

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café
(*Coffea arabica L.*) variedad Castillo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para obtener al título de
Magister en Innovación Alimentaria y Nutrición.

Norbey de la Cruz Tobón Arroyave

Asesor

Rodrigo Vargas Ortega

Químico; Magister en Ciencias Químicas

Coasesor

Luis Fernando Garcés Giraldo

Ingeniero Sanitario; Doctorate of Science; Doctor en filosofía, Magister en Ingeniería
ambiental; Master of Science.

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingenierías

Caldas Antioquia

2015

Tabla de contenido

Resumen	15
Abstract	17
Introducción	19
Justificación.....	22
Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos.....	24
Marco teórico	25
Generalidades del Café (<i>Coffea arabica</i> L)	25
Origen geográfico del café de Colombia	25
Origen botánico del café	25
Procesamiento del café.....	26
La pulpa de café	31
Composición química de la pulpa de café.....	31
Composición química proximal de pulpa de café.....	31
Compuestos orgánicos de interés	32
Compuestos mineralógicos	33
Constituyentes de paredes celulares.....	34
Componentes bioactivos presentes en la pulpa de café	37

Antecedentes	37
Investigación aplicada de pulpa de café.....	58
Salud.....	60
Tecnología del ultrasonido.....	62
Aspectos teóricos del ultrasonido.....	64
Extracción asistida con ultrasonido de componentes orgánicos de interés.....	66
Origen y tratamiento de la muestra	69
Análisis y modelamiento granulométrico de la pulpa de café (<i>Coffea arabica</i> L.) variedad Castillo	70
Materiales y métodos	73
Equipos.....	73
Metodología	73
Resultados	75
Análisis de la granulometría de la pulpa de café.....	75
Análisis gráfico de la distribución granulométrica de la pulpa de café	76
Análisis del Ajuste de los datos a los modelos empíricos de Rossin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S).....	78
Discusión.....	83
Conclusiones	84

Determinación de la composición químico proximal de la pulpa de café, (<i>Coffea arabica</i> L.) variedad Castillo.....	86
Materiales y métodos	87
Metodología para la determinación de la humedad	87
Resultados	89
Metodología para la determinación de las cenizas totales	91
Resultados	93
Metodología para la determinación de la Grasa.....	95
Resultados	97
Metodología para la determinación de fibra cruda	99
Metodología para la determinación de proteína cruda.....	102
Discusión.....	107
Conclusión	108
Determinación del contenido de fenoles totales de la pulpa de café, (<i>Coffea arabica</i> L.) de la variedad Castillo, obtenidos mediante la tecnología de extracción convencional.....	109
Materiales y métodos	110
Equipos.....	110
Metodología	110
Resultados	112
Valores encontrados en el laboratorio de la curva de calibración de ácido Gálico.	112

Valores encontrados para fenoles totales mediante la extracción por método convencional	114
Discusión.....	118
Conclusiones	120
Identificación del solvente con el que se obtenga la mejor extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en la pulpa de café	121
Materiales y métodos	122
Equipos.....	122
Metodología	123
Resultados	125
Discusión.....	129
Conclusiones	131
Determinación de las mejores condiciones para la extracción de compuestos fenólicos a partir de pulpa de café (<i>Coffea arabica</i> L.) variedad Castillo, mediante la tecnología de extracción asistida con ultrasonidos.....	132
Materiales y métodos	133
Equipos.....	133
Metodología	133
Resultados	135
Diseño base del diseño factorial por superficie de respuesta 3^2	135

Análisis de varianza del modelo	137
Análisis gráfico del modelo de maximización de la extracción asistida con ultrasonidos de fenoles totales de la pulpa de café	139
Discusión.....	149
Conclusiones	150
Evaluación de la composición de algunos compuestos fenólicos y la actividad antirradical In-vitro de los extractos de pulpa de café, con mayor contenido de fenoles totales.....	152
Materiales y métodos	152
Equipos.....	153
Resultados	157
Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos de la pulpa de café	161
Parámetros sobre la calidad del método analítico empleado en los análisis de los ácidos clorogénicos.....	167
Capacidad antioxidante extractos pulpa de Café	171
Discusión.....	174
Conclusiones	176
Conclusión general.....	177
Aporte del trabajo de investigación.....	178
Futuras líneas de investigación	179
Referencias bibliográficas.....	180

Lista de ilustraciones

Ilustración 1	Flujograma del procesamiento del café y sus subproductos.	29
Ilustración 2	Formula estructural del ácido cinámico.	41
Ilustración 3	Formula estructural del ácido cafeico	41
Ilustración 4	Formula estructural del ácido quínico.....	42
Ilustración 5	Formula estructural del ácido Clorógeno	42
Ilustración 6	Formula estructural de la Antocianidina del café	44
Ilustración 7	Formula estructural Cianidina-3-rutinosido.....	45
Ilustración 8	Formula estructural Cianidina-3-glucósido	45
Ilustración 9	Formula estructural ácido cafeíco	61

Lista de Tablas

Tabla 1 Composición química proximal de la pulpa de café.	32
Tabla 2 Compuestos orgánicos de interés en la pulpa de café.	33
Tabla 3 Compuestos mineralógicos en la pulpa de café.	33
Tabla 4 Constituyentes de paredes celulares y polisacáridos estructurales.	34
Tabla 5 Composición físico química de la pulpa de café, Cenicafé.	35
Tabla 6 Contenido de pectina, polifenoles, almidón y azúcar en la pulpa de café.	36
Tabla 7 Concentración de compuestos fenólicos de pulpa de café en base seca.	47
Tabla 8 Análisis de ácidos hidroxicinámicos por HPLC.	50
Tabla 9 Contenido ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café seca.	51
Tabla 10 Ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café.	52
Tabla 11 Cuantificación por HPLC (a) de los compuestos fenólicos presentes en pulpa	55
Tabla 12 Composición proximal pulpa de café.	57
Tabla 13 Fraccionamiento de la pared celular de pulpa de café.	58
Tabla 14 Valores obtenidos de la granulometría en pulpa de café.	75
Tabla 15. Parámetros de los modelos empíricos de Rossin-Rammler (R-R) y Gates- Gaudin-Schuhmann (G-G-S).	83
Tabla 16 Datos y resultados laboratorio cálculo de humedad.	89
Tabla 17 Resumen estadístico para humedad.	90
Tabla 18 Datos obtenidos y cálculo del porcentaje de cenizas en base húmeda, en base seca y materia orgánica.	93

Tabla 19	Resumen estadístico para cenizas en base húmeda.....	94
Tabla 20	Resumen estadístico para cenizas en base seca	94
Tabla 21	Datos y cálculo del extracto etéreo	97
Tabla 22	Resumen estadístico para extracto etéreo	98
Tabla 23	Datos y resultados fibra cruda.....	101
Tabla 24	Resumen estadístico para fibra cruda.....	101
Tabla 25	Datos obtenidos y cálculo del nitrógeno y proteína en porcentaje	105
Tabla 26	Resumen estadístico para proteína	106
Tabla 27	Matriz de experimentos diseño completamente al azar	112
Tabla 28	Resultados curva de calibración ácido gálico	113
Tabla 29	Contenido de fenoles totales en pulpa de café, extracción convencional	114
Tabla 30	Resumen estadístico para fenoles totales, extracción convencional	116
Tabla 31	Análisis de varianza (ANOVA) para fenoles totales por tratamiento.....	116
Tabla 32	Pruebas de múltiple rangos para fenoles totales por tratamiento.....	117
Tabla 33	Matriz de experimentos diseño completamente al azar	124
Tabla 34	Datos y resultados de la influencia del solvente en la extracción asistida con ultrasonido de fenoles totales.....	125
Tabla 35	Resumen estadístico para Fenoles Totales.....	126
Tabla 36	ANOVA para Fenoles por Tratamiento	127
Tabla 37	Pruebas de Múltiple Rangos para Fenoles por Tratamiento	128
Tabla 38	Matriz de experimentos diseño factorial 3^2 completamente aleatorizado.....	134

Tabla 39 Datos y resultados de fenoles extracción asistida con ultrasonido, maximización	136
Tabla 40 Análisis de Varianza para el diseño factorial 3^2	137
Tabla 41 Maximizar respuesta	143
Tabla 42 Coeficiente de regresión para Fenoles Totales	144
Tabla 43 Resultados estimados para fenoles totales teórico versus experimental	146
Tabla 44 Modo gradiente solvente fase móvil.	154
Tabla 45 Parámetros de las curvas de calibración para los ácidos hidroxicinámicos	158
Tabla 46 Tiempo de retención de los ácidos hidroxicinámicos evaluados para extracto de pulpa de café	161
Tabla 47 Cuantificación de los compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos) en extracto de pulpa de café.....	162
Tabla 48 Datos de la curva de calibración estándares de ácidos clorogénicos	164
Tabla 49 Cuantificación de los compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos) en extracto de pulpa de café.	166
Tabla 50 Límites de detección y límites de cuantificación	169
Tabla 51 Análisis de la precisión del método cromatográfico	170
Tabla 52 Ecuación de la línea recta para la curva calibración ORAC	171
Tabla 53 Curva calibración TEAC ABTS	172
Tabla 54 Actividad antioxidante ORAC	173
Tabla 55 Actividad antioxidante TEAC ABTS	173

Lista de ecuaciones

Ecuación 1	Modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S).....	71
Ecuación 2	Ecuación linealizada del modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S).....	72
Ecuación 3	Modelo matemático Rosin-Rammler (R-R).....	72
Ecuación 4	Ecuación linealizada del modelo Rosin-Rammler (R-R).....	73
Ecuación 5	Línea recta del modelo linealizado de Rosin-Rammler (R-R).....	78
Ecuación 6	Linealización del modelo Rosin-Rammler (R-R) para pulpa de café	79
Ecuación 7	Modelo matemático Rosin-Rammler (R-R) granulometría pulpa de café	80
Ecuación 8	Línea recta del modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S)	81
Ecuación 9	Linealización del modelo Gates-Gaudin-Schumann (G-G-S)	82
Ecuación 10	Modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S) granulometría pulpa de café.	82
Ecuación 11	Cálculo de humedad	88
Ecuación 12	Cálculo de cenizas en base húmeda	92
Ecuación 13	Cálculo de cenizas en base seca	93
Ecuación 14	Cálculo materia orgánica.....	93
Ecuación 15	Cálculo del extracto etéreo (grasa).....	97
Ecuación 16	Cálculo de fibra cruda	100
Ecuación 17	Calculo porcentaje nitrógeno	103
Ecuación 18	Calculo porcentaje proteína.....	104
Ecuación 19.	Ecuación de regresión múltiple ajustada a los datos experimentales.....	145

Ecuación 20. Ecuación de regresión múltiple ajustada a los datos experimentales (modelo reducido).....	145
Ecuación 21. Correlación valores experimentales versus valores teóricos.....	147
Ecuación 22. Correlación valores experimentales versus teóricos modelo reducido	148
Ecuación 23 modelo de cálculo de compuestos fenólicos por HPLC DAD	155

Lista de gráficos

Gráfico 1 Porcentaje en peso pasante acumulado <i>versus</i> diámetro de partícula.....	77
Gráfico 2 Modelo linealizado de Rosin-Rammler (R-R) para pulpa de café.....	79
Gráfico 3 Modelo linealizado de Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S).....	81
Gráfico 4 Curva de calibración de ácido gálico	114
Gráfico 5 Diagrama de Pareto estandarizado para fenoles totales	140
Gráfico 6 Efectos principales para fenoles totales	141
Gráfico 7 Interacción de factores para fenoles totales	142
Gráfico 8 Superficie de respuesta estimada	143
Gráfico 9 Validación del modelo experimental <i>versus</i> teórico completo	147
Gráfico 10 Validación del modelo experimental <i>versus</i> teórico reducido.....	148
Gráfico 11 Curvas de calibración estándares de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos)	158
Gráfico 12 Cromatogramas comparativo entre una muestra de análisis (pulpa de café) (a) y el mix de estándares de ácidos hidroxicinámicos (b).	160
Gráfico 13 Curvas de calibración de los estándares de compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos).....	163
Gráfico 14 Cromatograma comparativo entre una muestra de análisis (pulpa de café) y el mix de estándares de ácidos clorogénicos.....	165
Gráfico 15 Curva calibración para el método ORAC	171
Gráfico 16 Curva calibración TEAC ABTS	172

Dedicatoria

A mi padre eterno, *Dios*

Al tesoro más grande que tengo, *mi familia*

A mi equilibrio, mi complemento y felicidad, *mi esposa Carmen Tulia Arroyave Vargas*

A la prolongación de la vida, *mi hijo Emmanuel*

A la memoria de mi padre, *José Antonio Tobón Maya*

A una mujer ejemplar, *mi madre Carmen Libia Arroyave de Tobón*

A Gavú, *porque en su mundo operan otras leyes diferentes a la racionalidad del ser humano.*

Agradecimientos

El logro de este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin la colaboración de:

Rodrigo Vargas Ortega, asesor.

