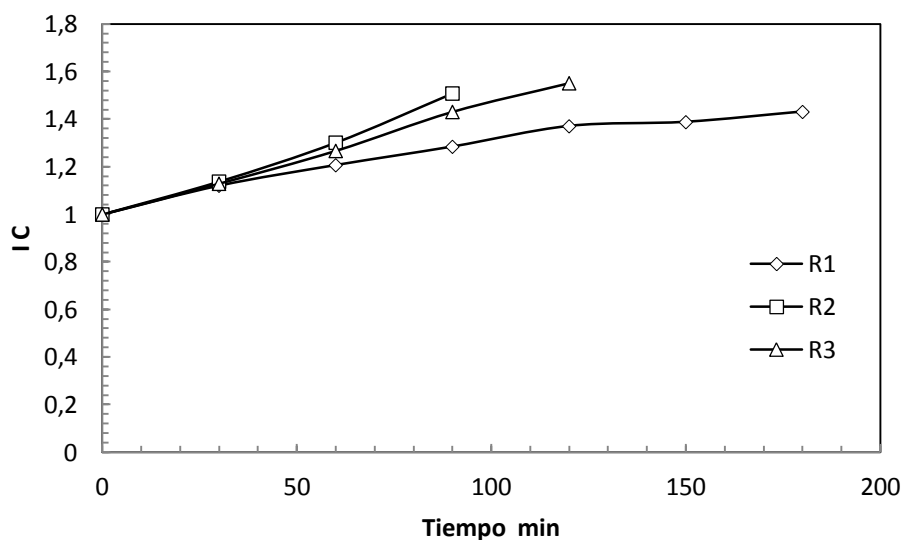


Figura 12. Seguimiento índice de concentración etapa 1

En la etapa 2 el tiempo empleado en las tres replicas fue el mismo y el IC final fue de 1,36 en promedio, en la figura 13 se muestra el comportamiento de esta variable para la etapa final del proceso; en comparación con los valores de la etapa 1 se demuestra que a mayor concentración en la solución de partida la eficiencia de la operación decrece.

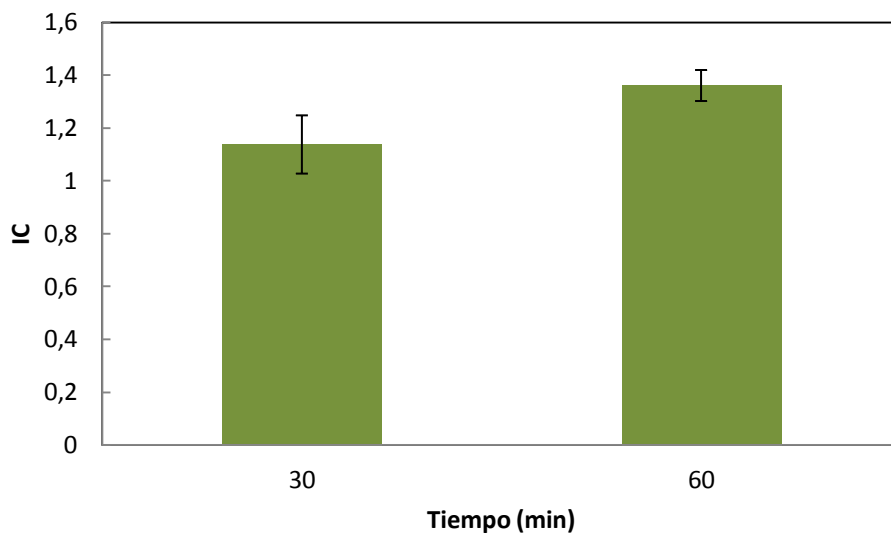


Figura 13. Seguimiento índice de concentración etapa 2

Los valores para las variables de respuesta en cada etapa se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6. Variables respuesta del proceso de crioconcentración por etapas

Etapa	K	DE	Eff	DE	f	DE	IC	DE
1	0,48	0,042	51,9	4,21	0,29	0,08	1,53	0,07
2	0,61	0,024	38,1	2,39	0,20	0,03	1,36	0,06

En la etapa 2 la cantidad de sólidos retenidos en la fracción de hielo (k) es mayor, de igual manera la fracción de descongelación fue menor en la etapa 2. Estos resultados coinciden con los reportados por Hernández y colaboradores en 2009 en la crioconcentración de mosto utilizando la técnica de película en cuatro etapas, en donde la eficiencia del proceso disminuyó conforme se aumentaba el contenido de sólidos en la solución, esta misma tendencia es reportada para soluciones de azúcares simples. (Raventós, Hernández, Auleda, & Ibarz, 2007)

Las diferencias entre la primera y la segunda etapa también se pueden deber a que la tasa de producción de hielo cuando las concentraciones son bajas, está influenciada por la alta diferencia de temperatura del líquido con el refrigerante (Sánchez, Ruíz, Auleda, Hernández, & Raventós, 2009), que con el aumento de sólidos y la formación de espuma disminuye afectando directamente la eficiencia de la concentración.

4.2 CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

4.2.1 CONTENIDO DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS Y CAFEÍNA

La determinación del contenido de ácido 3-CQA, 4-CQA y cafeína, se realizó por RP-HPLC. Los anexos 2.1, 2.2 y 2.3 corresponden a la curva de calibración para cada compuesto respectivamente.

Resultados ácidos clorogénicos y cafeína

El análisis del contenido de ácidos clorogénicos y cafeína después de la crioconcentración, se realizó comparando los valores obtenidos en la solución y la fracción de hielo finales, con respecto a la solución inicial. Los valores encontrados por RP-HPLC para cada compuesto se reportan como contenido en base húmeda y base seca respectivamente. En las figuras 14 y 15 se muestran los cromatogramas obtenidos para cafeína y ácidos clorogénicos respectivamente. Los cromatogramas completos se presentan en el anexo 1.

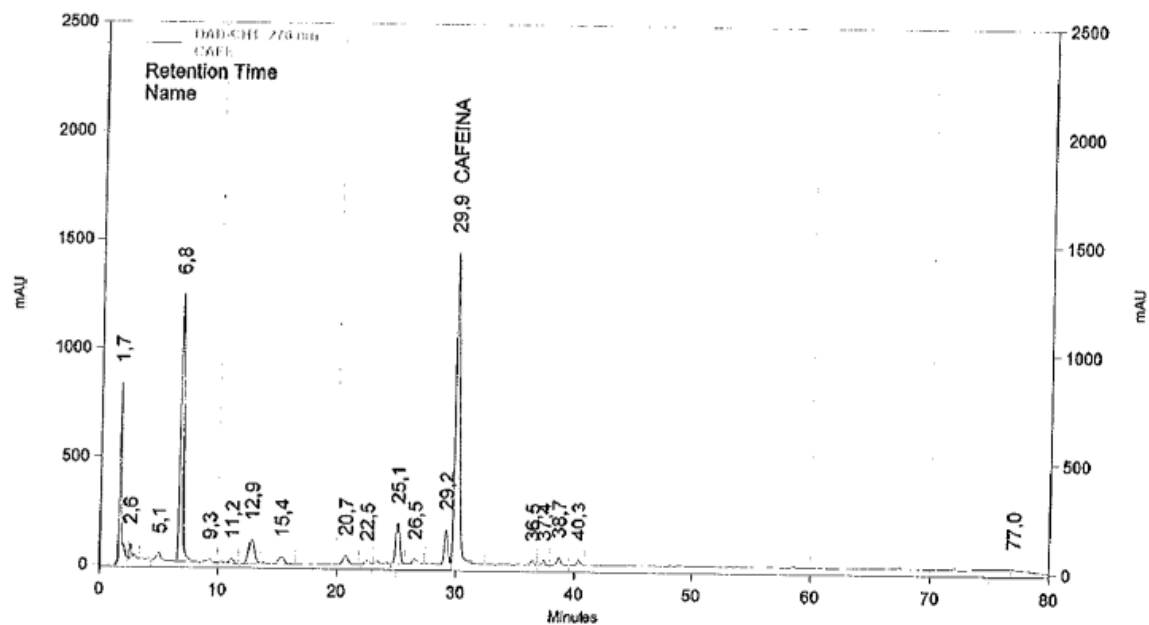


Figura 14. Cromatograma típico de cafeína

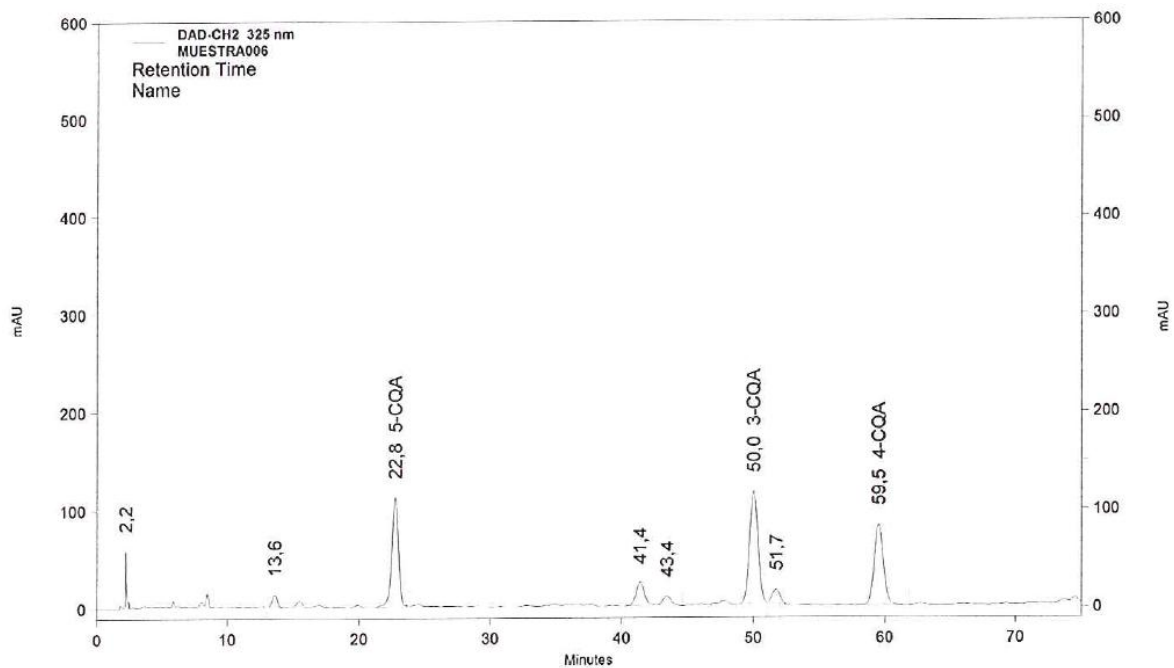


Figura 15. Cromatograma típico del 5-CQA y 4-CQA

En la figura 15 se observa la presencia de los ácidos 5-CQA, 3-CQA y 4-CQA con señales a los 22, 50 y 60 minutos respectivamente, para la solución de café.

Los ácidos clorogénicos son ésteres formados entre ácidos transcinámicos (cafeíco) y el ácido quínico y se dividen de acuerdo a la naturaleza, número y posición de los sustituyentes cinámicos. El ácido cafeoilquínico es el más abundante en el café verde, su contenido disminuye considerablemente durante el tostado, sin embargo se producen isómeros que contribuyen a mantener su presencia en el producto final. Dentro de los más importantes se encuentran los ácidos monocateoilquínicos 3-CQA y 4-CQA analizados en esta investigación.

Los valores obtenidos para el contenido de cada metabolito en base húmeda y el índice de concentración para la solución final y el hielo, presentados en la tabla 7, indican un aumento significativo de los tres compuestos en la solución final.

Tabla 7. Contenido de compuestos bioactivos en base húmeda

Muestra	3-CQA			4-CQA			CAFEÍNA		
	mg/mL	DE	IC	mg/mL	DE	IC	mg/mL	DE	IC
Sln 1	0,29	0,01		0,20	0,00		1,21	0,01	
Sln 3	0,60	0,03	2,1	0,42	0,02	2,1	2,58	0,13	2,1
Hielo 3	0,38	0,01	1,3	0,26	0,01	1,3	1,62	0,07	1,3

* Promedio de tres medidas y su desviación estándar.