Doctor Luis Fernando Garcés, Coasesor.

Andrés Felipe Cerón Cárdenas.

María Eugenia Villada Ramírez, jefe del centro de laboratorios y su equipo de trabajo: Diana Marcela Correa, Carlos Arturo Duque Otalvaro, Juan Pablo Sánchez Sánchez (Laboratorio de Química); Alejandro de Jesús Gómez Rave y Yurley Karine Londoño Muñoz (Laboratorio de Ciencias Biológicas); Gloria María Mejía Zapata (Laboratorio de Ambiental).

A la Corporación Universitaria Lasallista y la Universidad Nacional de Colombia.

Finalmente a todos los profesores de la Maestría en Innovación Alimentaria y Nutrición, por sus enseñanzas y orientaciones en el trabajo de investigación.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar las mejores condiciones en la extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de la pulpa de café. La materia prima utilizada fue pulpa de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad Castillo; se inició con el secado y adecuación de la materia prima; se analizó la granulometría por tamizado y se representó el tamaño de partícula mediante los modelos de Rosin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudín-Schuhmann (G-G-S); paralelo a ello se realizó una caracterización químico proximal del material de estudio de acuerdo a los métodos oficiales de análisis de la A.O.A.C; seguidamente se realizó una extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa de café mediante extracción convencional utilizando los solventes: metanol, agua y etanol y los fenoles totales fueron determinados por el método de Folin Ciocalteu; nuevamente se realizó la extracción de los compuestos fenólicos en pulpa de café, por medio del ultrasonido bajo condiciones mínimas con los solventes agua, etanol y su mezcla al 50 %, los fenoles totales fueron igualmente determinados por el mismo método. Seguidamente se procedió a encontrar las mejores condiciones de frecuencia y tiempo en la extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos en pulpa, con la mezcla agua-etanol seleccionada, empleando un diseño factorial 3^2 completamente aleatorizado. Los fenoles totales fueron medidos por el método de Folin Ciocalteu; a la mejor condición encontrada, se le cuantificaron sus principales ácidos clorogénicos y ácidos hidroxicinámicos por medio de HPLC-DAD, así como su actividad antirradical in vitro por medio del método de ORAC y TEAC ABTS.

Los resultados principales se resumen así: el modelo de Rosin-Rammler fue el que mejor representa los valores de la granulometría de pulpa con un r^2 de 0,9929; se encontró un material rico en proteína y fibra con 11,49 % y 27,493 % respectivamente; la mejor composición de fenoles totales encontrados por extracción convencional fue con metanol del orden de 6967,213 mg AGE/100g muestra seca, pero se descartó por ser un solvente regulado por estupefacientes y por ser más perjudicial para la salud en un eventual uso industrial; mediante extracción asistida con ultrasonido se encontró que el etanol y el agua no fueron muy buenos en la extracción de compuestos fenólicos, sin embargo su mezcla al 50 % fue la que mejor desempeño mostró con un valor de 5168,488 mg AGE/100 g muestra seca; teóricamente la maximización de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café sería con una frecuencia de 45,5295 Khz y de 47,5092 Khz para el modelo completo y el reducido respectivamente, un tiempo de 45 minutos y una potencia fija de 300 vatios, además el modelo encontrado tuvo la capacidad de representar en un 85,54 % y en un 84,63 % los valores experimentales respectivamente.

Para la cuantificación de los ácidos clorogénicos se obtuvo: ácido clorogénico (971,28 ppm), ácido neoclorogénico (72,85 ppm), ácido criptoclorogénico (117,31 ppm), ácido cafeico (24,97 ppm), ácido 3,5-dicafeoilquinico (265,51 ppm) y ácido 4,5-dicafeoilquinico (52,55) y para los Hidroxicinámicos: ácido cumárico (63,74 ppm), ácido ferúlico (75,70 ppm) y ácido sinápico (90,71 ppm). Finalmente la actividad antirradical in vitro de los extractos de pulpa de café mostro una actividad por el método de ORAC de 6426 mg TE/100ml y de 11010,55 mg TE/100ml de actividad medida por TEAC ABTS.

Palabras claves: pulpa de café, compuestos fenólicos, ultrasonido.

Abstract

The main objective of this research was to determine the best conditions in the ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from the pulp of coffee. The raw material used was pulp of coffee (*Coffea arabica* L.) of the variety Castillo; It began with the drying and suitability of raw materials; the particle size was analyzed by sieving and the particle size was represented by models Rosin-Rammler (RR) and Gates-Gaudin-Schuhmann (GGS); Parallel to this a proximal chemical characterization study material according to the official methods of analysis of AOAC was made; then extraction of phenolic compounds from the coffee pulp was performed using conventional solvent extraction using methanol, water and ethanol and total phenolics were determined by the Folin Ciocalteu method; back extraction of phenolic compounds in coffee pulp was conducted by means of ultrasound under minimum conditions with solvents water, ethanol and 50 % mixture, total phenols were also determined by the same method; then proceeded to find the best conditions of frequency and time in assisted extraction ultrasound of phenolic compounds in pulp, with the mixture water-ethanol selected using a factorial design 3^2 completely randomized total phenols were measured by the Folin Ciocalteu; the best condition found, was quantified main chlorogenic acids and hydroxycinnamic acids by HPLC-DAD and their antiradical activity in vitro by the method of ORAC and TEAC ABTS.

The main results are summarized as follows: the model of Rosin-Rammler was the one that best represents the values of the particle size of pulp with an r^2 of 0.9929; a material rich in protein and fiber with 11.49 % and 27.493 % respectively was found; the best composition of total phenols was found by conventional extraction with methanol in the order of mgAGE

6967.213/ 100 g dry sample, but was discarded for being a regulated drug and solvent to be more harmful to health in a possible industrial use; Ultrasound-assisted extraction was found that ethanol and water were not very good in the extraction of phenolic compounds, but its mixture of 50 % was the best performance was worth mg AGE 5168.488 / 100 g sample dry; maximizing the ultrasound assisted extraction of phenolic compounds of coffee pulp was at a frequency of 45.5295 kHz and 47,5092 Khz for the complete model and produced respectively, a time of 45 minutes and a set of 300 watts, the model found also had the ability to represent a 85.54 % and 84,63 % respectively .

For quantification of chlorogenic acids it was obtained: chlorogenic acid (971.28 ppm), neochlorogenic acid (72.85 ppm), criptochlorogenic acid (117.31 ppm), caffeic acid (24.97 ppm), 3,5 -dicaffeoilquinic (265.51 ppm) and 4,5-dicaffeoylquinic acid (52.55) and hydroxycinnamic: coumaric acid (63.74 ppm), ferulic acid (75.70 ppm) and sinapic acid (90.71 ppm). Finally in vitro antiradical activity of extracts of coffee pulp showed an activity ORAC method 6426 mg TE / 100ml and 11010,55 mg TE / 100ml activity measured by TEAC ABTS.

Keywords: coffee pulp, phenolic compounds, ultrasound.

Introducción

La producción de café en Colombia tiene como principal destino la exportación de materia prima en forma de café excelsa y un menor porcentaje es destinado para transformación por la industria local. Con los subproductos generados en las etapas de transformación no se evidencia una exportación importante y el aprovechamiento por la industria local es incipiente; todos los esfuerzos orientados al aprovechamiento de los subproductos de esta agroindustria se dirigen a mitigar el impacto ambiental (Oliveros, T., Sanz, U., Ramírez, G., & Tibaduiza, V., 2013), se emplean para la alimentación animal (mieles y pulpa) (Bressani, 1979), (Esquivel & Jiménez, 2012) (Rathinavelu & Graziosi, 2005) y la obtención de **ingredientes funcionales** para la industria alimentaria y de salud no se consolida, siendo actualmente de gran importancia (Ramírez Coronel, Mancera Torres, Augur, & Castañeda, 2007) y empieza a darse evidencia de su presencia en la pulpa del café¹, entre otros residuos de esta misma agroindustria (Murthy & Naidu, 2010).

Estudios recientes en alimentación humana se orientan en encontrar nuevas propiedades y aplicaciones nutricionales; dentro de los cuales se destacan los péptidos bioactivos isoflavonas, fitoesteroles, ácidos grasos poliinsaturados y polifenoles. De estos compuestos son mayoritarios los polifenoles que son de gran interés para las industrias alimentarias y farmacéuticas por su capacidad estrictamente antioxidante, antibacteriano, antiviral, y por sus propiedades anti-inflamatorias que los hacen compuestos bioactivos útiles para estas industrias. La recuperación

¹ **Pulpa de café:** con este nombre se conoce normalmente, en el ámbito del café, a la cascara o pericarpio del fruto de café. Se utilizará en la presente investigación este nombre por ser el más comúnmente utilizado y NO el de cascara.

de estos compuestos bioactivos por procesos limpios, inocuos, ambientalmente amigables y eficientes es crucial para el desarrollo y la masificación de productos naturales a base de fenoles para la salud humana y la nutrición (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006).

La presente investigación surgió a partir del interés de dar un mayor valor agregado al principal subproducto de la industria del café como lo es la pulpa, por sus componentes bioactivos, especialmente aquellos relacionados con los antioxidantes dentro de los cuales destacan los compuestos fenólicos, sustancias de gran interés en la industria alimentaria y de la salud como se ha mencionado antes. Se plantea para el presente trabajo de investigación determinar las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de café variedad Castillo mediante la tecnología de extracción asistida por ultrasonido para su posible aplicación en el campo industrial.

A continuación se explican brevemente las actividades requeridas para lograr el objetivo antes mencionado. El primer paso indispensable en toda investigación es lograr una caracterización del material objeto de estudio de allí que a la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad Castillo se le determina la composición químico proximal y muy importante igualmente se realiza el análisis de su granulometría dada su influencia en los procesos de extracción. Una vez caracterizado el material, se realiza el segundo paso que es la extracción de compuestos fenólicos mediante la tecnología de extracción convencional en la que se utilizan varios solventes, cuyo alcance es conocer cuál es el grado de extracción de cada uno de estos; para poder compararlos se realiza la prueba de fenoles totales presentes en la pulpa de café mediante el método de Folin Ciocalteu; el tercer paso consiste en identificar la influencia del tipo de solvente, el cual es seleccionado del punto anterior, en la extracción de compuestos fenólicos

(fenoles totales) mediante la tecnología de ultrasonido, es decir, se escoge un solvente o varios y se somete la muestra a una extracción de los compuestos bioactivos de interés mediante la aplicación del ultrasonido; esta tecnología por el fenómeno de cavitación rompe la pared celular permitiendo una mejor penetración del solvente, el resultado esperado en este proceso de investigación es lograr una mayor extracción de estos compuestos bioactivos, lo cual será validado con la misma prueba para fenoles totales; luego mediante el análisis estadístico de los resultados se determina cuál de los solventes es el mejor para la extracción de estos componentes aceptando o rechazando la hipótesis planteada, además se tendrá en cuenta para la selección del solvente varios factores como es su poder extractivo, su inocuidad, y resultados de otros estudios; el resultado de esta decisión permitirá llegar al paso cuarto que es la optimización de la extracción de compuestos fenólicos asistida con ultrasonidos, para lo cual se determinan los parámetros óptimos de (frecuencia y tiempo) para la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la pulpa de café (*Coffea arabica* L.), igualmente que en los pasos anteriores se realizaran las pruebas de comparación de la variable respuesta que son los fenoles totales a través del método de Folin Ciocalteu y con base en los análisis estadísticos se determina la mejor condición de extracción, aplicando en este caso el análisis por metodología de superficie de respuesta.