En la figura 16 se observa que los valores de concentración más altos se alcanzaron para la solución 3, siendo la cafeína el compuesto más abundante, seguido por el 3-CQA y finalmente el 4-CQA, en las tres muestras analizadas. El índice de concentración para los tres metabolitos en la solución final fue de 2,1 lo que demuestra que se duplicó su contenido con respecto a la solución inicial; en cuanto al hielo se reporta un IC de 1,3 que corresponde a un leve aumento de concentración.

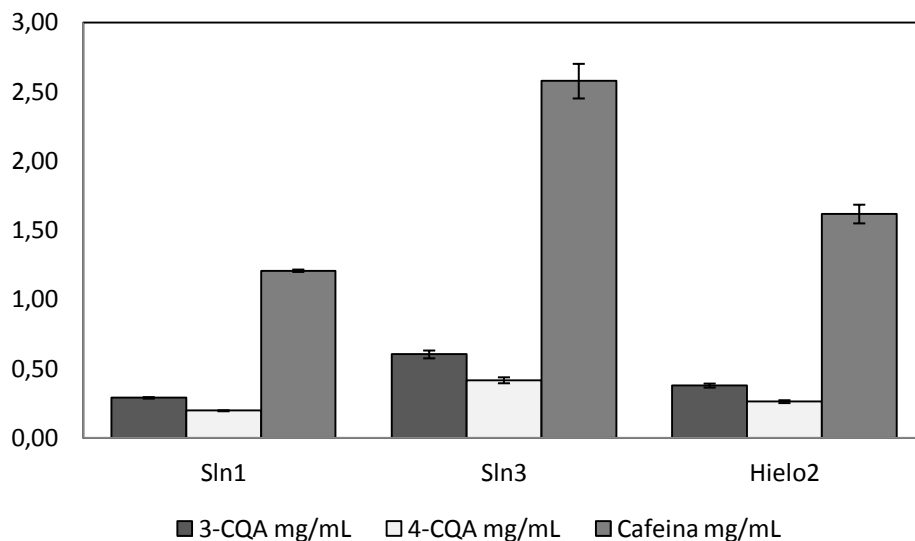


Figura 16. Contenido de 3-CQA, 4-CQA y cafeína en la solución inicial, solución y fracción de hielo finales en mg/mL de solución.

Los índices de concentración para estos componentes en base húmeda son semejantes a los correspondientes a sólidos solubles en las dos fracciones, lo que comprueba que los componentes bioactivos se distribuyen en forma proporcional al contenido de sólidos totales en el hielo y en el líquido concentrado, estos resultados demuestran los beneficios de la crioconcentración para preservar los componentes bioactivos presentes en sistemas alimentarios.

Teniendo en cuenta que el contenido de compuestos bioactivos depende de la cantidad de sólidos totales presentes en la solución, se hizo necesario expresar los resultados anteriores en base seca.

El índice de concentración determinado para la solución concentrada y el hielo final en los dos casos alcanzó un valor de 1, permitiendo establecer una relación directa de estos

componentes con los sólidos disueltos en la solución de café. En la tabla 8 se presentan los valores del contenido de 3-CQA, 4-CQA y cafeína y los respectivos índices de concentración.

Tabla 8. Contenido de compuestos bioactivos en base seca

Muestra	3-CQA			4-CQA			CAFEÍNA		
	g/100 g	DE	IC	g/ 100 g	DE	IC	g/100 g	DE	IC
Sln 1	0,0055	0,0001		0,0037	0,0001		0,0229	0,0002	
Sln 3	0,0055	0,0003	1,0	0,0038	0,0002	1,0	0,0235	0,0011	1,0
Hielo 3	0,0055	0,0002	1,0	0,0038	0,0002	1,0	0,0238	0,0010	1,0

* Promedio de tres medidas y su desviación estándar.

La figura 17, corresponde al comportamiento de cada metabolito en la fracción de materia seca de las soluciones y en el hielo final durante la crioconcentración; en esta se observa que la cantidad de cada compuesto no fue afectada por las condiciones de la operación ya que el contenido se mantuvo estable en cada muestra.

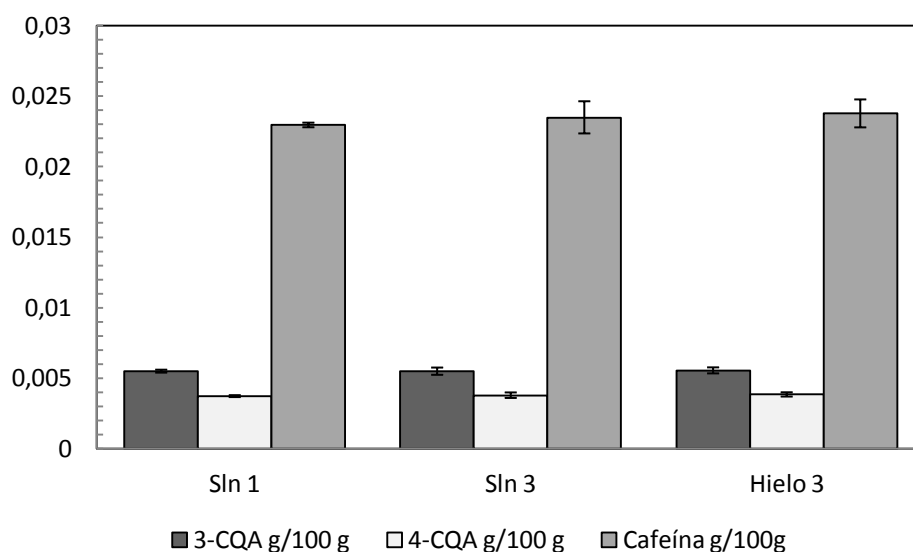


Figura 17. Contenido de 3-CQA, 4-CQA y cafeína en la solución inicial, solución y fracción de hielo finales en g por cada 100 g de materia seca.

El 3-CQA o ácido clorogénico, representa el mayor representante de esta familia de compuestos en la bebida; algunos autores lo nombran como 5-CQA; esto depende del orden de numeración asignado a la molécula; en este documento corresponde se denominará 3-CQA.

El ácido 3-CQA se encontró en concentración superior que el ácido 4-CQA, 0,0055g/100g ms y 0,0038g/100g ms respectivamente, este resultado coincide con los estudios de (Fujioka & Shibamoto, 2008); en donde se reportan los isómeros de ácidos clorogénicos en el siguiente orden 5- CQA > 4-CQA > 3-CQA en bebidas preparadas con café instantáneo. El ácido 5-CQA, es el ácido clorogénico mas abundante en el café y té (Bravo, Monente, Juániz, Paz, & Cid, 2011) y se encuentra en un porcentaje de 66 y 56 para café Robusta y Arabica, respectivamente (Trugo & Macrae, 1984).

En el presente trabajo el ácido 3-CQA alcanzó un aumento de 2 veces su concentración, de acuerdo al volumen de solución obtenida, este valor representa una variación importante en la eficiencia de la operación, en comparación con el estudio realizado por (Boaventura, y otros, 2013) sobre crioconcentración en bloque de extracto de mate, en donde se reporta un aumento de 670,35 % para 5-CQA después de cinco etapas de concentración, es decir, en promedio 134% por cada etapa. Por consiguiente las diferentes técnicas de crioconcentración pueden tener un efecto particular sobre los compuestos bioactivos.

El ácido 4-CQA y la cafeína se comportaron de manera similar, según se muestra en la figura 17, al finalizar el proceso de crioconcentración se logró duplicar el contenido de 4-CQA lo que representa un aumento de 110% con relación a la concentración en mg/mL de la solución de partida; del mismo modo la cafeína mostró un incremento del 113% en la solución final con un IC final de 2,1.

Los valores obtenidos en esta investigación para los compuestos bioactivos se encuentran dentro de rangos de contenido reportados por otros autores para estudios sobre bebidas de café; (Ludwing, y otros, 2012) analizaron el impacto del tiempo y método de elaboración de la bebida sobre los componentes con actividad antioxidante, estos autores encontraron valores entre 34 – 70 mg/100 mL de 5-CQA en café preparado con filtro y 29 – 201 mg/100 mL para café expreso, en soluciones preparadas a 6% pv en café Guatemala, de igual manera se reportan valores para 4-CQA de 16 - 42 mg/100 mL por filtro y 22 – 114 mg/100 mL en expreso y 35 – 106,8 mg/100 mL y 39 – 296 mg/100 mL para cafeína. El mayor contenido se obtuvo para la bebida de café expreso, concluyendo que los parámetros de importancia para recuperar estos compuestos en la bebida final son la turbulencia, tiempo de contacto y el uso de filtro.

El comportamiento del contenido de ácidos clorogénicos y cafeína frente a la adición de leche a bebidas de café (Niseteo, Komes, Belscak, Horzic, & Budec, 2012) permite establecer una aprobación de los valores obtenidos después de la crioconcentración en esta investigación, que se encontraron en mayor cantidad en la solución final con respecto al café expreso analizado por estos autores, el cual fue preparado a una concentración de 14% cuantificándose un total de 486,52 mg/L para 5-CQA, 398,51 mg/L de 4-CQA y 977,12 mg/L de cafeína en la bebida sin adición de leche.

El contenido de 3-CQA, 4-CQA y cafeína para la solución crioconcentrada presenta la misma tendencia que los rangos publicados por (Fujioka & Shibamoto, 2008) acerca de la determinación de ácidos clorogénicos y cafeína para varias bebidas comerciales de café en donde el componente mayoritario fue la cafeína con valores de 10,9 a 16,5 mg/g, seguido de 5-CQA con 2,13 – 7,06 mg/g y finalmente 1,44 a 4,27 mg/g de 4-CQA.

Análisis en base seca:

El fenómeno de oclusión generado durante el proceso de crioconcentración hizo que una parte de sólidos solubles estuviera presente en la fracción de hielo final. Este valor puede ser expresado con base en el volumen del extracto o con base en el contenido de materia seca del café. El porcentaje de retención en el hielo de los compuestos analizados que corresponde aproximadamente al 50% para los tres casos, estos valores se encuentran en la tabla 9. Lo anterior indica que los ácidos clorogénicos y la cafeína se distribuyen de manera equitativa en los sólidos presentes en las dos fracciones finales del proceso y no hay una retención selectiva de los compuestos bioactivos en el hielo, como se ha visto con otros compuestos funcionales durante la crioconcentración (Chen, Cao, & Cui, 2001); (Aider & De Halleux, 2009) por lo tanto se puede afirmar que la crioconcentración es una técnica que evita la pérdida de compuestos bioactivos durante el procesamiento de soluciones de café.

Es importante resaltar el resultado obtenido con base en la materia seca de café. Si el contenido de sólidos es mayor en el extracto después de la crioconcentración es esperable que los compuestos bioactivos incrementen su concentración. Sin embargo, cuando se analiza con base en la materia seca de café es posible identificar si efectivamente se obtuvo una preservación de estos compuestos o no. Los valores obtenidos cercanos al 50% reportados en la tabla 9 indican que efectivamente hubo una preservación de los compuestos bioactivos. Cuando el extracto de café concentrado sea nuevamente disuelto para la preparación de la bebida, se esperaría que contenga la misma concentración de ácidos clorogénicos y cafeína.

Tabla 9. Porcentaje de pérdida de compuestos bioactivos en el hielo

COMPUESTO	BASE HÚMEDA	BASE SECA
3-CQA	38,52	50,51
4-CQA	38,62	49,94
CAFEÍNA	38,56	50,30

4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.3.1 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES

El contenido total de compuestos fenólicos fue determinado a través del ensayo de Folin-Ciocalteu; el anexo 2.4 representa la curva de calibración de ácido gálico utilizada para determinar la concentración de este patrón en cada una de las muestras.

Resultados contenido de polifenoles

En la tabla 10 se encuentra el contenido de compuestos fenólicos reportados como equivalentes de ácido gálico; estos valores indican un incremento en su concentración con el desarrollo de la operación. En la primera etapa se duplicó la concentración (IC 2,5) con respecto a la solución inicial, mientras que la solución final alcanzó una concentración cuatro veces (IC 3,9) mayor que la solución original. Con esto se comprueba la efectividad de la crioconcentración para eliminar agua sin disminuir el contenido de los polifenoles presentes de manera natural en las soluciones de café.