Finalmente, a la mejor condición de extracción de fenoles totales asistida con ultrasonidos, encontrada antes, se le realiza la evaluación de la composición de los fenoles por HPLC teniendo presente la disposición de estándares que se encuentren en la zona geográfica de estudio, así como su actividad antirradical In-vitro.

Justificación

Los procesos de transformación en la industria del café son múltiples y en cada uno de ellos se generan productos, que luego son transformados dándole un mayor valor agregado, también se generan subproductos que son procesados en un menor grado o casi nada. Es así como en cien kilogramos de café cereza recolectados, la pulpa de café representa un promedio de 40 % en base húmeda y un 29 % en base seca; siendo uno de los principales subproductos generados en la actividad cafetera. Buena parte de este subproducto es arrojado a las fuentes de agua ocasionando contaminación hídrica con consecuencias negativas para la flora y la fauna íctica, al igual que para el hombre que aguas abajo la utiliza para su consumo.

En buena parte del territorio colombiano la pulpa de café se esparce en los cafetales como fuente de materia orgánica siendo una actividad complementaria a la fertilización, y una cantidad muy pequeña es destinada a procesos de transformación. En Colombia el principal proceso realizado es su conversión en humus, bien sea por medio del lombricultivo o por compostaje, y en segundo lugar se encuentra su aprovechamiento como sustrato para la producción de hongos comestibles.

En general se puede afirmar, que en Colombia el potencial industrial que representan los subproductos del café, en especial el de la pulpa, no son aprovechados adecuadamente según su potencial bioactivo representado en: antioxidantes, fibra, carotenoides, ácido gálico y antocianinas; productos de alto valor para la industria farmacéutica, de la salud, y la alimentaria.

Por lo expuesto anteriormente, se plantea en esta investigación estudiar el aprovechamiento de los componentes bioactivos (ácidos fenólicos, principalmente) contenidos en el residuo de pulpa de café (*Coffea arabica L.*) variedad castillo mediante su extracción asistida con ultrasonidos por su alta eficiencia y por ser una de las llamadas tecnologías emergentes, con el propósito de dar un mayor valor agregado a este residuo, disminuir su impacto ambiental y proyectar la generación de una industria de ingredientes funcionales materia prima de gran interés para las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética entre otras.

Finalmente se plantea la pregunta de investigación en estos términos:

¿Cuál sería la combinación más adecuada de los factores frecuencia y tiempo y el tipo de solvente o mezcla para la extracción asistida con ultrasonidos de los compuestos fenólicos contenidos en la pulpa de café?

Objetivos

Objetivo General

Determinar las mejores condiciones en la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo.

Objetivos Específicos

- Analizar y modelar la granulometría en la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo y determinar su composición químico proximal.
- Determinar el contenido de fenoles totales en la pulpa de café, (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, obtenidos mediante la tecnología de extracción convencional.
- Identificar el solvente convencional con el que se obtenga la mejor extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en la pulpa de café.
- Determinar las mejores condiciones para la extracción de compuestos fenólicos a partir de pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, mediante la tecnología de extracción asistida con ultrasonidos.
- Evaluar la composición de algunos compuestos fenólicos y la actividad antirradical In-vitro de los extractos de pulpa de café, con mayor contenido de fenoles totales.

Marco teórico

Generalidades del Café (*Coffea arabica* L)

Origen geográfico del café de Colombia

El café colombiano (*Coffea arabica* L), se le encuentra en la latitud norte 1° a 11° , longitud Oeste 74° a 78°, altitud 1.000 a 2.000 msnm; de la región Andina, en las vertientes de las cordilleras Occidental, Central Y Oriental, con suelos de materiales geológicos de origen ígneo, metamórfico, sedimentario y de cenizas volcánicas. Suelos clasificados como Entisoles, Inceptisoles y Andisoles. (Puerta Quintero, 2003).

Origen botánico del café

El café de Colombia (*Coffea arabica* L.) se compone de las siguientes variedades: Caturra, Colombia, Típica, Borbón, Maragogype y Tabi; Las cuales se siembran en 19 departamentos del territorio colombiano con fines comerciales. En Colombia en algunos departamentos se favorecen más unas variedades por su adaptación agroclimatológica. (Puerta Quintero, 2003). **Clasificación:** Reino de las Plantas; subreino Tracheobionta; división Magnoliophyta; clase Magnoliopsida; subclase Asteridae; orden Rubiales; Familia Rubiaceae; género Coffea. (Murthy & Naidu, 2012), especie (*Coffea arabica* L.).

Procesamiento del café

Después de cosechados los frutos maduros de café, estos son llevados a los beneficiaderos para su procesamiento. El objetivo principal del beneficio es la obtención de las semillas del fruto, conocidas con el nombre de café pergamino seco; del proceso de beneficio se obtienen aproximadamente 1.629.000 toneladas de pulpa por año (cálculos basados en una exportación colombiana promedio de 10 millones de sacos al año) (Rodriguez Valencia & Zambrano Franco, 2012), de las cuales sólo se aprovecha un pequeño porcentaje para la obtención de hongos comestibles y para la fertilización en forma de humus. El café de la especie (*Coffea arabica L.*) representa el 75 % de la producción mundial, (Mussatto, Machado, Martins, & Teixeira, 2011).

Fruto de café

El fruto de café o cereza de café, está constituido por la cascara o endocarpio, una capa mucilaginosa llamada mesocarpio y la pulpa o exocarpio. La semilla de café presenta una superficie plana y se encuentran dos unidades dentro del fruto de café (el café es el principal contribuyente de la dieta sobre la ingesta de antioxidantes, seguido de vino tinto, zumo de fruta y del té (Suri & Crozier, 2012)), cada semilla está contenida dentro de la membrana conocida como pergamino, una capa que es dura una vez se ha secado en el proceso del beneficio del fruto de café. Estas semillas a su vez están cubiertas por una gruesa capa de células esponjosas que conforman la pulpa de café, su espesor aproximado es de unos 5 mm, (Bressani, 1979) y es retirada mientras el grano se encuentre fresco, (Mussatto et al., 2011). Durante el proceso de maduración del fruto de café se producen cambios físicos y químicos que permiten definir el

estado de madurez adecuado para su recolección. (Marín López, Arcila Pulgarín, Montoya Restrepo, & Oliveros Tascón, 2003).

Separación de las semillas del fruto de café

Esta etapa consiste en separar las semillas del café (endocarpio) de la pulpa (mesocarpio) del fruto. Debido a la consistencia viscosa del mucilago que rodea la semilla del café, esta propiedad es aprovechada para separarla por medio mecánico con despulpadoras de café, las cuales aplican una presión al fruto logrando de esta manera la separación de las semillas del fruto de café. Se obtiene en este proceso un subproducto que es la pulpa de café, la cual representa en promedio un 29 % de peso en seco. En las fincas cafeteras la pulpa normalmente es destinada al procesamiento en la obtención de humus para su posterior aplicación en los cafetales, poco o casi nada es destinado a otros usos como para la extracción de compuestos bioactivos de interés industrial. (Puerta Quintero, 2010).

Desmucilaginado de la semilla de café

Una vez retirada la semilla de la pulpa, queda rodeada por una capa de mucilago muy viscosa, la cuál ha sido objeto de estudio también por su alto contenido en azúcares. Tradicionalmente la forma de separarlas es mediante el proceso de fermentación, durante un periodo que oscila entre 18 y 24 horas, al cabo de los cuales por medio del lavado con agua se logra la separación del mucilago de la semilla de café. Otra forma más reciente de separar el mucilago es por medio mecánico. (Puerta Quintero, 2010).

El Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé) desarrolló dicha tecnología la cual entregó al servicio de la industria cafetera en el año de 1990, con los llamados

desmucilaginosos mecánicos (Oliveros Tascón et al., 1995), su función principal es retirar el mucilago que cubre la semilla de café, mediante el principio físico de fricción y con un uso mínimo de agua que para el proceso es de alrededor de 0,7 litros por kilogramo de café. La semilla de café obtenida a través de alguno de los anteriores métodos es llevada en las fincas cafeteras al último proceso que es el secado.

Secado del café

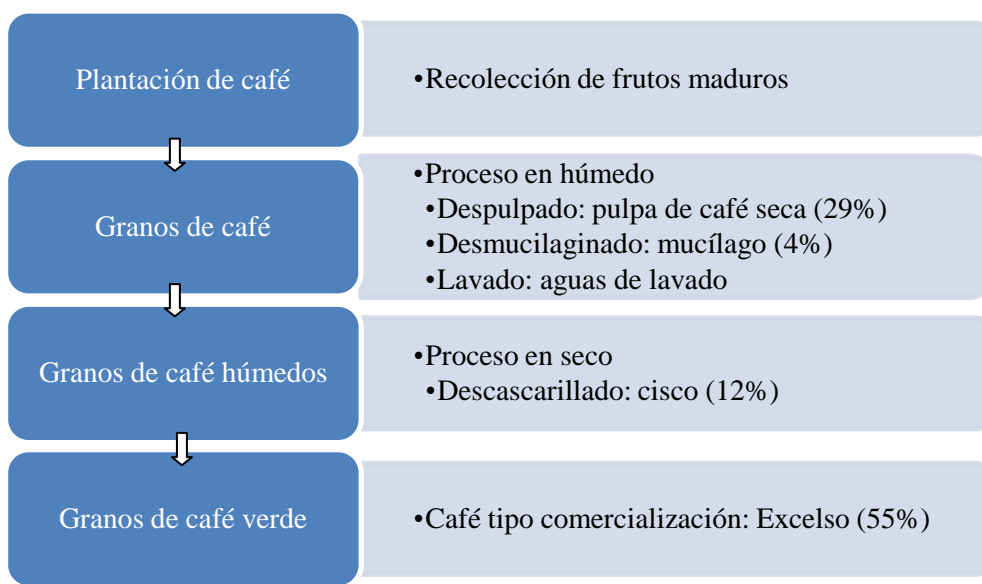
En forma general el proceso de secado de las semillas de café se puede realizar bien sea de forma natural aprovechando la luz solar, mediante instalaciones diseñadas para ello como son los carros de madera o bien por medio de parabólicos utilizando plástico para concentrar el calor solar y también se puede realizar el secado por medios mecánicos utilizando secadoras de café de diferentes diseños y con diferentes fuentes de calor y/o combustibles. Lo importante aquí es que independiente de la forma de secado lo que se busca es disminuir la actividad del agua, para lo cual se seca la semilla desde una humedad del 52 % hasta una humedad final del 10 al 12 %. (Montilla Pérez et al., 2008). Con este valor de humedad es que se comercializa la semilla conocida con el nombre de café pergamino seco.

Trillado, tosti3n y molienda

El café después de secado es trillado, lo cual consiste en aplicar fricción a la semilla de café pergamino seco por medios mecánicos del cual se obtiene el subproducto cisco y el grano llamado almendra verde. En una etapa posterior este café se tuesta, es decir, consiste en someter el café almendra obtenido en el trillado a elevadas temperaturas (250 °C) en tostadoras diseñadas especialmente para este proceso. Luego se muele y se obtiene el café tostado y molido listo para

empacarse y distribuirse en todo el mundo para consumo en los hogares, fábricas, almacenes y expendios, bien sea en grano o en café en polvo que también presenta una actividad antioxidante importante (Baggio, Lima, & Mancini, 2007). (Oliveros Tascon & Gonzalo Roa, 1999). En la ilustración 1 se resumen los procesos y los subproductos para cada una de las etapas del beneficio del café. La pulpa con un 29 % representa un valor importante.