Tabla 10. Contenido de polifenoles

ETAPA	MUESTRA	SÓLIDOS TOTALES		BASE HÚMEDA			BASE SECA		
		Xs	IC	mg/mL	DE	IC	g/100 g	DE	IC
1	Sln 1	5,05		4,3	6,35		0,082	0,01	
	Sln 2	7,8	1,5	10,6	3,09	2,5	0,130	0,04	1,6
	Hielo 2	3,74	0,7	3,6	1,42	0,8	0,092	0,04	1,1
2	Sln 3	10,53	2,1	16,7	2,56	3,9	0,152	0,01	1,9
	Hielo 3	6,53	1,3	9,8	2,48	2,3	0,145	0,04	1,8

*Promedio de tres medidas y su desviación estándar.

El comportamiento de los compuestos fenólicos en base húmeda para la fracción líquida y el hielo obtenido en las dos etapas de la crioconcentración, se presenta en la figura 18. En esta se observa un aumento constante de la concentración de estos metabolitos para las fracciones líquidas obtenidas.

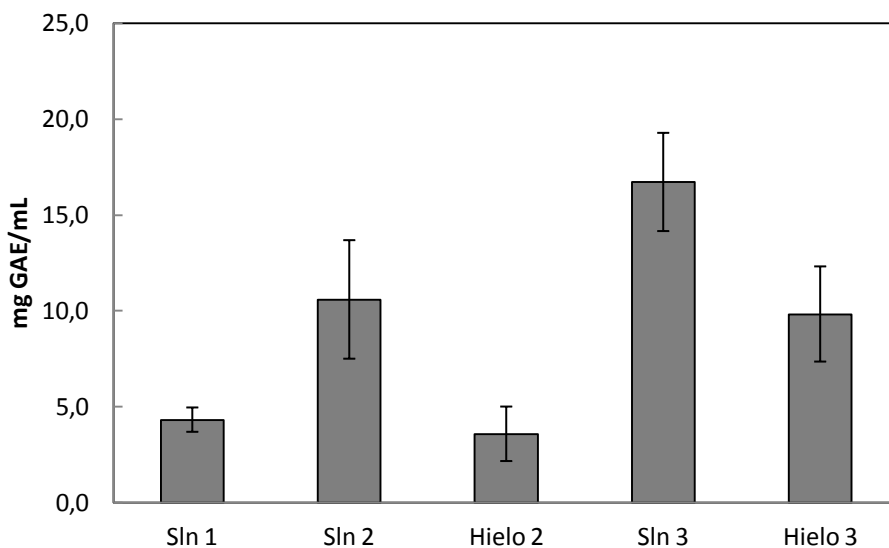


Figura 18. Contenido de polifenoles en base húmeda.

Los índices de concentración reportados en base húmeda para los polifenoles son mayores en comparación con los obtenidos para el contenido de sólidos de cada solución, esto se debe a la naturaleza química de estos compuestos que les permite una alta

solubilidad en agua, por lo tanto se puede decir que se han distribuido tanto en los sólidos presentes como en el agua de disolución. De igual manera se podría establecer que este aumento de compuestos fenólicos probablemente sea consecuencia de las asociaciones que se presentan entre melanoidinas y polifenoles de alto peso molecular, compuestos que son más resistentes a la oxidación (Del Pino, 2011) y que por lo tanto reaccionan de manera positiva con el reactivo de Folin-ciocalteau , aportando de manera significativa al resultado final de la prueba.

En la figura 18 también se observa el contenido de compuestos fenólicos en las fracciones de hielo obtenidas; en la primera etapa se presentó un IC de 0,8 y mientras que para la etapa 2 se alcanzó un IC de 2,3, este incremento es consecuencia del fenómeno de oclusión ya que en la etapa final del proceso la cantidad de hielo obtenida fue elevada y el contenido de sólidos en ella también.

Se pudo determinar un porcentaje de pérdida de la actividad antioxidante en la fracción de hielo (Tabla 11), para el caso de los compuestos fenólicos la pérdida total en base húmeda fue del 37%, que se podría disminuir reconcentrando esta fracción en una etapa posterior, para mejorar la efectividad del proceso.

Tabla 11. Porcentaje de pérdida en el hielo de la actividad antioxidante

ENSAYO	ETAPA 1		ETAPA 2	
	BASE HÚMEDA	BASE SECA	BASE HÚMEDA	BASE SECA
POLIFENOLES	25,27	41,36	37,03	48,68
DPPH	21,83	36,81	37,1	48,75
ABTS	37,7	55,68	47,15	58,99

La evaluación de la concentración de los compuestos fenólicos en base seca, demuestra que en la primera etapa se alcanzó un aumento significativo; de 0,0821g GAE/100 g de materia sólida en la solución inicial a 0,1304 g GAE/100g en la solución final que representa un IC de 1,6, mientras que en la segunda etapa se obtuvo una solución con un contenido de polifenoles de 0,1520 g/100g de materia seca y un IC de 1,9 (Tabla 10), lo que corresponde a un aumento en el 85% en la concentración de la solución original.

Se puede establecer una relación directa del contenido de sólidos y el total de compuestos fenólicos, como se observa en la figura 19, los compuestos fenólicos aumentaron en cada una de las etapas realizadas tanto en la fracción líquida como en el hielo, gracias al comportamiento del índice de concentración durante el proceso, debido al incremento progresivo del porcentaje de sólidos en la operación (Tabla 10).

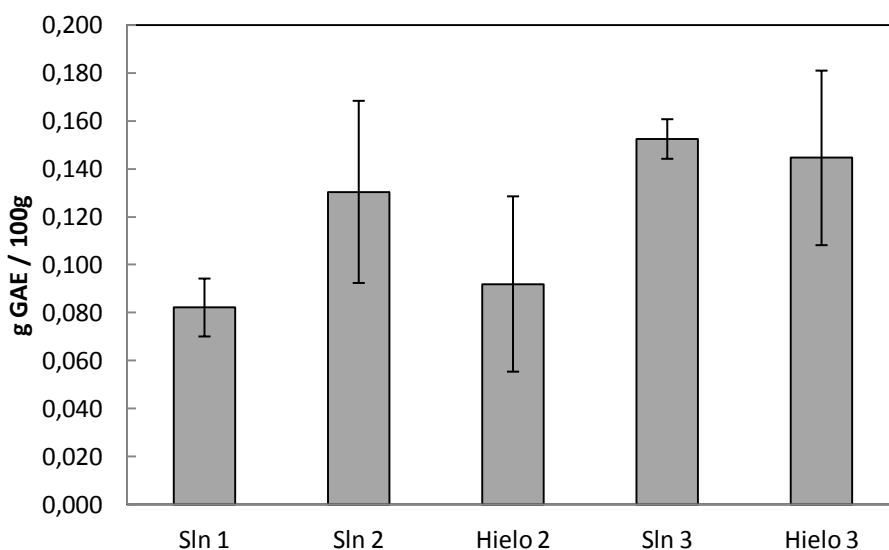


Figura 19. Contenido de polifenoles en base seca

En las fracciones de hielo se pudo observar que el contenido total de polifenoles aumentó con las etapas de la crioconcentración (Figura 19), de acuerdo a la estructura química de

los polifenoles, la posibilidad de formación de puentes de hidrogeno con las moléculas agua es alta, debido al número de grupos hidroxilos presentes, esto hace que el agua intersticial este menos disponible para congelarse sola, por lo tanto el hielo obtenido tiene una elevada concentración de estos compuestos (Aider & De Halleux, 2008); este parámetro está directamente relacionado con la retención de sólidos en el hielo en formación y por lo tanto con la eficiencia del proceso, que disminuyó con el transcurso de la concentración, alcanzando un porcentaje de pérdida en el hielo de 48,68%. De acuerdo a Boaventura y colaboradores (2012) se puede determinar la eficiencia de la concentración de fenólicos en el proceso con la ecuación 5; para la etapa 1 la eficiencia fue de 66% mientras que en la etapa 2 se alcanzó el 41%.

4.3.2 ENSAYOS ABTS Y DPPH

La actividad antioxidante de la solución inicial, las soluciones obtenidas en las dos etapas realizadas y su respectiva fracción de hielo, fue determinada por medio de ensayos ABTS y DPPH con trolox como patrón de referencia, los anexos 2.5 y 2.6 corresponden a las curvas de calibración utilizadas para cada prueba.

Resultados actividad antioxidante

Los valores de actividad antioxidante obtenidos para cada muestra en cada prueba se recopilan en la tabla 12, donde se reportan valores equivalentes de trolox en mg/mL en base húmeda y g/100g en base seca.

Tabla 12. Actividad antioxidante mediante DPPH y ABTS

ETAPA	MUESTRA	DPPH TEA						ABTS TEA					
		BASE HÚMEDA			BASE SECA			BASE HÚMEDA			BASE SECA		
		mg/mL	DE	IC	g/100 g	DE	IC	mg/mL	DE	IC	g/100 g	DE	IC
1	Sln 1	10,2	1,3		0,194	0,02		33,6	1,38		0,639	0,03	
	Sln 2	16,3	5,7	1,6	0,200	0,03	1,0	43,2	0,04	1,3	0,532	0,00	0,8
	Hielo 2	4,5	0,2	0,4	0,117	0,00	0,6	26,0	0,64	0,8	0,669	0,02	1,0
2	Sln 3	19,0	1,1	1,9	0,173	0,00	0,9	43,3	0,1	1,3	0,395	0,00	0,6
	Hielo 3	11,2	2,2	1,1	0,165	0,02	0,9	38,6	0,2	1,1	0,568	0,00	0,9

*Promedio de tres medidas y su desviación estándar.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer un aumento de en la actividad antioxidante por volumen de la solución de café en cada etapa de crioconcentración realizada, en la figura 20 se observa el comportamiento de la solución y las fracciones de hielo en cada etapa.

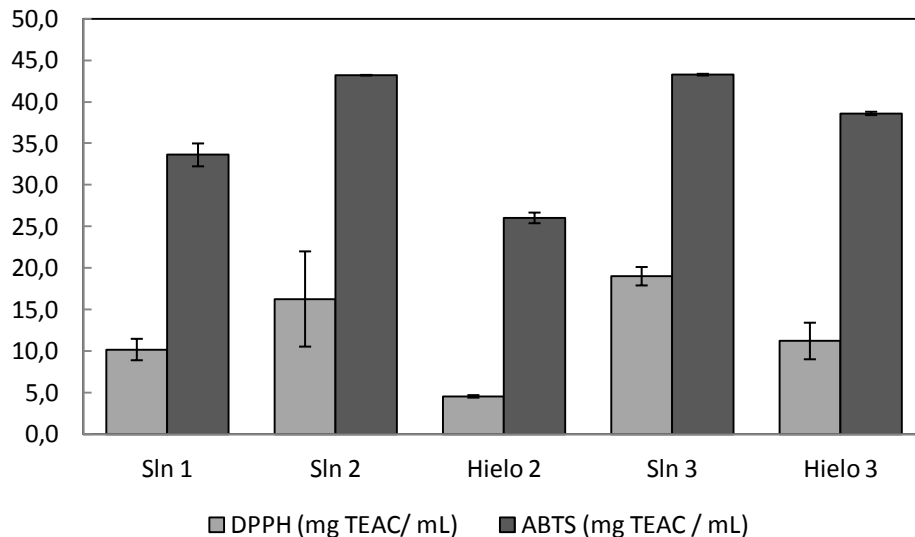


Figura 20. Actividad antioxidante en base húmeda

Para el ensayo de DPPH se logró un aumento de la actividad antioxidante equivalente a la acción del trolox para degradar este radical libre; de 1,6 veces que corresponde a 59,68%

en la primera etapa y 1,9 veces para un 86,7% en la segunda etapa en la solución de café; las fracciones de hielo de las dos etapas presentaron una actividad antioxidante de 4,59 mg/mL y 11,29 mg/mL respectivamente, este último valor corresponde a un incremento del 14% (IC 1,1) con respecto a la solución de partida; debido al aumento de la concentración de compuestos fenólicos en la última fracción de hielo.