Ilustración 1 Flujograma del procesamiento del café y sus subproductos.



Fuente: (Bressani, 1979).

Fermentación de pulpa de café

La pulpa en las fincas cafeteras es sometida a procesos de fermentación aeróbica para su posterior uso como fuente de humus para complementar los programas de fertilización en las fincas; algunos tratamientos de la pulpa se orientan en su utilización como sustrato para la producción de hongos comestibles y casi o nada para la obtención de otros compuestos de alto

valor agregado. En este sentido varias investigaciones se han realizado pero ya no desde la fermentación aeróbica sino anaeróbica con fines de mejoramiento en el proceso. Los resultados experimentales reportados indican que si se realiza la biotransformación, con 3% de melaza, se puede conservar la pulpa de café en perfectas condiciones por un lapso de 150 días, tiempo de duración de la cosecha del café. Las condiciones óptimas del ensilaje fueron: 80 % de humedad, pH: 3.6, ácidos grasos (g/100 g de materia seca); acético = 3.31; propiónico = 0.49; iso-butírico = no detectado; n-butirico= 0.41; isovalérico: no detectado; valérico: no detectado; y ácido láctico: 2.56, valores en (%p/p base seca). (Ferrer, Páez, Chirinos, & Mármol, 1995).

La pulpa de café es uno de los mayores subproductos de la industria con un 29 % en base seca; una finca típica de las zonas cafeteras de 5 hectáreas, con una producción de café pergamino seco de 200 arrobas por hectárea (@/ha), genera unas 25 toneladas de pulpa fresca de café al año, las cuales convertidas a pulpa seca (humedad aproximada de 9%) se tendrían 17 toneladas al año. En el supuesto de poseer un 4% de componentes bioactivos, se obtendrían por extracción unos 700 kilogramos de compuestos bioactivos, aditivos actualmente relevantes para su aplicación industrial, lo cual es de gran importancia, (Montilla Pérez et al., 2008).

Las investigaciones más recientes de la pulpa de café se han centrado en su aplicación como sustrato en bioprocesos y vermi-compostaje. Los estudios se han enfocado también en su desintoxicación para una mejor aplicación en la alimentación, y utilizarlos como un sustrato eficiente para la producción de varios productos de valor agregado, tales como: enzimas, ácidos orgánicos, sabor y compuestos aromáticos, hongos, etc. (Murthy & Naidu, 2012).

La pulpa de café

Composición química de la pulpa de café

Los primeros estudios de la composición química datan del año 1903 cuando se realizaron las primeras investigaciones sobre la composición fenólica del café, según lo reportó Abbas el Hamidi (Hamidi, 1963). Entre 1970 a 1979 la pulpa de café tuvo una intensa serie de investigaciones en diferentes países con el fin de ser utilizada en la alimentación animal, los principales estudios se realizaron en Centroamérica a cargo del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) (Bressani, 1979) donde Bressani fue el primero que realizó estudios sobre la composición química y la aplicación de tecnologías para el aprovechamiento de este residuo. A continuación se hace referencia de los estudios realizados por este autor, se consignando también los realizados por otros autores así como los reportados por el Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFE), ubicado en el municipio de Chinchiná Caldas (Colombia).

Composición química proximal de pulpa de café

En la Tabla 1 se puede apreciar la composición química. Se referencia en ella los contenidos para pulpa fresca, deshidratada y para pulpa fermentada naturalmente. Se evidencia un alto contenido de humedad en la pulpa fresca, de allí su dificultad para transportarla, normalmente lo que ocurre en las fincas cafeteras es que termina siendo dispersada en los cafetales, para incorporarla como materia orgánica y son pocas las fincas que someten la pulpa al proceso de secado.

Tabla 1 Composición química proximal de la pulpa de café.

Compuesto	Pulpa Fresca (%)	Pulpa Deshidratada (%)	Fermentada naturalmente y deshidratada (%)
Humedad	76,7	12,6	7,9
Materia seca	23,3	87,4	92,1
Extracto etéreo	0,48	2,5	2,6
Fibra cruda	3,4	21,0	20,8
Proteína cruda N*6.25	2,1	11,2	10,7
Cenizas	1,5	8,3	8,8
Extracto libre de N.	15,8	44,4	49,2

Fuente: Bressani, 1979.

Reportes sobre la composición química de café de otros autores indican para materia seca (259±1,1), proteína (80±0,1), grasa bruta (29±0,2), ceniza bruta (89±0,2), celulosa (286±1,0), fenoles totales (20±0,0), Taninos (7,4±0,08), cafeína (18±0,06), pH (4,5±0,01), valores expresados en g/kg. (Orozco et al., 2008), (Ulloa Rojas, Verreth, Van Weerd, & Huisman, 2002).

Compuestos orgánicos de interés

La pulpa es rica en componentes orgánicos (Pandey et al., 2000), entre los componentes bioactivos referenciados están los ácidos clorogénicos (2,6 %) y el ácidos cinámicos totales (1,6 %) como se observa en la Tabla 2, (Bressani, 1979). Ambos son compuestos antioxidantes que están relacionados con el mantenimiento de las defensas antioxidantes endógenas, la integridad y funcionalidad de las membranas celulares, evitando la peroxidación de las lipoproteínas y de las proteínas estructurales. (Londoño, 2011).

Tabla 2 Compuestos orgánicos de interés en la pulpa de café.

Compuesto	% base seca
Taninos	1,80 – 8,56
Sustancias pécticas totales	6,5
Azúcares reductores	12,4
Azúcares no reductores	2,0
Cafeína	1,3
Ácido clorógeno	2,6
Ácidos cinámicos totales	1,6

Fuente: (Bressani, 1979).

Compuestos mineralógicos

En relación con otros componentes químicos presentes en la pulpa de café, en la Tabla 3 se muestra la composición mineralógica. El Potasio se destaca en esta categoría por su alto contenido, alrededor de unos 1765 mg %. Este valor en su momento era considerado en un obstáculo en la formulación de piensos para la alimentación animal, según fue establecido por el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

Tabla 3 Compuestos mineralógicos en la pulpa de café.

Compuesto	Bresani	Cenicafé
Ceniza	8,3 g %	-
Ca	554 mg%	0,261 %
P	116 mg%	0,103 %
Fe	15 mg%	42,98 mg.kg ⁻¹
Na	100 mg%	-
K	1765 mg%	3,300 %
Mg	Trazas	0,084 %
Zn	4 ppm	6,58 mg.kg ⁻¹
Cu	5 ppm	24,10 mg.kg ⁻¹
Mn	6,25 ppm	24,30 mg.kg ⁻¹
B	26 ppm	51,87 mg.kg ⁻¹

Fuente: (Bressani, 1979) y (Sadeghian khalajabadi, Mejía Muñoz, & Arcila Pulgarín, 2006).

Constituyentes de paredes celulares

Los datos reportados por el INCAP para la composición química de las paredes celulares, al igual que los componentes estructurales se consignan en la Tabla 4. Estos contenidos son importantes ya que a partir de ellos, por procesos enzimáticos se obtienen compuestos bioactivos de alto valor para la industria alimenticia.

Tabla 4 Constituyentes de paredes celulares y polisacáridos estructurales.

Compuesto	%
Contenido celular	63,2
Fibra detergente neutra	36,8
Fibra ácida detergente	34,5
Hemicelulosa	2,3
Celulosa	17,7
Lignina	17,5
Proteína lignificada	3,0
Proteína cruda	10,1
Cenizas insolubles	0,4

Fuente: (Bressani, 1979).

Otros reportes relacionados con la composición de estos componentes en pulpa de café con una humedad del 80% en fresco indican para materia seca 90 %, grasa 5,02 %, fibra 15,26 %, proteína 11,58 %, cenizas 6,68 %, carbohidratos solubles (azúcares totales) 8,60 %, azúcares reductores 6,80 %, hemicelulosa 2,50 %, lignina 24,90 %, celulosa 19,50 %, cafeína 0,85 % y taninos 1,95 % por (Ferrer et al., 1995). Sometida la pulpa a procesos de fermentación controlada los reportes indican un aumento considerable en el contenido de proteína y fibra cruda, (44 y 82 %, respectivamente) así como una disminución apreciable en el extracto etéreo, en el extracto libre de nitrógeno, en la cafeína y los taninos, (61.20, 72 y 85 %, respectivamente).

Todo esto se explica por el incremento relativo en la celulosa y la lignina, y por la desaparición de la hemicelulosa, (Ferrer et al., 1995). (Anabella, Joachin, & Brossini, 2009) también realizaron estudios en este sentido.

Los últimos estudios realizados sobre la caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé), en el año de 1999. (Blandon Castaño, Davila Arias, & Rodriguez Valencia, 1999), Ver los resultados en la Tabla 5.

Tabla 5 Composición físico química de la pulpa de café, Cenicafé.

Compuesto	Contenido
Humedad (%)	74,83
pH	4,4
Cenizas (%)	6,66
Grasas (%)	1,60
Proteína (%)	11,00
Fibra (%)	11,43
CHO solubles (%)	69,31
MO (%)	93,34
C/N	30,72
N %	1,76
P, %	0,13
K, %	2,82
Ca, %	0,32
Mg, %	0,08
Fe, ppm	158,75
Zn, ppm	8,25
Cu, ppm	9,75
Mn, ppm	69,00
B, ppm	21,75

Fuente: (Blandon Castaño et al., 1999)

La pulpa de café ha sido estudiada como fuente de muchas aplicaciones, por ejemplo: producción de biogás y carbón activado (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2012), para la producción de bioetanol (Tavares Menezes et al., 2013), y producción de humus (Blandon Castaño et al., 1999) principalmente. A continuación se consignan los resultados de una investigación sobre el uso de extracto de pulpa para la producción de bioetanol; el reporte principal fue analizar el rendimiento para producción de bioetanol que en promedio fue de 70g/L, durante la investigación además se reportó la composición de: azúcares, almidón, pectina, y compuestos fenólicos, compuestos de interés para la presente investigación y por ello se muestran en la Tabla 6 (Tavares Menezes et al., 2013).

Tabla 6 Contenido de pectina, polifenoles, almidón y azúcar en la pulpa de café.

Muestra/tratamiento	Total azúcares (%)	Azúcares reductores (%)	Almidón (%)	Pectina soluble (*)	Total pectina (*)	Polifenoles (%)
Pulpa (**)	2,17±0,11 (12)	1,85±0,05 (10,2)	2,60±0,01 (14)	0,25±0,03 (1,39)	0,69±0,04 (3,83)	0,30±0,01 (1,67)
Extracto 1	4,69±0,25a	4,01±0,13a	0,10±0,01a	0,07±0,03a	0,18±0,01a	0,08±0,01a
Extracto 2	5,12±0,32b	4,01±0,21a	0,42±0,12b	0,09±0,01a	0,18±0,01a	0,08±0,01a
Extracto 3	5,45±0,15b	4,12±0,11b	0,67±0,18bc	0,07±0,01a	0,16±0,01a	0,12±0,01b
Extracto 4	5,48±0,19b	4,30±0,07b	1,17±0,16d	0,25±0,01b	0,49±0,01b	0,19±0,01c

Fuente: (Tavares Menezes et al., 2013).

Las medias seguidas por letras iguales en la misma columna no difieren en el 5% de probabilidad mediante la prueba de Tukey.

* Unidad: mg ácido poligalacturónico/100 g extracto de pulpa de café.

** Los valores entre paréntesis son sobre una base seca, y la humedad de la pulpa fue de 82%.

Durante el año 1997 se realizó por el método de HPLC (ATHPLC) un estudio en este mismo sentido sobre la composición de azúcares en pulpa de café mediante hidrólisis ácida y los reportes indican para azúcares simples entre 12.87-20.31 % y 14.02-19.01 %; azúcares totales por el método ácido sulfúrico (ATFA) entre 23.41-19.07 % y 25.74-30.58 %; azúcares

reductores (AR) determinado por el método 3-5 dinitrosalicílico entre 10.24-19.07 % y 9.66-17.85 % para las concentraciones (C) de ácido, de 0.5 al 2.0 % (p/v) y los tiempos de reacción (T) de 30 a 240 minutos respectivamente, todos expresados en g/100 g de pulpa seca según (Urbaneja, Arenas, Paez, Colina, & Sandoval, 1997).