La prueba de ABTS presentó valores mayores de equivalentes de trolox que el ensayo DPPH, la actividad antioxidante de la solución obtenida en la primera etapa fue 1,3 veces mayor, lo que indica un aumento del 28,5% de la actividad antioxidante con respecto a la solución inicial, este valor se mantuvo constante durante la segunda etapa ya que la solución final tuvo un valor de 43,27 mg TEAC/mL. La fracción de hielo de la etapa 1 presentó un IC de 0,8 que corresponde al 77,4% de la actividad de la solución inicial, mientras que la fracción de la etapa 2 tuvo un IC de 1,1 con un aumento en 14,87% con respecto a la solución de partida.

El análisis de los resultados expresados en base seca (g de equivalente trolox por 100 g de materia sólida), establece una ligera disminución de la actividad antioxidante de las soluciones finales de cada etapa, frente a los dos radicales, para DPPH el IC final fue de 0,9 y para ABTS 0,6. Esto se muestra en la figura 21, una de las posibles causas puede ser que el tiempo de operación en un equipo que no presenta ningún tipo de hermeticidad y por lo tanto no brinda una atmósfera inerte, favorece la oxidación de alguna fracción de los compuestos bioactivos presentes en los sólidos. Lo anterior permite establecer que los compuestos antioxidantes de la bebida se encuentran tanto en los sólidos como disueltos en el agua de disolución.

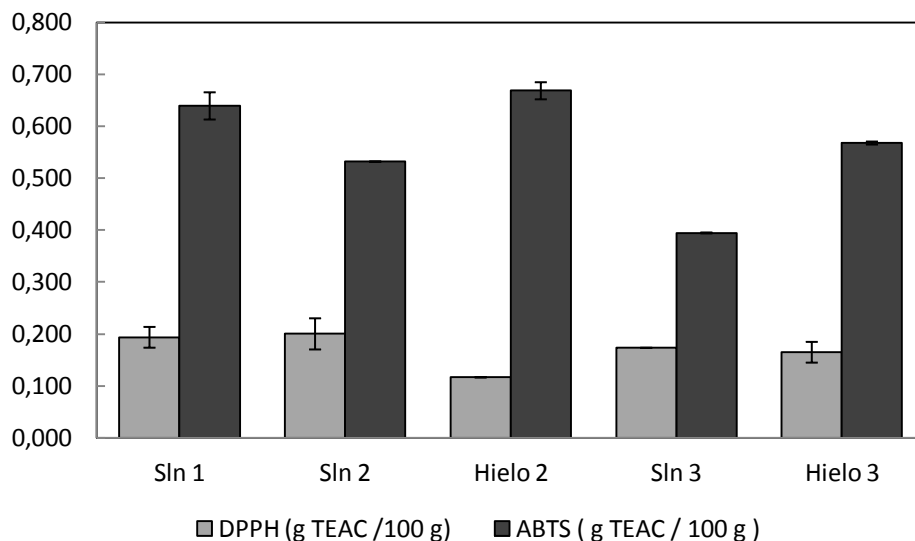


Figura 21. Actividad antioxidante en base seca

Es evidente que las soluciones de café y las fracciones de hielo presentan una actividad antioxidante mayor frente al radical $ABTS^+$, sin embargo en el ensayo DPPH se pudo establecer un aumento progresivo y mayor de la actividad antioxidante de las soluciones para cada etapa de la crioconcentración. Estos dos radicales reaccionan fácilmente con donadores de hidrogeno como los compuestos fenólicos, siendo más selectivo el radical DPPH. (Ludwing, y otros, 2012)

En comparación con los resultados reportados por Boaventura y colaboradores (2013) para mate, se puede considerar que la solución final obtenida presenta una actividad antioxidante significativa frente al radical DPPH, según estos autores, una concentración de $3,88 \mu gTEAC/mL$ fue suficiente para inhibir el 50% de este radical, en esta investigación se alcanzó un valor de $19 mgTEAC/mL$, lo que supera el valor mencionado.

La actividad del extracto crioconcentrado frente al radical ABTS superó el valor obtenido por Nisiteo y colaboradores (2013) para la bebida preparada con café instantáneo convencional ($49,34 mmolTEAC/L$), en este estudio la concentración de equivalentes

trolox de la solución final fue de 84,13 mmol/L, con lo que se comprueba la efectividad de la técnica para preservar la bioactividad de los compuestos presentes en el café.

El comportamiento de la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles presenta similitud con los resultados publicados recientemente en el estudio de crioconcentración en bloque para soluciones acuosas de café soluble, (Moreno, Raventós, Hernández, & Ruíz, 2014), en donde la actividad frente a los radicales DPPH y ABTS aumenta directamente con el desarrollo de la operación y están correlacionados con el contenido de sustancias bioactivas (3-CQA, 4-CQA y cafeína).

En la figura 20 se observa que la actividad antioxidante frente a los dos radicales, reportada como mg TEAC/mL aumenta conforme aumenta el contenido de compuestos fenólicos; el método de folin-ciocalteau se basa en transferencia de electrones sin embargo no solamente los compuestos fenólicos tienen poder reductor frente a este compuesto; así que la cafeína y compuestos de bajo y alto peso molecular como las melanoidinas, inducidos por las reacciones de maillard, han demostrado capacidad para transferir electrones e hidrogeno (Yazheng & Kitts, 2011), contribuyendo en gran manera al potencial antioxidante de las bebidas de café.

4.3.3 CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONCENTRACIÓN DE COMUESTOS BIOACTIVOS.

Para establecer la correlación de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante en el extracto de café, se realizó una análisis de correlación por coeficiente de pearson utilizando SPSS para los valores en base húmeda; en la tabla 13 se presentan estos resultados.

Tabla 13. Correlación de Pearson para compuestos bioactivos y actividad antioxidante.

	CORRELACIONES	DPPH	ABTS	3-CQA	4-CQA	CAFEINA	PF
DPPH	Correlación Pearson	1	0,906	0,986	0,982	0,982	0,938
	Sig. (bilateral)		0,278	0,108	0,120	0,120	0,225
	N	3	3	3	3	3	3
ABTS	Correlación de Pearson	0,906	1	0,965	0,969	0,970	0,997
	Sig. (bilateral)	0,278		0,169	0,158	0,158	,053
	N	3	3	3	3	3	3
3-CQA	Correlación de Pearson	0,986	0,965	1	1,000*	1,000*	0,983
	Sig. (bilateral)	0,108	0,169		0,011	0,012	0,116
	N	3	3	3	3	3	3
4-CQA	Correlación de Pearson	0,982	0,969	1,000*	1	1,000**	0,986
	Sig. (bilateral)	0,120	0,158	0,011		0,000	0,105
	N	3	3	3	3	3	3
CAFEINA	Correlación de Pearson	0,982	0,970	1,000*	1,000**	1	0,987
	Sig. (bilateral)	0,120	0,158	0,012	0,000		0,104
	N	3	3	3	3	3	3
PF	Correlación de Pearson	0,938	0,997	0,983	0,986	0,987	1
	Sig. (bilateral)	0,225	0,053	0,116	0,105	0,104	
	N	3	3	3	3	3	3
* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).							
** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).							

Este análisis permite comprobar que la actividad antioxidante se debe a la presencia de los componentes bioactivos (ácidos clorogénicos, polifenoles y cafeína) con una correlación entre 0,982 a 0,986 para DPPH y entre 0,965 a 0,970 para ABTS, con una significancia de 0,10. También se establece una correlación directa entre componentes bioactivos, con un nivel de significancia de 0,05 y 0,01. Este tipo de correlación también fue establecida por (Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011) quienes reportan 0,88 entre el total de polifenoles y DPPH y 0,82 para ABTS; en el estudio realizado por (López-Galilea, Andueza, Di Leonardo, De Peña, & Cid, 2006) se reporta una correlación de 0,83 para cafeína y DPPH; estos valores también se pueden comparar con los publicados por (Boaventura, y otros, 2013) para mate, quienes presentan una correlación de 0,99 entre el total de polifenoles y DPPH, para ACG y DPPH de 0,86.

5 CONCLUSIONES

- La crioconcentración en película descendente es una técnica efectiva para la eliminación de agua en extractos acuosos de café; el índice de concentración en la solución final alcanzó un valor de 2 al finalizar las dos etapas del proceso, sin embargo una mayor presencia de sólidos facilita su oclusión en el hielo, con lo que la eficiencia de la operación disminuyó de 51,92 % en la primera etapa a 38,06% en la segunda.
- El coeficiente de reparto (K) aumenta en cada etapa de crioconcentración. Se obtuvieron valores de 0,48 y 0,62 en las etapas 1 y 2 respectivamente. Este resultado confirma que el aumento de la concentración disminuye la pureza de los cristales de hielo debido a la retención de solutos dentro de la matriz sólida en formación. El diseño del equipo de crioconcentración en película descendente debe considerar como factor importante el movimiento del fluido sobre la placa y el recipiente de almacenamiento, para evitar la formación de espuma y facilitar el desarrollo del proceso.
- La crioconcentración en película descendente es una técnica efectiva para preservar el contenido de compuestos bioactivos en soluciones acuosas de café (IC 2,1). Estos compuestos (cafeína, 3-CQA y 4-CQA) se distribuyen en el hielo y en la solución crioconcentrada en forma proporcional al contenido de sólidos totales, el IC en base seca igual a 1, confirma una distribución equitativa y sugiere que no hay una selectividad de este tipo de sustancias en el proceso.

- La crioconcentración en película descendente permite preservar la actividad antioxidante de los extractos de café. La actividad antioxidante del extracto de café se incrementó como resultado del aumento en la concentración de sólidos totales y de componentes bioactivos. La actividad antioxidante presentó un aumento correspondiente a 3,9, 1,9 y 1,3 veces para polifenoles, DPPH y ABTS respectivamente al final del proceso.
- Cuando la actividad antioxidante se expresa en términos de contenido de materia seca de café, se observa una ligera disminución, posiblemente debida a oxidaciones durante la operación del equipo, el cual trabaja a condición abierta al ambiente.
- La actividad antioxidante del extracto de café está correlacionada con el contenido de ácidos clorogénicos y cafeína, estos tres compuestos bioactivos representan la mayor fracción antioxidante del café y son de interés para la funcionalidad de la bebida.

6 RECOMENDACIONES

- En sistemas de crioconcentración de extracto de café se debe tener en cuenta las características de diseño que minimicen la formación de espuma, la cual puede afectar la operatividad de los equipos y la eficiencia de la separación. Se recomienda estudiar este parámetro con más profundidad. Igualmente debe tenerse en cuenta la posibilidad de uso de atmosferas inertes que eviten la oxidación de los compuestos del café y afecten su actividad antioxidante.
- Evaluar el efecto de esta técnica de separación sobre otros compuestos de interés funcional presentes en el café y realizar una comparación con otras técnicas de concentración utilizadas por la industria.
- Se sugiere estudiar la eficiencia de la separación y la preservación de la calidad funcional del extracto de café para la crioconcentración en película descendente bajo diferentes temperaturas del refrigerante y concentraciones iniciales del extracto.
- Analizar la actividad antioxidante del extracto de café crioconcentrado con técnicas que utilicen permitan una aproximación mayor a la acción de compuestos que se puedan producir bajo condiciones fisiológicas.

7 BIBLIOGRAFIA

- Agrocadenas, O. (2005). *La cadena del café en Colombia*. Bogotá: Ministerio de agricultura y desarrollo rural.
- Agudo, M. L. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Autodidacta. Revista de educación de Extremadura*, 98, Revista on-line.
- Aider, M., & De Halleux, D. (2008). Production of concentrated cherry and apricot juice by crioconcentration technology. *LWT- food science and technology*, 41, 1768-1775.
- Aider, M., & De Halleux, D. (2009). Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. *LWT Food Science and Technology*, 42, 679 - 685.
- Apak, R., Gorinstein, S., Bohm, V., Schaich, K. M., Ozyurek, M., & Guclu, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry*, 85, 957-998.
- Bejarano, E., Bravo, M., Huamán, M., Huapaya, C., Roca, A., & Rojas, E. (25 de Abril de 2013). www.nutinfo.com. Obtenido de www.nutinfo.com: [http://www.nutinfo.com/archivos/ebooks/tabla composicion alim peru.pdf](http://www.nutinfo.com/archivos/ebooks/tabla%20composicion%20alim%20peru.pdf)
- Belén, F., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M., & Raventós, M. (2012). One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. *Journal of food engineering*, 103, 364-373.
- Belitz, H., & Grosh, W. (2009). *Química de los alimentos* (2 ed.). Zaragoza: Acribia.
- Boaventura, B. B., Murakami, A. N., Prudencio, E. S., Maraschin, M., Murakami, F. S., Amante, E. R., & Ambomi, R. M. (2013). Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International*, 53, 686-692.
- Bolivar, C. p. (2009). Galactomanano del café y su importancia en el procesamiento para la obtención de café soluble. *Universidad Tecnológica de Pereira*, 26-39.
- Bravo, J., Monente, C., Juaníz, I., De Peña, M. P., & Concepción, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50, 610-616.
- Campanha, F. G., Diaz, R. C., & Benassi, M. D. (2010). Discrimination of coffee species using kahweol and cafestol: effects of roasting and of defects. *Coffe Science*, 43, 87-96.
- Castañeda, C. B., Ramos, L. E., & Ibañez, V. L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico*, 8, 56-72.