Recapitulando se puede decir que la pulpa del café es esencialmente rica en hidratos de carbono, proteínas y minerales (especialmente Potasio) y también contiene apreciables cantidades de taninos, polifenoles y cafeína (Bressani et al.,1972), (Murthy & Naidu, 2012) reportan para ácidos clorogénicos 2,4 %, cafeína 1,5 % y taninos 3,0 %.

Componentes bioactivos presentes en la pulpa de café

Antecedentes

El estudio de los componentes bioactivos del café inició hacia el año 1900 con la descripción de los ácidos clorogénicos y de la cafeína por los investigadores Griebel (1903) y Gorter (1907), según lo ha reportado el investigador Abbas el Hamidi (Hamidi, 1963). Este último autor llevo a cabo hacia la década del sesenta las primeras investigaciones sobre el contenido de estos ácidos en los tallos, hojas y frutos del café en sus diferentes grados de madurez. Con respecto a lo que interesa para el subproducto de la pulpa, este investigador encontró que la cantidad de estos ácidos en el pericarpio del fruto verde es mayor a un (1) mg y en estado maduro es inferior a un (1) mg.

Nuevos estudios sobre el contenido de estos ácidos en la planta de café se realizaron hacia la década de los años setenta con el investigador Ricardo Bressani, el cual se enfocó

además del estudio de la composición química y mineralógica, también en la identificación de los componentes bioactivos de la pulpa de café, encontrando que el contenido de ácidos clorogénicos es de 2,6 % en base seca y reporto para ácidos cinámicos totales el valor de 1,6 % en base seca (Bressani, 1979).

Hacia la década de los ochentas se realizó por primera vez un estudio a profundidad de los compuestos bioactivos de la pulpa de café empleando la técnica analítica HPLC, se encontró que del cien por ciento del contenido de compuestos fenólicos identificados por HPLC en pulpa de café fresco da una composición media como sigue: ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquinico), 42,2 %; epicatequina, un 21,6 %; ácido isoclorogenico I, 5,7 %, ácido isoclorogenico II, 19,3 %; ácido isoclorogenico III, 4.4 %; catequina, 2,2 %; rutin, 2.1 %; ácido protocatéquico, 1,6 %, y ácido ferúlico, 1,0 %, (Ramirez Martinez, 1988).

Posterior al año 2000 las investigaciones realizadas sobre la pulpa y el grano de café se han enfocado en identificar, cuantificar y medir la biodisponibilidad de compuestos bioactivos de gran importancia para la salud, el enfoque principal se ha centrado en el estudio de las antocianinas, los carotenoides, fibra y se han realizado muchas investigaciones sobre los polifenoles, (Esquivel & Jiménez, 2012), (Murthy & Naidu, 2012) y se han utilizado técnicas modernas de extracción como fluidos supercríticos (Hernandez, Chen, Chang, & Huang, 2009), entre otros. Respecto de los polifenoles, la biodisponibilidad del ácido clorogénico, uno de los principales polifenoles de la dieta humana que es particularmente abundante en el café y frutas diversas (Balasundram et al., 2006), se exploró en ratas con el objetivo de identificar la forma bajo la cual se absorbe a través de la mucosa intestinal y el sitio de absorción a lo largo del tracto gastrointestinal, las ratas se alimentaron con una dieta suplementada con ácido clorogénico (0,25

%, peso:peso), se ha demostrado por primera vez en este estudio que el ácido clorogénico se absorbe rápidamente en el estómago de rata en su forma intacta según (Lafay et al., 2006).

Otras posibles aplicaciones de la pulpa de café están relacionadas con el contenido de celulosa, por ejemplo, debido a que es un homopolímero lineal de unidades de glucosa repetidas las cuales son usadas extensivamente para la producción de pulpa y papel. Además de esta potencial aplicación la celulosa se puede convertir en azúcares tales como polisacáridos, oligosacáridos, y monosacáridos por diferentes procesos de tratamiento que utilizan ácidos o enzimas como catalizadores (Mussatto et al., 2011) . La conversión de celulosa en glucosa es el primer paso en la utilización química a gran escala de la celulosa ya que este azúcar se puede convertir posteriormente a varios productos de interés, como: el etanol (Mesa et al. 2010; Shen y Agblevor 2010), butanol (Qureshi y Ezeji 2008), hidrógeno (Pan et al 2010; Ren et al 2009), ácidos orgánicos (Mussatto et al 2008; Zhuang y otros 2001), glicerol (Taherzadeh et al. 2002), y hidroximetilfurfural (Huang et al 2010) , entre otros, citados por (Mussatto et al., 2011).

En este mismo sentido varios autores citados por (Martins et al., 2011) señalan la importancia del uso de los residuos agrícolas para la producción de varios compuestos, incluyendo pulpa de café, que han sido utilizados como soportes y/o sustratos para la producción de compuestos valiosos por la fermentación en estado sólido (SSF), tales autores han investigado en: enzimas (Guimarães et al, 2009; Mamma et al, 2008; Oliveira et al, 2006; Sabu et al, 2005), ácidos orgánicos (John et al, 2006; Sharma y otros, 2008; Vandenberghe et al, 2000), antibióticos (Adinarayana et al, 2003; Ellaiah et al, 2004), el sabor y componentes de aroma (Medeiros et al, 2006; Rossi et al, 2009; Sarhy- Bagnon et al , 2000), y compuestos bioactivos (Hernández et al, 2008; Vattem y Shetty, 2003).

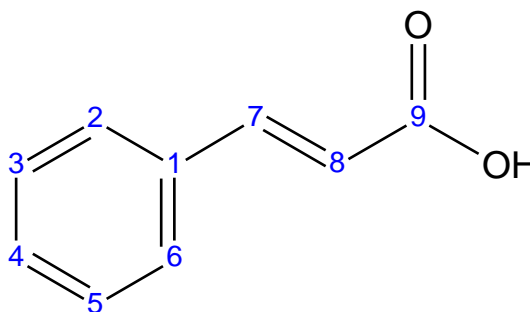
Reporta (Martins et al., 2011) la importancia de la utilización del microorganismo *Streptomyces sp.* en la fermentación de la pulpa de café en estado sólido (SSF), porque este proceso biotecnológico tiene el potencial de convertir correctamente este residuo agroindustrial de bajo costo, en una gran variedad de compuestos valiosos, indicados en el párrafo anterior, lo cual puede ser valiosa esta técnica de extracción, realizada también por (Machado, Rodriguez-Jasso, Teixeira, & Mussatto, 2012).

En síntesis los diferentes estudios sobre la composición química de la pulpa de café reportan que los principales componentes fenólicos son los ácidos clorógenicos y el ácido cafeico. El primero corresponde a una esterificación entre el ácido cafeico y el ácido quínico, el segundo hace referencia a un ácido hidroxicinámico que se encuentra libre.

Ácidos hidroxicinámicos

Los alimentos y los subproductos (pulpa de café) contienen ácidos hidroxicinámicos que son un grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal, cuyos principales representantes son el ácido ferúlico, p-cumárico, cafeico y sinápico, de los cuales el ácido ferúlico y p-cumárico son los de mayor abundancia en la naturaleza. Están formados básicamente por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados hidroxicinámicos por la sustitución del grupo -OH (hidroxilo) en el anillo aromático. (Guerrero A., Suarez, & Moreno Ruiz, 2003), (Marín García & Puerta Quintero, 2008) y (Häkkinen, 2000), ver Ilustración 2, 3 y 4, realizadas mediante el software Acclabs.

Ilustración 2 Formula estructural del ácido cinámico.



Sustituyentes

C3	C4	C5	
H	OH	H	p-cumárico
OH	OH	H	cafeico
OCH3	OH	H	ferúlico
OCH3	OH	H	sinápico

Los ácidos hidroxicinámicos, por lo general se encuentran esterificados en la pared celular vegetal y poseen una baja solubilidad. Otra forma en la que se encuentran presentes es como ácido clorogénico (ácido cinámico + ácido quínico, preferentemente), son solubles y se presentan en altas concentraciones en bebidas como el café y el jugo de manzana. Estas sustancias son benéficas para el organismo”. (Guerrero A. et al., 2003), (Marín García & Puerta Quintero, 2008).

Ilustración 3 Formula estructural del ácido cafeico

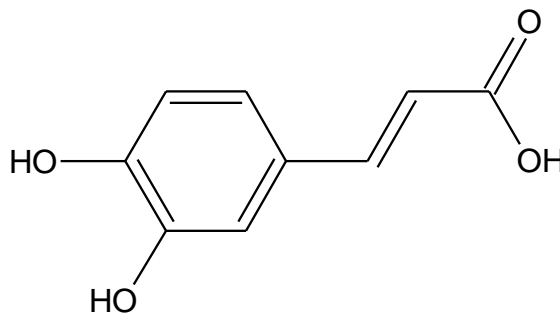
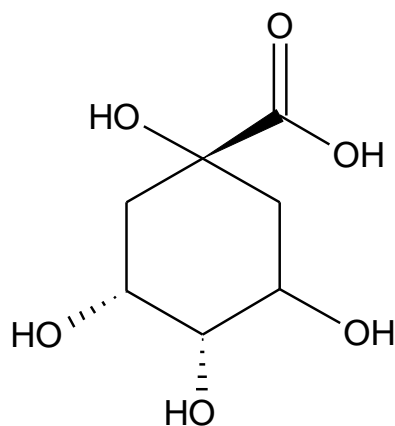


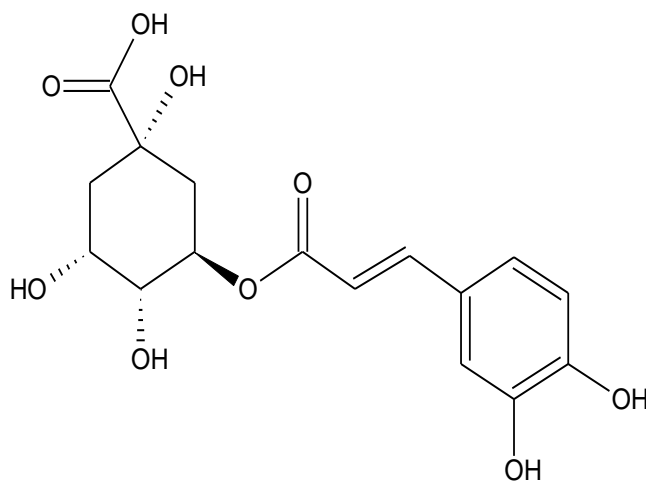
Ilustración 4 Formula estructural del ácido quínico



Ácidos clorogénicos

Los ácidos hidroxicinámicos (Cafeico, Ferúlico, Cumárico y Sinápico) cuando están esterificados con el ácido quínico forman los llamados ácidos clorogénicos. (Ver ilustración 5).

Ilustración 5 Formula estructural del ácido Clorogénico



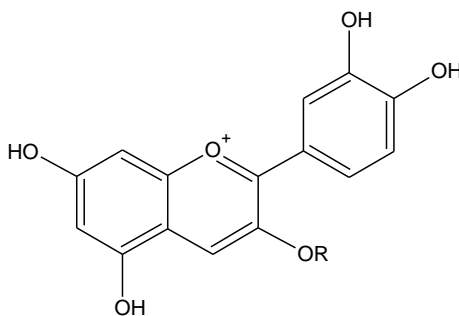
A continuación debido al interés que representan los componentes bioactivos se presentan además de los principales reportes del estudio de los compuestos polifenólicos otras investigaciones referidas a otros compuestos orgánicos de interés realizados en pulpa de café.

Antocianinas

El renovado interés en las antocianinas ha surgido a causa de sus beneficios potenciales para la salud como: agentes antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y por su efecto anti-hipoglicémico. Debido a que durante el paso desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos las antocianinas permanecen intactas, de allí que puede tener un impacto directo sobre la salud humana (Murthy, Manjunatha, Sulochannama, & Naidu, 2012).

Las antocianinas son pigmentos vegetales hidrosolubles ampliamente distribuidos en frutas y flores de colores. Esta coloración puede deberse a un mecanismo de defensa, para proteger a las plantas, sus flores y sus frutas contra la luz ultravioleta (UV) y, por su propiedad antioxidante. Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, significa que están constituidas por una molécula de Antocianidina (ver Ilustración 6) que es la Aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Prata y Oliveira citados por (Esquivel & Jiménez, 2012) fueron los que primero describieron el uso de pulpa de café fresca como fuente potencial de la antocianina cianidina- 3- rutinósido.

Ilustración 6 Formula estructural de la Antocianidina del café



Dónde:

R= glucosa o rutenose

(Murthy et al., 2012) en el año 2012 realizaron un estudio sobre estos compuestos en la pulpa de café, teniendo como principal objetivo evaluar el potencial bioactivo, además de identificar y caracterizar estos compuestos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), ionización por electrospray acoplada a masas (ESI-MS) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) en procura de comprender su actividad biológica.

Los principales resultados encontrados por estos autores resaltan que en la pulpa de café la antocianina fue de $24 \pm 2,0$ mg de antocianinas monoméricas /100 g de pulpa en base seca. El color polimérico de las antocianinas fue de $23 \pm 5,0$ (%). Los polifenoles, incluyendo flavonoides, ácidos fenólicos y proantocianidinas en la pulpa de café fue de $4,55 \pm 0,15$ mg, expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE), lo que demostró tener actividad antioxidante.

Los espectros de masas de los dos picos recogidos del HPLC para las antocianinas identificadas fueron de cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido (ver ilustración 7 y 8

respectivamente). Los autores concluyen que el color rojo de la pulpa de café se debe a la presencia de cianidina-3-rutinosido, el cual fue confirmado por H-NMR y C-NMR.

Ilustración 7 Formula estructural Cianidina-3-rutinosido

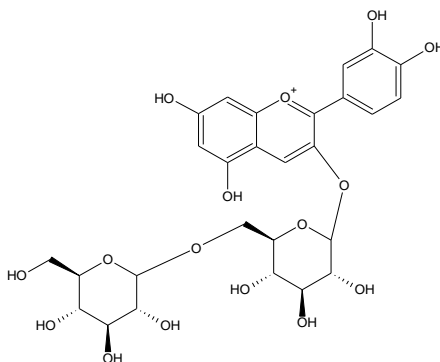
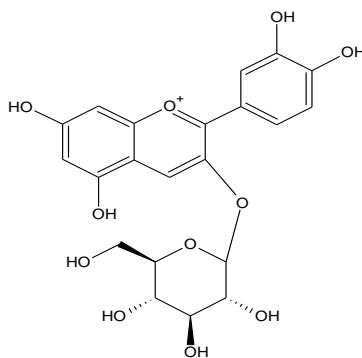


Ilustración 8 Formula estructural Cianidina-3-glucósido



Las antocianinas de la pulpa de café mostraron también una actividad inhibidora, medición realizada por DPPH, expresada en equivalentes trolox a una concentración de 500 ug/mL, eficaz de la α -glucosidasa con un valor de actividad inhibidora de 0,22 mg/ml y una actividad inhibidora eficaz para α -amilasa con valores de 0,43 mg/ml, lo que indica según los

autores un beneficio para la salud, por la función potencial para suprimir el aumento del nivel de glucosa postprandial a partir de almidón (Murthy et al., 2012).

La pulpa de café en fresco es fuente de antocianinas de allí que puede encontrar una oportunidad como colorante e ingrediente bioactivo para alimentos formulados (Murthy & Naidu, 2012).

Carotenoides

En la Conferencia Internacional en Ciencias del Café, ASIC Costa Rica, 2012, se realizó la presentación de la conferencia: Identificación de compuestos fenólicos y carotenoides en pulpa de café (*Coffea arabica*), exfoliaciones y mucílago por HPLC con la fase de ionización por electrospray acoplado a espectrometría de masas, en donde se reportó que los carotenoides típicos: violaxantina, neoxantina, luteína, β -caroteno, α -caroteno y diversos ésteres de luteína fueron identificados en la pulpa de café. La luteína mostró mayores contenidos, con diferencias entre las variedades, estudiadas (Viñas et al., 2012).

El mismo autor reporta además que la mayoría de los polifenoles detectados eran ácidos clorogénicos (CGA), y que se encontraron en las variedades de café y la pulpa analizadas concentraciones importantes de cafeoil-quinicos especialmente del isómero ácido 5-cafeoil-quinico (5-CQA), el cual fue mayor en la pulpa que en otros subproductos; mientras que las concentraciones de otros ácidos feruloil-quinico y p-cumaroil-quinico eran menores.

Otros compuestos fenólicos, tales como epicatequina, ácido vanílico y proantocianidina B, se encontraron también en la pulpa; reportan igualmente estos autores haber identificado los carotenoides accesorios típicos de los cloroplastos, como violaxantina, neoxantina, luteína, β -caroteno, α -caroteno y diversos ésteres de luteína (Viñas et al., 2012).

Antioxidantes

El metabolismo de las plantas se divide en primaria y secundaria. Las sustancias que son comunes a los seres vivos y que es esencial para el mantenimiento de células (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) se originan a partir del metabolismo primario; los compuestos fenólicos se constituyen en uno de los grupos más importantes y ampliamente distribuidos y corresponden a los metabolitos secundarios de las plantas. (Lourdes & Giada, 2013). A continuación se consignan algunas investigaciones realizadas:

Cronológicamente el primer estudio sobre la composición de los polifenoles presentes en la pulpa de café, a través de técnicas analíticas de gran robustez (HPLC) para una mayor precisión en la cuantificación de estos compuestos, fue realizado en el año 1988.

En la Tabla 7 se muestran los valores promedios de los compuestos fenólicos identificados en pulpa de café fresca. Los materiales fueron tratados para la extracción de componentes con acetato de etilo (fracción A) y con acetato de etilo más metanol (fracción B) por (Ramirez Martinez, 1988).

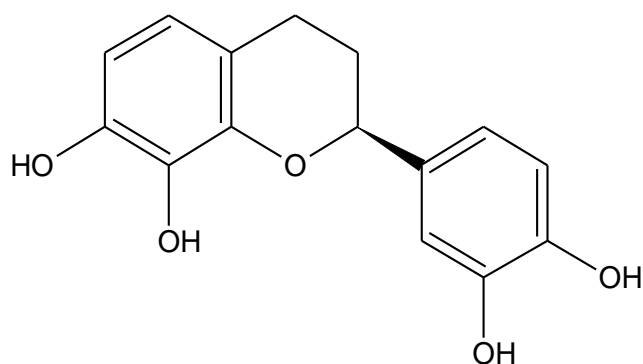
Tabla 7 Concentración de compuestos fenólicos de pulpa de café en base seca.

Compuesto	Fracción A (%)	Fracción B (%)
Ácido Protocatequina	0,8	3,8
Catequina	3,0	-
Ácido Clorogénico	25,2	86,5
Epicatequina	29,8	-
Ácido Ferúlico	0,5	2,1
Ácido Isoclorogénico I	7,8	-
Ácido Isoclorogénico II	26,8	-
Ácido Isoclorogénico III	6,1	-
Rutin	-	7,7

Fuente: (Ramirez Martinez, 1988)

La composición promedio encontrada por Ramírez de los componentes fenólicos de dos fracciones combinadas fue: ácido clorogénico (ácido 5-caffeoil quínico), 42,2 %; epicatequina, 21,6 %; ácido isoclorogénico I, 5,7 %, ácido isoclorogénico II, 19,3 %; ácido isoclorogénico III, 4,4 %; catequina, 2,2 %; rutina, 2,1 %; ácido protocatequina, 1,6 % y ácido ferúlico, 1,0 %. Este autor establece además que si se suma la epicatequina a los ácidos clorogénicos y a los ácidos isoclorogénicos el porcentaje sería del 92,0 % (Fracción A) y 98,4 % (fracción B) de los componentes fenólicos identificados, es decir el mayor porcentaje de ácidos fenólicos se encuentran con la suma de estos tres ácidos (Ramírez Martínez, 1988). Más tarde, Clifford y Ramírez citados por (Esquivel & Jiménez, 2012) han identificado el ácido 5-feruloil-quínico en la pulpa de café y (Ramírez Coronel et al., 2004) encontraron cuatro clases principales de polifenoles a saber: flavanonas, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y antocianinas y los taninos condensados (proantocianidinas) que son también componentes importantes de la pulpa de café.

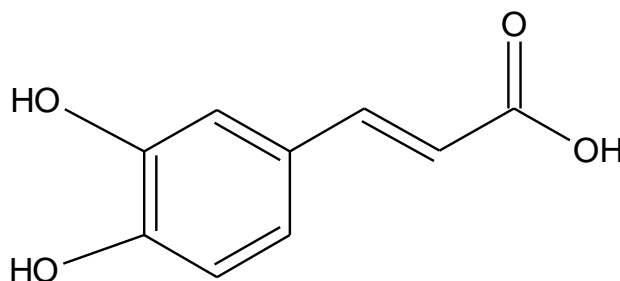
Ilustración 9 Formula estructural de la Catequina



La pulpa de café contiene también antioxidantes naturales como ácidos hidroxicinámicos, ver ilustración 10, la mayoría de los cuales están unidos covalentemente a la pared celular. Estos

compuestos pueden ser liberados por la fermentación o por procesos enzimáticos. En un estudio, realizado en el año de 2010 han sido evaluadas las propiedades antioxidantes de pulpa de café fermentada y no fermentada (en fresco). La pulpa del café que se fermentó fue en estado sólido usando el hongo *Aspergillus Tamaritii*. Las muestras fermentadas y no fermentadas de pulpa de café se extrajeron con metanol acuoso seguida de hidrólisis alcalina. En ambos casos, la concentración de polifenoles totales se cuantificó por el método Folin- Ciocalteu, a continuación, los ácidos hidroxicinámicos se concentraron usando acetato de etilo y se cuantificaron por HPLC. Las propiedades antioxidantes de las muestras se determinaron por el método de monocatión radical 2,2'-azinobis- 3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) [ABTS], teniendo en cuenta los parámetros cinéticos conocidos como ED₅₀, t ED₅₀ y la eficiencia antirradical (AE).

Ilustración 10 Formula estructural de un ácido hidroxicinámico (ácido cafeico)



Los resultados reportados mostraron que los extractos fermentados que contienen ácidos hidroxicinámicos libres mostraron una mejor actividad antirradical contra [ABTS] que los otros no fermentados. De otra parte los autores no hallaron diferencias significativas en el contenido total de polifenoles en la pulpa de café fermentada (322.4 ± 30.1) (g/kg) y no fermentada (335 ± 15) (g/kg), pero el contenido de ácidos hidroxicinámicos totales fue mayor en los extractos

de pulpa de café no fermentada (47,1 g/kg) que en la pulpa de café fermentada (30,9 g/kg). Sin embargo, el proceso de fermentación aumentó la fracción de ácidos hidroxicinámicos libres en un (47 %) y, en consecuencia la disminución de los ácidos unidos covalentemente a la pared celular. Indican los autores que los resultados de la actividad antioxidante se podrían explicar por la presencia de ácidos hidroxicinámicos libres, además se estableció que los ensayos en la pulpa de café fermentada mostraron que los ácidos hidroxicinámicos libres se metabolizan por el hongo *Aspergillus Tamaritii* por (Arellano Gonzalez, Ramírez Goronel, Torres Mancera, Pérez Morales, & Saucedo Castañeda, 2011).