- Chen, Y. H., Cao, E., & Cui, Z. F. (2001). An experimental study of freeze concentration in biological media. *IChemE*, 79, 35-40.
- De Maria, C. A., Trugo, L. C., Aquino Neto, F., Moreira, F. R., & Aliviano, c. s. (1996). Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chemistry*, 55, 203 -207.
- Del Pino, R. (2011). Influencia del grado de tostado sobre la capacidad antioxidante y el efecto genoprotector del cafe soluble. Contribución de la fracción de melanoidinas. *Tesis de maestría*, 30-38.
- Díaz Acosta, A., & Membrillo Hernandez, J. (2006). Consecuencias fisiologicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP revista especializada en ciencias Químico-Biológicas*, 9, 34 - 44.
- Drago, M. E., Lopez, M., & Sainz, T. D. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista mexicana de ciencias farmacologicas*, 37, 58-68.
- Duarte, S. M., De Abreu, C. M., De Menezes, H. C., Dos Santos, M. E., & Gouvea, C. M. (2005). Effect of processing an roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25, 387-393.
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, 106, 217-221.
- Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E., & Offen, D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system. *Pharmacological Reviews*, 54, 271-284.
- Hecimovic, I., Belscack-Cvitanovic, A., Horzic, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties. *Food Chemistry*, 129, 991 - 1000.
- Hernández, E., Raventós, M., Auleda, J. M., & Ibarz, A. (2009). Concentration of apple and pear juices in a multi-plate freeze concentrator. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 248-355.
- Kwan, J., SunYoo, H., & Takayuri, S. (2009). Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid. 57, 5365 - 5369.
- López-Galilea, I., Andueza, S., Di Leonardo, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2006). Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. *Food Chemistry*, 94, 75 - 80.
- Ludwing, I. A., Sanchez, L., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. *Food Research International*, 48, 57-64.

- Madhava, M., Sulochanamma, G., Samptu, S. R., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, *107*, 377 - 384.
- Miyawaki, O., Liu, L., Shirai, Y., Shakashita, S., & Kagitani, K. (2005). Tubular ice system for scale-up of progressive freeze-concentration. *Journal of food engineering*, *69*, 107-113.
- Montero Rodríguez, M. G., Talon Marquéz, M. A., & Sánchez Muniz, F. J. (1999). Consumo de cafe y colesterol serico. *Grasas y aceites*, *50*, 141-152.
- Moreno, F. L., Raventós, M., Hernández, E., & Ruíz, Y. (2014). Block freeze-concentration of coffee extract: Effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. *Journal of Food Engineering*, *120*, 158-166.
- Moreno, F. L., Robles, C. M., Sarmiento, Z., Ruíz, Y., & Pardo, J. M. (2013). Effect of separation and thawing mode on block freeze-concentration of coffee brews. *Food and Bioproducts Processing*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.02.007>.
- Muriel, P., & Arauz, J. (2010). Coffee and liver diseases. *Fitoterapia*, *81*, 297-305.
- Mussatto I., S., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Texeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spend coffee. *Separation and purification technology*, *83*, 173 - 179.
- Nakagawa, K., Nagahama, H., Meabashi, S., & Maeda, K. (2010). Usefulness of solute elution from frozen matrix from freeze-concentration technique. *Chemical engineering research and desing*, *88*, 718-724.
- Nisiteo, T., Komes, D., Belzac-Cvitanovic, A., Horzic, D., & Budec, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, *134*, 1870-1877.
- Nkondjock, A. (2009). Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer letters*, *277*, 121-125.
- Olthof, M., Hollman, P., & Katan, M. (2006). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Human Nutrition and Metabolism*, *34*, 123-129.
- Quintanar, E. M., & Calderon, S. J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de educación bioquímica*, *28*, 89-101.
- Ramalakshmi, K., Rao, L., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *food Chemistry*, *115*, 79-85.

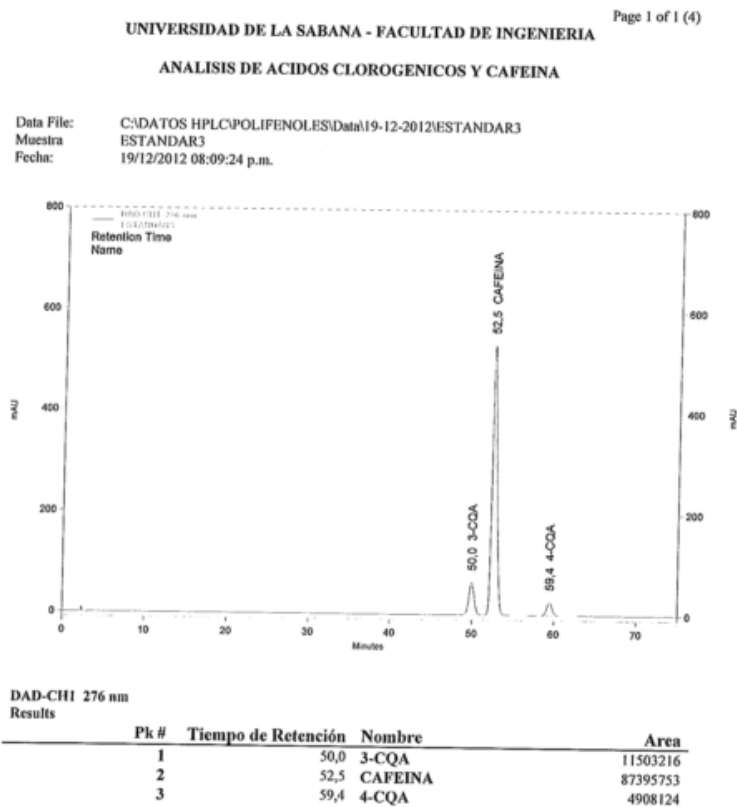
- Raventós, M., Hernández, E., Auleda, J., & Ibarz, A. (2007). Concentration of aqueous sugar solutions in a multiple plate cryoconcentrator. *Journal of food engineering*, 79, 577-585.
- Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa and tea) prepared per cup. *Agriculture and food chemistry*, 49, 3637-3642.
- Rodríguez, M., Luque, S., Alvarez, J., & Coca, J. (2000). A comparative study of reverse osmosis and freeze concentration for removal of valeric acid from wastewater. *Desalination*, 127, 1-11.
- Ruíz, Y., Sánchez, J., Auleda, J. M., Hernández, E., & Raventós, M. (2009). *Aplicaciones de la criocentración en la industria agroalimentaria*. Obtenido de <http://upcommons.upc.edu/e-prints/bitstream/2117/2504/1/criocom.pdf>
- Sánchez, J., Ruíz, Y., Auleda, J. M., Hernández, E., & Raventós, M. (15 de Octubre de 2009). *Freeze concentration in fruit juices industry*. Recuperado el 12 de Junio de 2012, de Freeze concentration in fruit juices industry: <http://fst.sagepub.com/cgi/content/abstract/15/4/303>
- Trugo, L. C., & Macrae, L. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15, 219-227.
- Vander Ham, F., Witcamp, G. J., Grauw, J., & Van Rusmalen, G. M. (1998). Eutectic freeze crystallization: application to process streams and wastewater purification. *Chemical engineering and processing*, 37, 207-218.
- Vignoli, J., Bassoli, D., & Benassi, M. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863-868.
- Yazheng, L., & Kitts, D. D. (2011). Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*, 44, 2418-2424.

ANEXOS

1. CROMATOGRAMAS PARA ESTANDARES, SOLUCIÓN INICIAL, SOLUCIÓN FINAL, HIELO

1.1. CROMATOGRAMAS 276 nm

1.1.1. Estándares

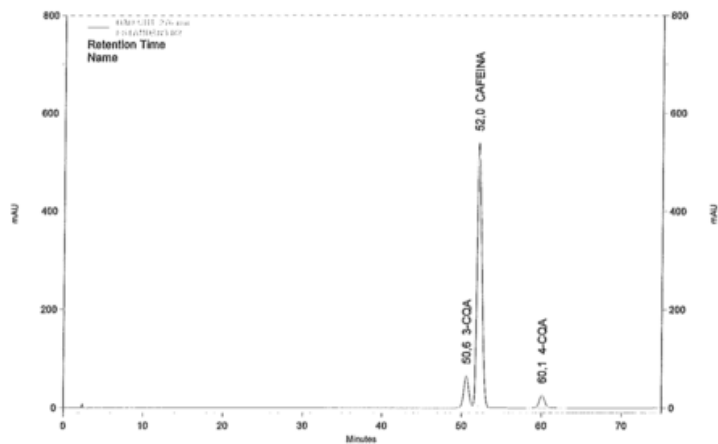


Replica 1

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\ESTANDAR3 R2
 Muestra: ESTANDAR3 R2
 Fecha: 21/12/2012 07:39:33 p.m.



DAD-CHI 276 nm
 Results

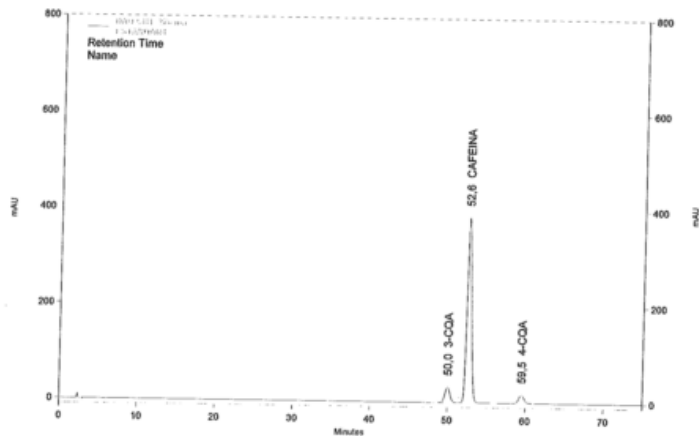
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
1	50,6	3-CQA	10466573
2	52,0	CAFEINA	86997993
3	60,1	4-CQA	4944054

Replica 2

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\ESTANDAR4
 Muestra: ESTANDAR4
 Fecha: 19/12/2012 09:51:11 p.m.



DAD-CHI 276 nm
 Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
1	50,0	3-CQA	5813486
2	52,6	CAFEINA	60467940
3	59,5	4-CQA	3341251

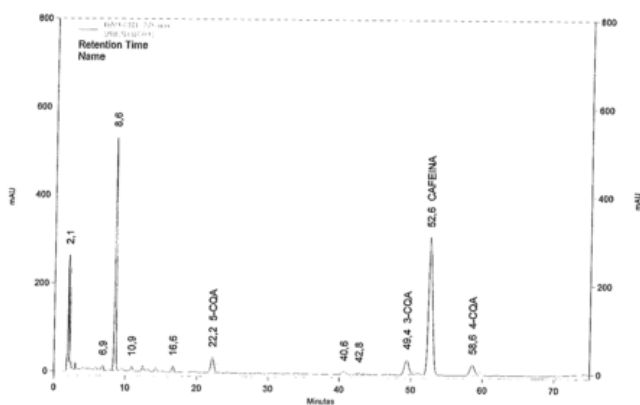
Replica 3

1.1.2. Solución inicial

Page 1 of 1 (1)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
ANALISIS DE ACIDOS CLOGROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA001.dat
Muestra: MUESTRA001
Fecha: 19/12/2012 01:22:14 p.m.