Los autores determinaron por medio de HPLC el contenido para cada uno de los ácidos hidroxicinámicos, utilizando diferentes formas de extracción (metanol acuoso y acetato de etilo) para cada tipo de ensayo (pulpa fermentada y no fermentada), los resultados mostraron un mayor valor de ácido cafeico y de ácido clorógeno para ambos tratamientos, tanto para pulpa fermentada como no fermentada, como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8 Análisis de ácidos hidroxicinámicos por HPLC.

Extracto	Ácido p-cumárico (w/mg/Kg)	Ácido ferúlico (w/mg/Kg)	Ácido cafeico (w/mg/Kg)	Ácido clorógeno (w/mg/Kg)
Pulpa de café no fermentada				
Metanol acuoso	4±0,02	1,5±1,4	100±0,27	140±0,7
Acetato de etilo	3,3±0,3	7,5±4,1	10±7,1	560±1,7
Pulpa de café Fermentada				
Metanol acuoso	4,4±0,003	1,5±0,2	8±0,003	5±4,7
Acetato de etilo	1±0,6	2,5±1	2,4±0,02	15±1,5

Fuente: (Arellano Gonzalez et al., 2011).

Otros estudios enfocados en este mismo sentido se han realizado en México con pulpa proveniente de varias fincas y se ha utilizado el hongo *Aspergillus Tamaritii* para producir feruloíl estereosas. La extracción de los compuestos bioactivos para su análisis ha sido muy similar al estudio anterior con metanol acuoso a diferentes concentraciones y a diferentes temperaturas, en la Tabla 9 se muestran los resultados reportados por (Pérez Morales et al., 2011).

Tabla 9 Contenido ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café seca

Extracto	Ácido p-cumárico (w/mg/Kg)	Ácido ferúlico (w/mg/Kg)	Ácido cafeico (w/mg/Kg)	Ácido clorógeno (w/mg/Kg)
Metanol acuoso (80%)	3,6±0,4	3,4±0,17	9±0,6	84,1±4,7

Fuente: (Pérez Morales et al., 2011)

En el año 2011 se realizó otro estudio de los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, cumárico y ácido clorógeno) de la pulpa de café extraídos de manera enzimática por la cepa *Rhizomucor pusillus*. Los autores del estudio reportan un contenido total (unido covalentemente y libres) de ácidos ferúlico, cafeico, p- cumárico y ácidos clorogénicos de 5276 mg por kg de pulpa de café. La composición fue la siguiente del 100% de compuestos fenólicos: Ácidos clorogénicos 58.7 %, ácido cafeico 37.6 %, ácido ferúlico 2,1 %, y ácido p-cumárico 1.5 %, por (Torres Mancera, Cordova López, & Rodríguez Serrano, 2011).

Reportan además los autores que la mayor parte de los ácidos hidroxicinámicos se unen covalentemente a la pared celular así: ácido p- cumárico 97.2 %, el ácido cafeico 94.4 %, el ácido clorógeno y ácido ferúlico 76.9 % y 73.4 % respectivamente. Un aspecto importante

reportado en este estudio fue el rendimiento obtenido para la extracción de los ácidos hidroxicinámicos, el cual se obtuvo mezclando el extracto producido de la pulpa de café por la enzima a través de un inductor (aceite de oliva) y una pectinasa comercial (*Rhizomucor pusillus*). Los reportes indican que los rendimientos fueron: ácido clorogénico 54,4 %, ácido ferúlico 19.8 %, ácido p-cumárico 7.2 % y ácido cafeico 2,3 %.

Concluyen los autores de este estudio que el uso de enzimas comerciales contribuye a la liberación de los antioxidantes presentes en la pulpa de café, principalmente ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácidos clorogénicos, bajo fermentación en estado sólido.

En otras investigaciones se han empleado diferentes solventes orgánicos a los utilizados en los anteriores estudios. En la Tabla 10 se observan los resultados obtenidos por HPLC para el contenido de ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café liofilizada de la variedad *Arábica*, proveniente de Veracruz México y los solventes empleados, (Ramírez Coronel et al., 2007).

Tabla 10 Ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café

Compuesto	SH: sin hexano H:Hexano	Agua (mg/100 g pulpa)	Metanol (mg/100 g pulpa)	Acetona (mg/100 g pulpa)
Pulpa de café seca				
Ácido clorogénico (w/mg/Kg)	SH	26,2±2,9	390,7±9,6	410,7±41,7
	H	23,4±8,7	505,6±80,3	58,20±44,7
Ácido cafeico (w/mg/Kg)	SH	-	-	-
	H	-	8,97±2,3	-
Ácido p-cumárico (w/mg/Kg)	SH	-	6,9±0	-
	H	-	1,1±0	3,22±0,6
Ácido ferúlico (w/mg/Kg)	SH	-	5,5±1	6,7±3,9
	H	-	25,7±15,7	2,2±1,2

Fuente: (Ramírez Coronel et al., 2007).

El compuesto encontrado en mayor proporción fue el ácido clorogénico; el ácido cafeico, ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico fue el de menor concentración.

Los investigadores (Pérez M., Ramírez C., Guzmán .L, Cruz S., & Saucedo C., 2007), presentaron en un congreso nacional de biotecnología y bioingeniería en la ciudad de México D.F. los resultados obtenidos para el contenido de ácidos hidroxicinámicos en pulpa de café fresca y secada al sol y han obtenido 37.9 y 32.6 g/Kg de compuestos fenólicos, respectivamente, de los cuales el 52.7 % y 49 % representan ácidos hidroxicinámicos. Los valores correspondientes a los ácidos hidroxicinámicos libres de la pulpa de café fue de 77.1 mg/kg de ácido clorogénico, 9.08 mg/kg de ácido caféico, 3.10 mg/kg de ácido *p*-cumárico y 2.74 mg/kg de ácido ferúlico.

Los taninos, que también son compuestos fenólicos en la pulpa de café, han recibido una atención especial porque se consideran como antinutrientes para rumiantes, los reportes de taninos solubles son de un 0,8 % -2,8 % de la pulpa de *Coffea arabica* y *Coffea canephora* respectivamente (Ulloa Rojas, Verreth, Amato, & Huisman, 2003). En este sentido los taninos prodefinidinas y las procianidinas son mayores en *Coffea canephora* según lo ha reportado (Farah & Donangelo, 2006).

En los países cafeteros de Centroamérica desde hace bastantes años se ha estudiado la pulpa de café como fuente alimenticia para animales; la presencia de residuos de compuestos tales como: polifenoles, taninos, ácidos clorogénicos y cafeína impide su utilización como forraje doméstico, de allí su interés. En un estudio reciente (2008) con el fin de mejorar su valor nutricional se han empleado tres cepas de *Streptomyces* en la fermentación en estado sólido (SSF) y han realizado los análisis por Py-GC/MS. En esta investigación se muestra como a

través de este tratamiento lograron degradar los componentes bioactivos de la pulpa para hacerla disponible como fuente alimenticia animal, los resultados obtenidos mostraron el contenido de polifenoles totales para el control de 45,6 % el cual se redujo por el tratamiento en promedio hasta un 35,6 %. Un período de degradación bacteriana de 21 días parece aceptable para mejorar el valor nutritivo de la composición química de la pulpa de café para animales monogástricos, especialmente debido a que la pulpa tratada tenía el mayor contenido de proteínas y el de celulosa, los fenoles totales y taninos como se indicó se redujeron en este período según lo ha reportado (Orozco et al., 2008) y (Ulloa Rojas et al., 2002).

Con el objetivo de realizar una comparación y establecer la importancia de los antioxidantes en la pulpa de café, a continuación se consignan algunas investigaciones relacionadas con la identificación de antioxidantes en plantas, alimentos y en otros componentes del café (fruto, café tostado etc), mostrando los resultados más relevantes.

En este sentido en Cenicafé con el objetivo de conocer la composición química del fruto de café, determinaron los ácidos clorogénicos totales (CGTA) por espectrometría, y los ácidos clorogénicos individuales y sus ésteres, mediante cromatografía (HPLC), las muestras provenían del café *Coffea arabica* de diferentes variedades (Colombia, Caturra, Típica, Borbón y Robusta). Los resultados obtenidos mostraron que el café maduro contenía 6,23 % de CGTA de la variedad Arábica y la Robusta fue de 8,88 % hubo diferencia significativa entre variedades mas no la hubo entre granos de la misma variedad. En el estudio se cuantificaron los principales ácidos: 3-CQA; 4-CQA; 5-CQA; 3,4-di-CQA y 4,5-di-CQA; 3,5-di-CQA y el 4y5-FQA; el ácido cafeico y los ácidos orto y para cumáricos; cinámico. Los resultados mostraron que en la variedad de café arábica los ácidos cafeoil-quinicos (CQA) representan el 95 % de los CGTA, los di-CQA

del 2,1 al 2,7 % y los FQA del 0,83 al 1,64 %, descritos por (Marín García & Puerta Quintero, 2008).

En el año 2012 se identificaron los compuestos fenólicos individuales utilizando cromatografía líquida de alta resolución HPLC para los diferentes subproductos de café: pulpa, lámina plateada, entre otros, extraídos con una mezcla de disolventes de isopropanol y agua. Los reportes para la pulpa de café sobre la evaluación mostraron un contenido total de polifenoles de alrededor de 1 % -1,5 %. Sometidas las muestras a tratamiento con enzima en comparación con el control y el tratado con vapor, el rendimiento de los compuestos bioactivos fue significativo en el caso de la pulpa de café para los ácidos clorogénicos (CGA) se encontró: la muestra no tratada ($10,7 \pm 0,8$), tratada con vapor de agua ($11,8 \pm 0,9$) y tratada con enzima ($12,8 \pm 0,6$) con rendimientos de 15,8, 16,2 y 18, 1 % respectivamente. Se evaluó igualmente la actividad antioxidante y en pulpa el reporte es de 1.53 ± 0.6 (mmol de trolox/100 g de peso seco) (Adebowale, Ogunjobi, Olubamiwa, & Omidiran, 2012).

En el año 2004 se realizó una investigación que abarcó todos los análisis y cuantificación de compuestos bioactivos en pulpa de café. La investigación sobre la cuantificación de estos componentes se realizó por HPLC y para proantocianidinas oligoméricas se obtuvo por láser asistida por matriz de ionización desorción en espectrometría de masas con tiempo de vuelo (MALDI - TOF MS). Los resultados se consignan en la Tabla 11, (Ramirez Coronel et al., 2004).

Tabla 11 Cuantificación por HPLC (a) de los compuestos fenólicos presentes en pulpa

Componentes	Fresco (g/kg materia seca)	Pulpa de 3 días (g/kg materia seca)
Flavan- 3 -oles		
Monómeros	$2,0 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,07$

Componentes	Fresco (g/kg materia seca)	Pulpa de 3 días (g/kg materia seca)
Proantocianidinas	20,1±0,7	15,0±0,4
Ácidos hidroxicinámicos		
Ácido cafeoil-quinico	11,8±0,01	12,8±0,3
Derivados del ácido cafeoil-quinico	2,4±0,8	3,1±0,1
Ácido p cumaroil-quinico	0,6±0,0	0,08±0
Flavonoles	0,6±0,02	0,5±0,05
Antocianidinas	0,4±0,22	0,5±0,2
Total	37,9±1,0	32,6±1,2

Fuente: (Ramirez Coronel et al., 2004)

Concluyen los autores que los flavonoles y las antocianinas pueden ser considerados como clases de menor importancia en la pulpa de café, ya que representan 1,6 % y 1,1 %, respectivamente, de la concentración total de polifenoles.

Recapitulando se puede afirmar que en la pulpa de café la mayoría de los polifenoles detectados son ácidos clorogénicos (CGA), tales como el ácido isomérico cafeoil-quinico (CQA), ácidos feruloil-quinico (FQA), y los ácidos p – cumaroil-quinico (PQA), ácidos que también se encuentran en el grano de café según (Marín García & Puerta Quintero, 2008).