DAD-CHI 276 nm
Results

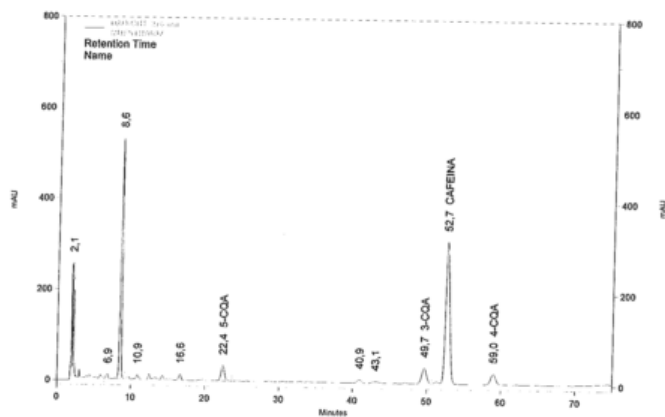
PK #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
6	22,2	5-CQA	4408237
9	49,4	3-CQA	5998344
10	52,6	CAFEINA	47710075
11	58,6	4-CQA	4352823

Replica 1

Page 1 of 1 (1)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
ANALISIS DE ACIDOS CLOGROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA002
Muestra: MUESTRA002
Fecha: 19/12/2012 03:04:02 p.m.



DAD-CHI 276 nm
Results

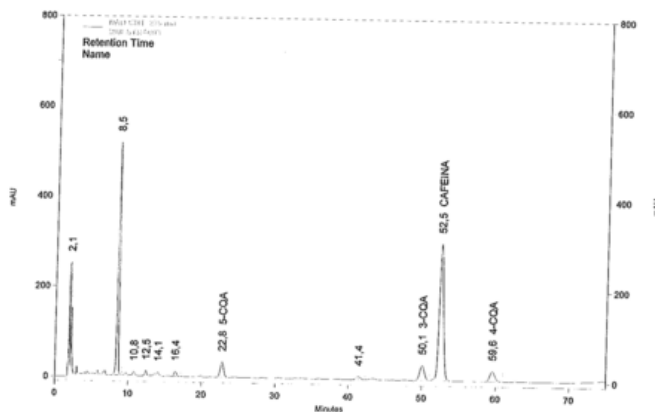
PK #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
6	22,4	5-CQA	4447912
9	49,7	3-CQA	6185810
10	52,7	CAFEINA	47301418
11	59,0	4-CQA	4696376

Replica 2

Page 1 of 1 (8)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
ANALISIS DE ACIDOS CROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA003
Muestra: MUESTRA003
Fecha: 20/12/2012 02:56:30 a.m.



DAD-CHI 276 nm
Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
7	22,8	5-CQA	4342810
9	50,1	3-CQA	5948175
10	52,5	CAFEINA	47048146
11	59,6	4-CQA	4416624

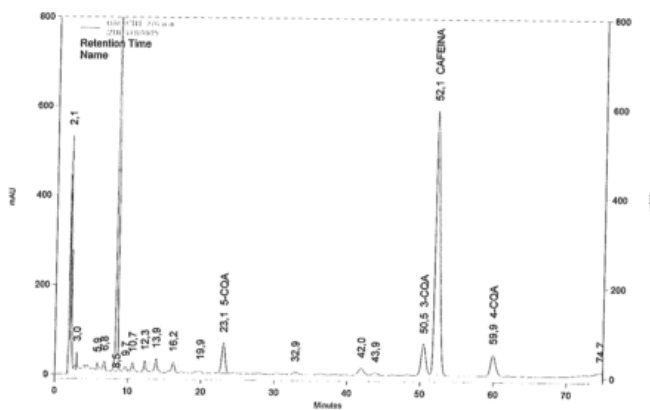
Replica 3

1.1.3. Solución 3

Page 1 of 1 (24)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
ANALISIS DE ACIDOS CROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA019
Muestra: MUESTRA019
Fecha: 21/12/2012 06:05:01 a.m.



DAD-CHI 276 nm
Results

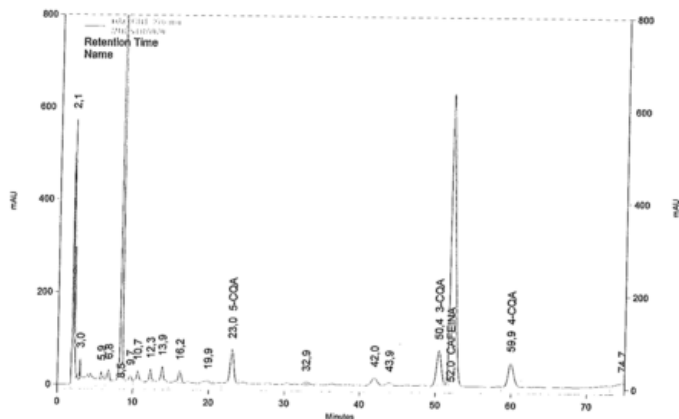
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
12	23,1	5-CQA	9156042
16	50,5	3-CQA	11963318
17	52,1	CAFEINA	97779819
18	59,9	4-CQA	9421618

Replica 1

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA020
 Muestra: MUESTRA020
 Fecha: 21/12/2012 07:46:53 a.m.



DAD-CHI 276 nm
 Results

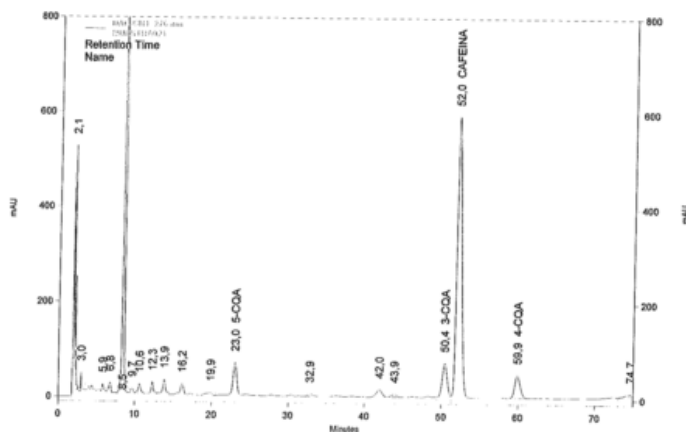
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
12	23,0	5-CQA	9991891
16	50,4	3-CQA	12931888
17	52,0	CAFEINA	106209038
18	59,9	4-CQA	10223757

Replica 2

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA021
 Muestra: MUESTRA021
 Fecha: 21/12/2012 09:28:42 a.m.



DAD-CHI 276 nm
 Results

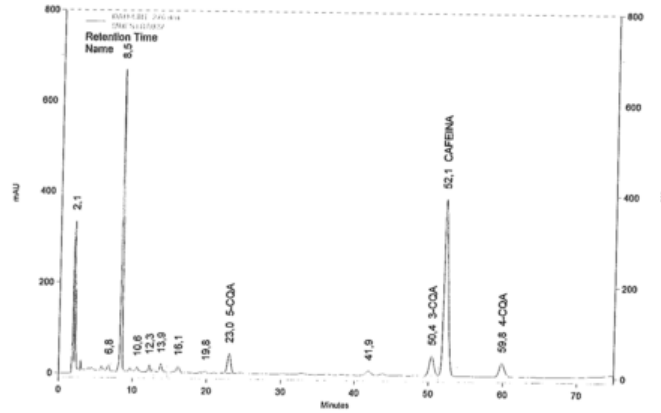
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
12	23,0	5-CQA	9275860
16	50,4	3-CQA	11988677
17	52,0	CAFEINA	97795229
18	59,9	4-CQA	9424047

Replica 3

1.1.4. Hielo 3

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
 ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA022
 Muestra: MUESTRA022
 Fecha: 21/12/2012 11:10:32 a.m.



DAD-CHI 276 nm

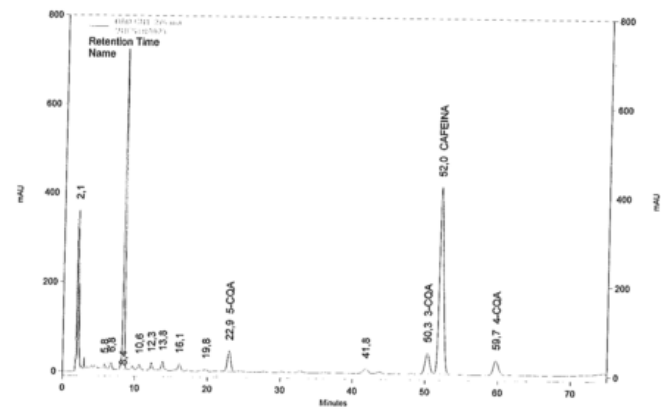
Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
9	23,0	5-CQA	5699964
11	50,4	3-CQA	7489973
12	52,1	CAFEINA	60400043
13	59,8	4-CQA	5810250

Replica 1

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
 ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA023
 Muestra: MUESTRA023
 Fecha: 21/12/2012 12:52:22 p.m.



DAD-CHI 276 nm

Results

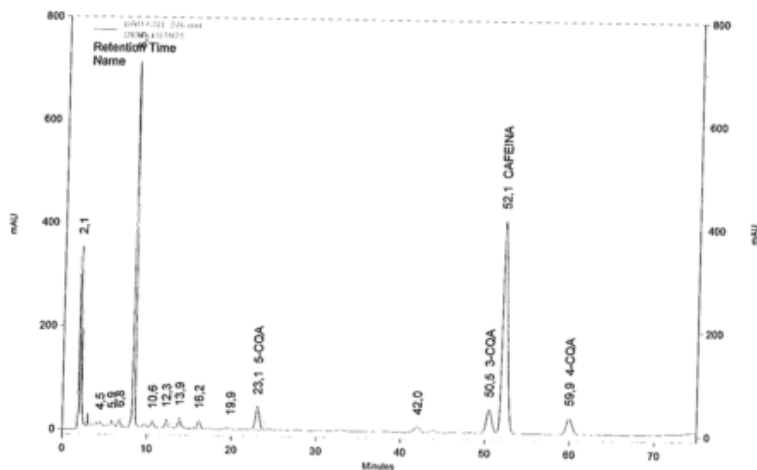
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
10	22,9	5-CQA	6100927
12	50,3	3-CQA	8074171
13	52,0	CAFEINA	65523320
14	59,7	4-CQA	6269186

Replica 2

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CROGENICOS Y CAFEINA

Data File: CADATOS HPLC/POLIFENOLES/Data/19-12-2012/MUESTRA024
 Muestra: MUESTRA024
 Fecha: 21/12/2012 02:34:07 p.m.



DAD-CHI 276 nm
 Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
11	23,1	5-CQA	5994514
13	50,5	3-CQA	7853597
14	52,1	CAFEINA	63906514
15	59,9	4-CQA	6108633

Replica 3

1.2. CROMATOGRAMAS 325 nm

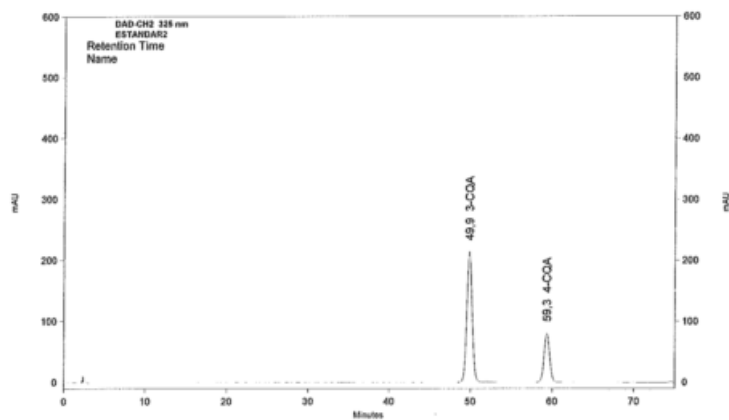
1.2.1. Estandares

Page 1 of 1 (3)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\ESTANDAR2
Muestra: ESTANDAR2
Fecha: 19/12/2012 06:27:38 p.m.
DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
1	49,9	3-CQA	38922713
2	59,3	4-CQA	15212754

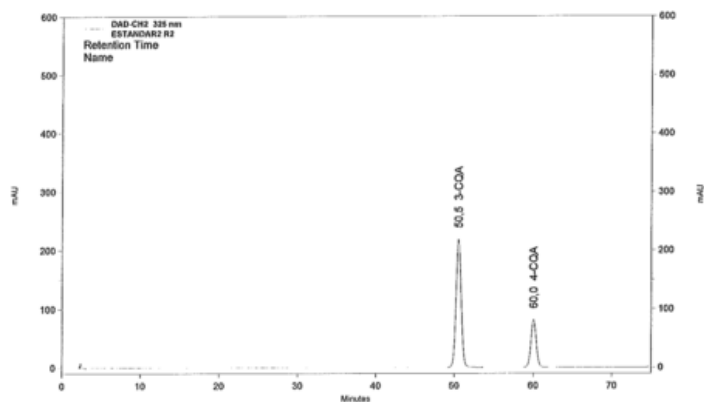
Replica 1

Page 1 of 1 (31)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\ESTANDAR2 R2
Muestra: ESTANDAR2 R2
Fecha: 21/12/2012 05:57:43 p.m.
DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
1	50,5	3-CQA	39483771
2	60,0	4-CQA	15333645

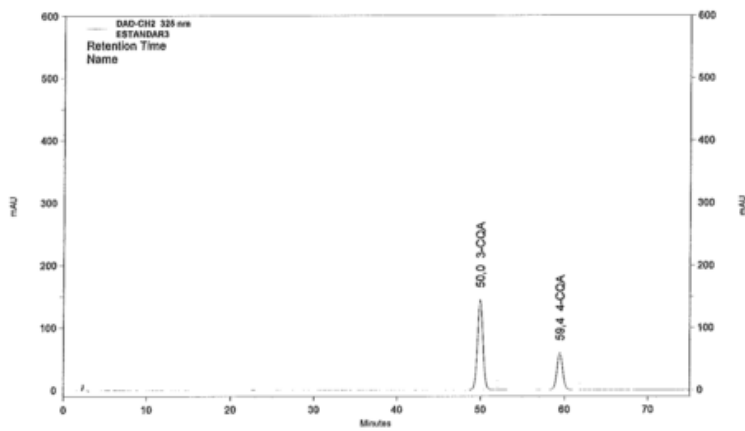
Replica 2

Page 1 of 1 (4)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\ESTANDAR3
Muestra: ESTANDAR3
Fecha: 19/12/2012 08:09:24 p.m.
DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
1	50,0	3-CQA	26198244
2	59,4	4-CQA	11326515

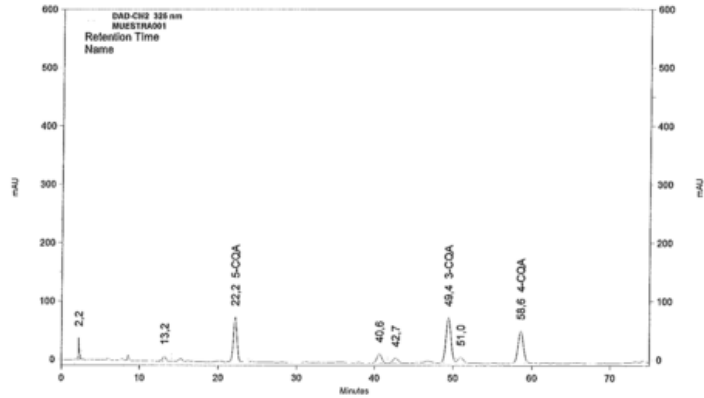
Replica 3

1.2.2. Solución inicial

Page 1 of 1 (1)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA001.dat
 Muestra: MUESTRA001
 Fecha: 19/12/2012 01:22:14 p.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

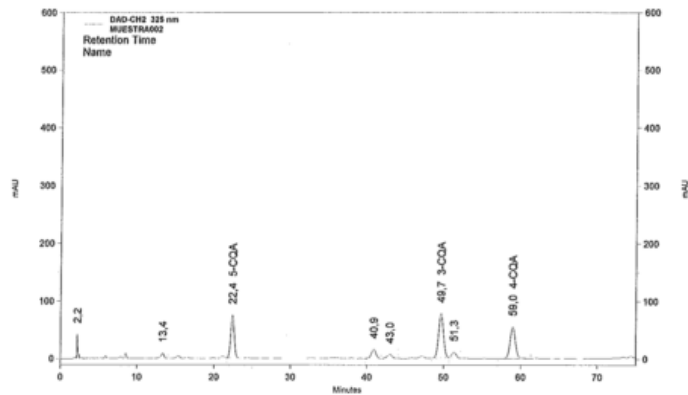
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
3	22,2	5-CQA	9931105
6	49,4	3-CQA	13386506
8	58,6	4-CQA	10633273

Replica 1

Page 1 of 1 (1)

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA
ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA002
 Muestra: MUESTRA002
 Fecha: 19/12/2012 03:04:02 p.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

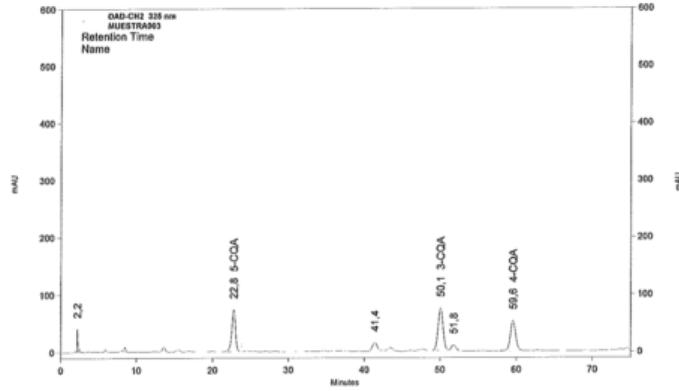
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
3	22,4	5-CQA	9506563
6	49,7	3-CQA	13657405
8	59,0	4-CQA	10679642

Replica 2

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA003
 Muestra: MUESTRA003
 Fecha: 20/12/2012 02:56:30 a.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
2	22,8	5-CQA	9915779
4	50,1	3-CQA	13156735
6	59,6	4-CQA	10326486

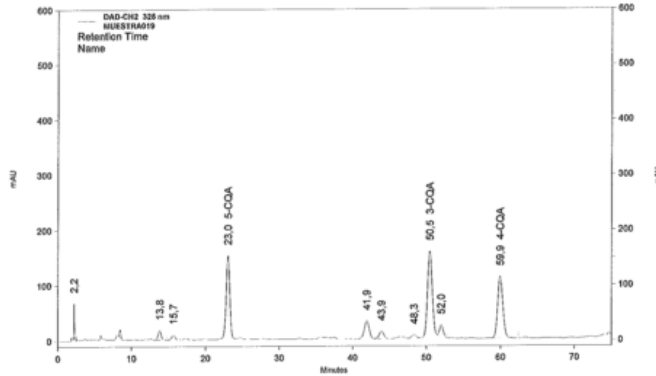
Replica 3

1.2.3. Solución 3

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA019
 Muestra: MUESTRA019
 Fecha: 21/12/2012 06:05:01 a.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
Results

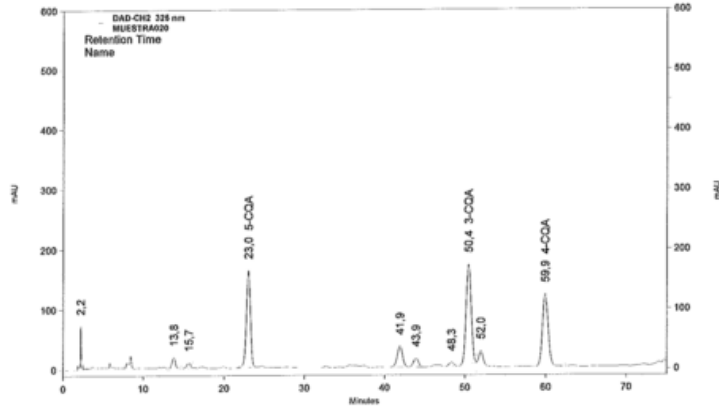
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
4	23,0	5-CQA	20848416
8	50,5	3-CQA	26994879
10	59,9	4-CQA	21851460

Replica 1

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA020
 Muestra: MUESTRA020
 Fecha: 21/12/2012 07:46:53 a.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm

Results

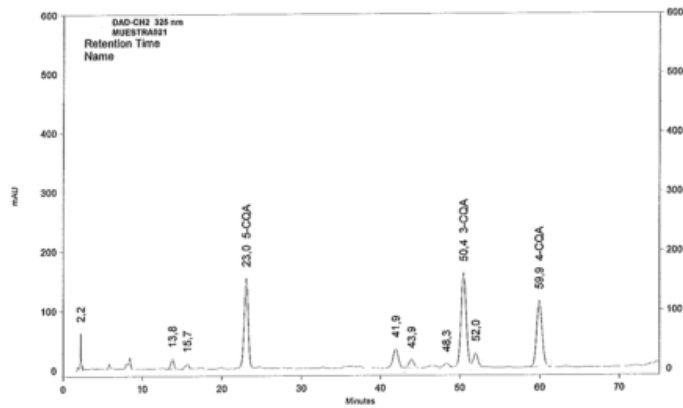
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
4	23,0	5-CQA	22727803
8	50,4	3-CQA	29293237
10	59,9	4-CQA	23745924

Replica 2

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA021
 Muestra: MUESTRA021
 Fecha: 21/12/2012 09:28:42 a.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm

Results

Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
4	23,0	5-CQA	21108970
8	50,4	3-CQA	27097375
10	59,9	4-CQA	21643701

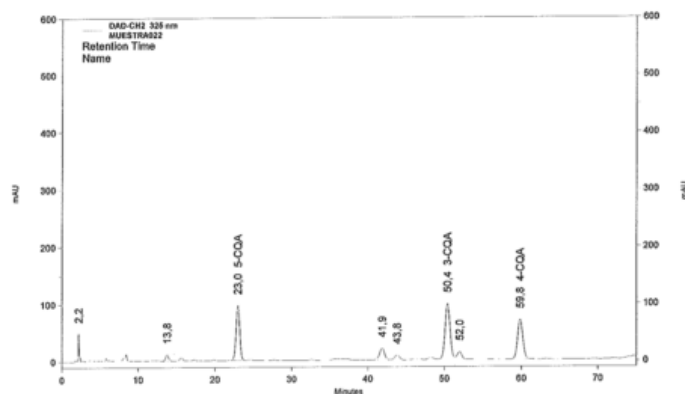
Replica 3

1.2.4. Hielo 3

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLESI\Data\19-12-2012\MUESTRA022
 Muestra: MUESTRA022
 Fecha: 21/12/2012 11:10:32 a.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
 Results

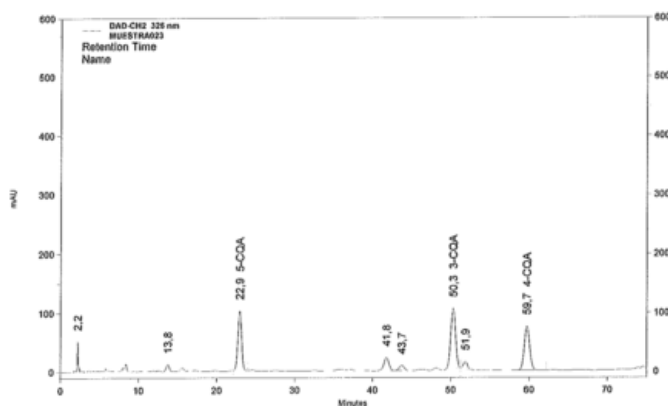
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
3	23,0	5-CQA	12678620
6	50,4	3-CQA	16726702
8	59,8	4-CQA	13470839

Replica 1

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOROGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLESI\Data\19-12-2012\MUESTRA023
 Muestra: MUESTRA023
 Fecha: 21/12/2012 12:52:22 p.m.
 DAD-CH2: 325 nm



DAD-CH2 325 nm
 Results

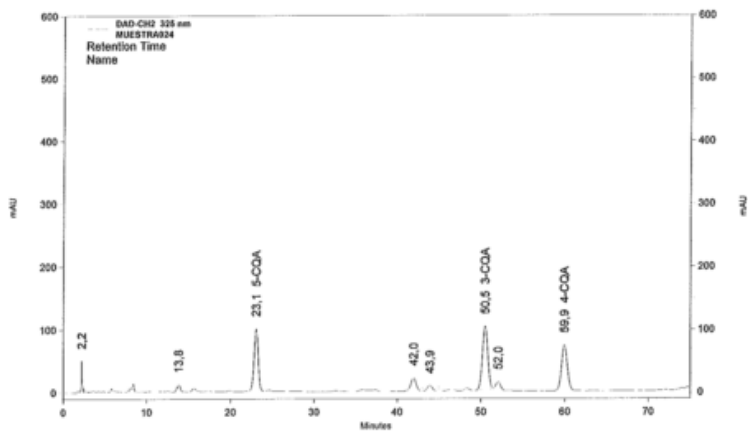
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
3	22,9	5-CQA	13451103
6	50,3	3-CQA	18022071
8	59,7	4-CQA	14546479

Replica 2

UNIVERSIDAD DE LA SABANA - FACULTAD DE INGENIERIA

ANALISIS DE ACIDOS CLOGENICOS Y CAFEINA

Data File: C:\DATOS HPLC\POLIFENOLES\Data\19-12-2012\MUESTRA024
 Muestra: MUESTRA024
 Fecha: 21/12/2012 02:34:07 p.m.
 DAD-CH2: 325 nm

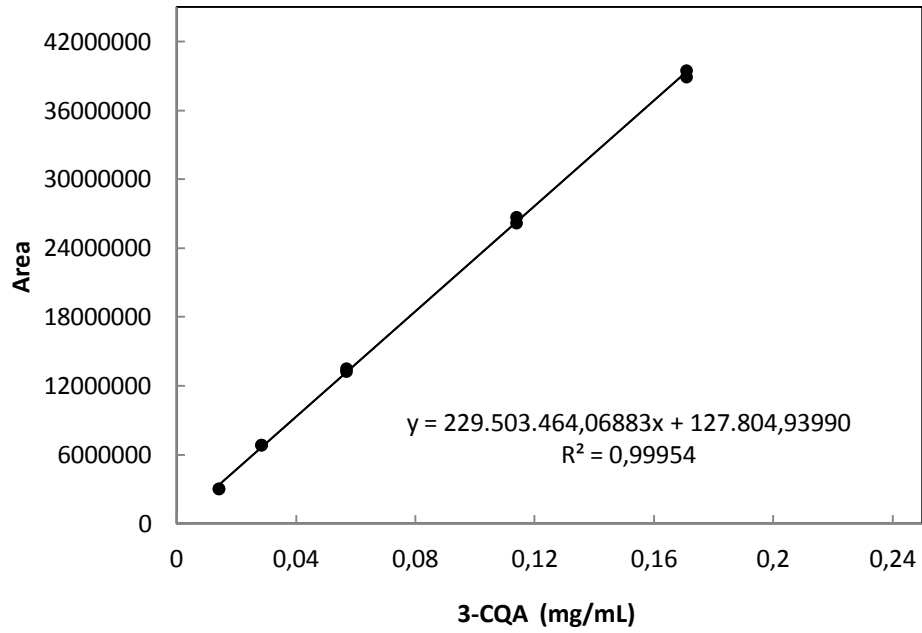


DAD-CH2 325 nm
 Results

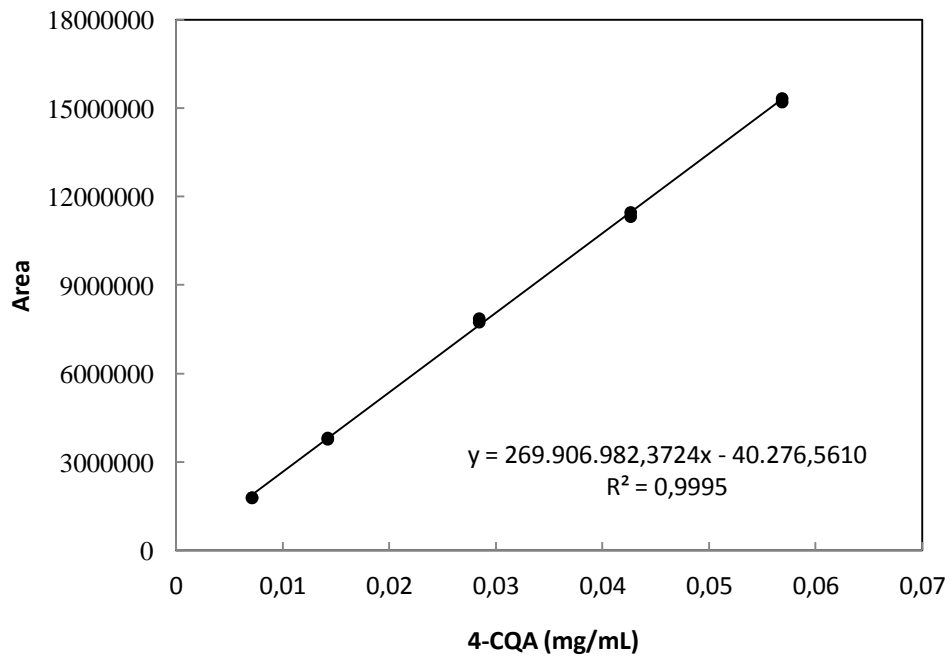
Pk #	Tiempo de Retención	Nombre	Area
3	23,1	5-CQA	13327557
6	50,5	3-CQA	17638892
8	59,9	4-CQA	14251417

Replica 3

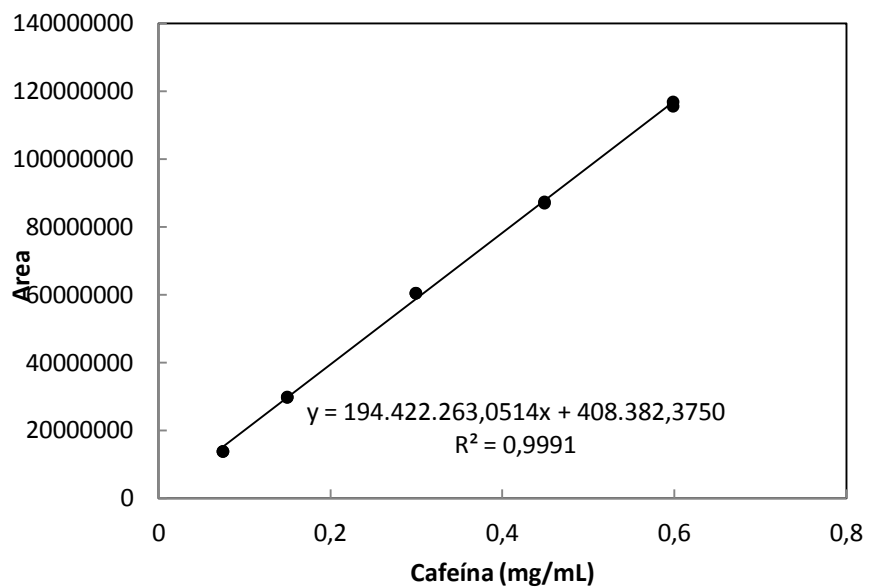
2. CURVAS DE CALIBRACIÓN



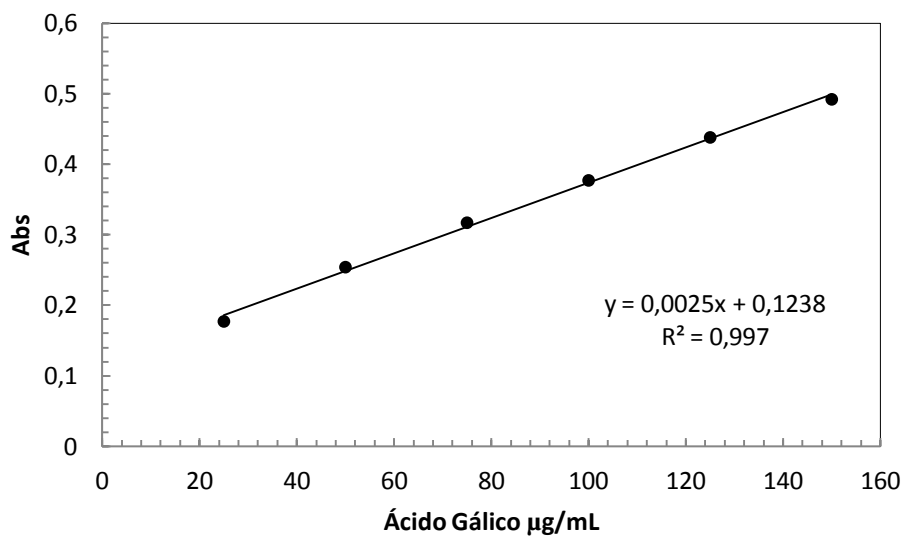
2.1. Curva de calibración 3-CQA



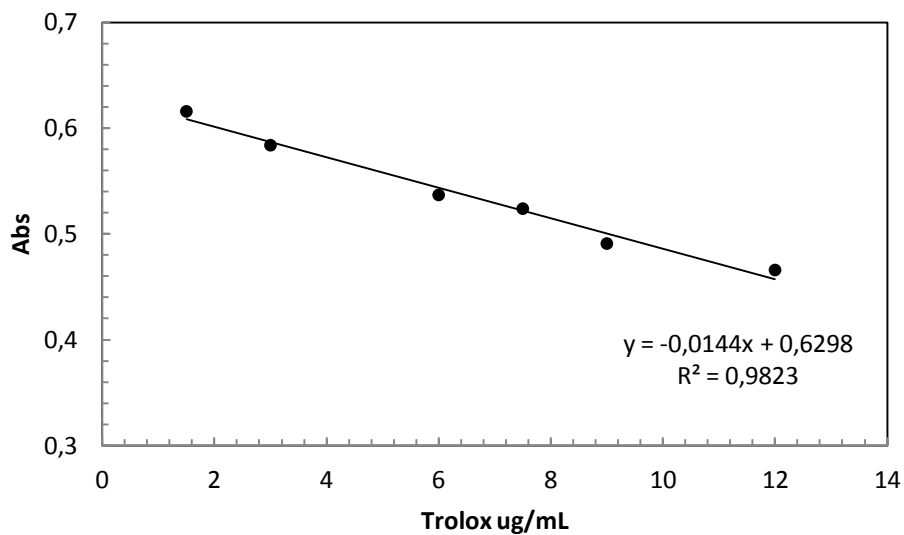
2.2. Curva de calibración 4-CQA



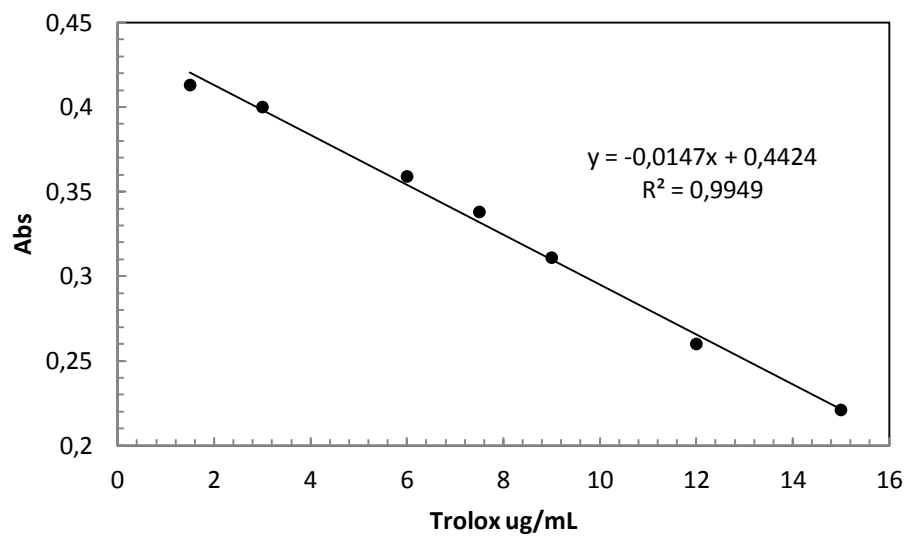
2.3. Curva de calibración cafeína



2.4. Curva de calibración polifenoles



2.5. Curva de calibración ABTS



2.6. Curva de calibración DPPH