Fibra

Las fibras dietéticas han sido objeto de numerosos estudios debido a las propiedades que sobre la salud se han logrado establecer, en el caso de ser fibra insoluble el efecto beneficioso se relaciona con un incremento del bolo fecal y al estimular el tránsito intestinal. (Anabella et al., 2009), de otra parte si la fibra es soluble los efectos benéficos se relacionan con un incremento en el volumen y consistencia del bolo fecal, lo que es beneficioso para la prevención de enfermedades diarreicas; por otra parte la fibra soluble actúa de manera beneficiosa sobre

diferentes metabolismos, tal es el caso del metabolismo del azúcar y el colesterol. (Anabella et al., 2009).

Para estudiar las posibilidades que sobre la salud tiene la fibra soluble e insoluble, (Anabella et al., 2009) realizaron una investigación sobre estos componentes en la pulpa de café encontrando que por análisis proximal de la pulpa, la fibra se ubica en el rango de 19,97 a 28,70 %, ver Tabla 12.

Tabla 12 Composición proximal pulpa de café

Análisis	Porcentaje
Humedad	3,86 ± 0,82
Material seco	96,14 ± 0,82
Proteína	12,32 ± 0,23
Grasa	4,11 ± 0,07
Cenizas	7,28 ± 0,11
Fibra cruda	21,81 ± 0,74

Fuente: (Anabella et al., 2009)

Luego los autores emplearon varios tratamientos: fermentación, metanol puro, metanol con metabisulfito de sodio al 2 %, agua con metabisulfito, sal (5g,10g,14g) y azúcar (5g,10g,14g), logrando concentrar la fibra desde un 28,76 % hasta un 34,76 %. En la Tabla 13 se muestran los reportes para el residuo neutro detergente (fibra) para los diferentes tratamientos utilizados.

Tabla 13 Fraccionamiento de la pared celular de pulpa de café

Tratamiento	Residuo Neutro Detergente
Control	40,45±0,79a
Fermentación	43,91±1,04a
Metanol	60,27±2,25b
Metanol con metabisulfito al 2%	60,35±1,09b
Agua con metabisulfito	62,63±1,36b
Sal 5g	49,47±0,32c
Sal 10g	53,75±1,46c
Sal 15g	50,54±1,22c
Azúcar 5g	33,02±0,30d
Azúcar 10g	32,99±0,64d
Azúcar 15g	31,03±1,37d

Fuente: (Anabella et al., 2009).

Las propiedades fisicoquímicas reportadas para la fibra fueron: capacidad de retención de agua (CRA) 10,44 g agua/g muestra; capacidad de absorción de agua (CAA) 10,12 g agua/g muestra; capacidad de intercambio catiónico (CIC) 0,89 miliequivalentes H⁺/g y capacidad de absorción de moléculas orgánicas 2,22 g aceite/ g muestra, (Anabella et al., 2009).

De otra parte (Adebowale et al., 2012) han reportado para fibra en pulpa soluble e insoluble los valores que oscilan entre 16-35 % y 18-64 %, respectivamente.

Investigación aplicada de pulpa de café

La mayoría de estudios sobre pulpa de café se han concentrado en la identificación, análisis y cuantificación de sus componentes bioactivos, pocos se ubican en lo que se llama investigación aplicada. El siguiente estudio realizado en el año 2012 clasifica en esta categoría; la investigación consistió en analizar los efectos que sobre pescado ahumado tiene el humo

proveniente de pulpa de café comparado con el humo de cocina y el de leña, en el control de la rancidez (oxidación lipídica) y el crecimiento microbiano.

Reportan los autores que después del tratamiento se encontró que a partir de las dos semanas se observó un efecto antioxidante y pronunciado de la pulpa de café sobre el pescado ahumado, un retardo en el crecimiento de moho, además de poseer un efecto beneficioso en el sabor (Adebowale et al., 2012).

Los efectos antioxidantes y antimicrobianos del humo de la pulpa de café se demostraron en su prolongación del período antes de la aparición de rancidez en el pescado. Así pues, esto da mayor credibilidad a los hallazgos anteriores de Pellegrini et al. (2003) y Vinson et al. (2005) citados por (Adebowale et al., 2012), que la baya de café contiene sustancias químicas como la cafeína, cafestol, kahweol y ácidos clorogénicos que son antioxidantes de la naturaleza.

La adición de pulpa de café a la fuente de humo retrasó significativamente la oxidación de los lípidos en comparación con el control (humo de cocina), de un valor del control de $3,21 \pm 0,0$ % hasta $0,66 \pm 0,25$ % con humo de pulpa. Respecto la actividad antioxidante la media inicial de trimetilamina (TMA), ácido Tiobarbiturico (TBA) y el valor de peróxido (POV) fueron 1,86, 0,16 y 8,32 % respectivamente. Los valores de TBA y PVO fueron ligeramente superiores que los obtenidos por Kh. Me salam et al. (2004). Sin embargo después de 21 días de almacenamiento, los valores medios de TMA, TBA y POV fueron 4,12 %, 0,21 % y 5,12 % respectivamente, en la muestra de pasta de pescado ahumado, inferiores a los del control. (Adebowale et al., 2012).

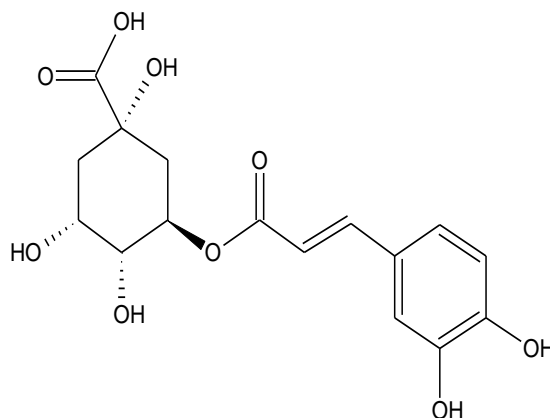
Salud

Muchas de las últimas investigaciones sobre los ácidos clorogénicos se han enfocado en buscar o asociar su biodisponibilidad, su forma de absorción y su metabolismo en los seres humanos, y también en conocer los efectos en la salud de los consumidores de café. Aunque hay controversia sobre las consecuencias para la salud humana por el consumo de productos que contienen estos ácidos, en varias publicaciones se les atribuyen efectos antioxidantes y anticancerígenos a varios de los ácidos clorogénicos (Marín García & Puerta Quintero, 2008), enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y cáncer (Goleniowski, Bonfill, & Cusido, 2013), cuando es consumido en frutas y verduras.

El ácido clorogénico ácido 3-cafeoil-quinico es un éster entre el ácido quinico y el ácido cafeico y es uno de los componentes polifenólicos mayoritarios presentes en frutas y vegetales. También se encuentra mayoritariamente en las semillas de café, en las hojas de tabaco, y se ha reportado también en pulpa de café. Ver ilustración 9.

Al igual que otros polifenoles dietarios los ácidos clorogénicos presentan propiedades antioxidantes y también presentan actividad anticancerígena, antialérgica, entre otras. Los estudios *in vitro* sugieren que este compuesto elimina radicales generados en fase acuosa, aumenta la resistencia de las LDL a la peroxidación lipídica e inhibe el daño al ADN (Naso et al., 2011).

Ilustración 9 Fórmula estructural ácido cafeico



Para finalizar, en los últimos años se han incrementado los estudios para comprender los efectos nocivos de los radicales libres, sobre todo en el cerebro, de allí que se ha motivado a los investigadores en buscar mejores antioxidantes para proporcionar al cerebro una mejor protección y así evitar enfermedades, especialmente las relacionadas con el deterioro cognitivo y con el Alzheimer (Kristin Loberg, 2014).

En este sentido el autor anterior, señala que hoy en día los estudios se han enfocado en conocer la bioquímica humana en relación a la producción de antioxidantes, en vez de enfocarse en el estudio de fuentes externas de antioxidantes; es así como se ha llegado a conocer que las células tienen la capacidad innata de generar enzimas antioxidantes a petición y se ha llegado a comprender que un elevado nivel de radicales libres activan una proteína específica llamada Nrf2, la cual en esencia lo que hace es producir millones de los antioxidantes más importantes del cuerpo humano, para defenderse de la elevada producción de radicales libres en el cuerpo por factores diversos.

La clave en la actualidad es comprender que otra sustancia aparte de los radicales libres activa la proteína Nrf2 para activar genes que produzcan poderosos antioxidantes. En este sentido se ha logrado establecer que la cúrcuma, el extracto de té, la silimarina, el DHA, el brócoli entre muchos otros son los que impulsan la producción de las reacciones de antioxidantes, capaces de poner en marcha en el cuerpo la producción innata de antioxidantes claves. Otra sustancia y de la cual se conoce su poder activador de esta proteína es el café, bebida ampliamente consumida a nivel mundial. Algunos estudios importantes realizados en este sentido son los realizados por (Paur, Balstad, & Blomhoff, 2010) y (Boettler et al., 2011), quienes han investigado los extractos de café (CES) de diferentes procedencias y componentes y su impacto positivo en la activación de la Nrf2 / ruta ARE en células de carcinoma de colon humano (HT29).

Tecnología del ultrasonido

La extracción con disolventes, es la técnica de separación de compuestos más utilizada no solo en los laboratorios de química sino también en las diversas industrias. La técnica consiste en que a partir de una matriz sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla, separarlos con un disolvente adecuado; tradicionalmente, la extracción de estos compuestos de interés se ha realizado mediante técnicas convencionales donde se emplean solventes como: agua, metanol, etanol, acetato de etilo, entre otros; obteniendo un bajo rendimiento del proceso.

Dentro de las técnicas no convencionales de extracción se pueden mencionar además del uso de los solventes antes mencionados, algunas bases (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio etc) y la utilización de ácidos (ácido clorhídrico por ejemplo) los cuales logran una mejor extracción de compuestos (Fernández 2015). Dentro de las llamadas técnicas no convencionales también se encuentran las tecnologías de fluidos supercríticos (gas carbónico, agua entre otros), extracción asistida con microondas y extracción asistida con ultrasonido, las cuales buscan mejorar el rendimiento en la extracción de los compuestos de interés.

En la actualidad la industria de alimentos ha incorporado con bastante éxito estas tecnologías, llamadas emergentes, combinadas con tecnologías convencionales o en aplicaciones específicas relacionadas con el procesamiento, conservación y extracción de componentes de los alimentos. Una de estas tecnologías es la del ultrasonido que de aplicaciones en el área de la salud utilizado en sistemas de diagnóstico como doppler, ecografías, ecocardiografías y también en sesiones terapéuticas, que aprovechan las vibraciones mecánicas y el efecto térmico producido, paso a emplearse con bastante éxito y de manera eficiente en la industria de los alimentos, la razón de su éxito en este campo específico se debe a su efectividad en procesos tales como la congelación, el secado, el revenido, el blanqueado, la esterilización, y la extracción de compuestos de interés, (Chemat, Zill-E-Huma, & Khan, 2011, 1).

Algunas de las ventajas que obtienen al utilizar el ultrasonido en los procesos de alimentos son: un mezclado más eficaz y micro-mezcla, la energía es más rápida en la transferencia de masa, se reducen los gradientes térmicos y de concentración, hay reducción en la temperatura, la extracción es selectiva, la reducción de equipos es significativa, se tiene una respuesta más rápida al control del proceso de la extracción de compuestos en general, es más

rápida la puesta en marcha, se aumenta la producción, hay eliminación de etapas de proceso, y se aumenta la eficiencia y eficacia en los procesos alimentarios; buena parte de estas ventajas del ultrasonido se deben al aprovechamiento de una de sus principales propiedades conocida con el nombre de cavitación, de allí la mejora sustancial en la transferencia de masa (Chemat et al., 2011, 2).

Aspectos teóricos del ultrasonido

A continuación se presentan algunos aspectos teóricos generales acerca de los principios que aplican a esta nueva tecnología; aspectos acerca de las formulaciones matemáticas que gobiernan esta tecnología no serán tratadas aquí debido a su alta complejidad.

Por definición el ultrasonido es un tipo especial de vibración de onda de sonido con frecuencia más allá de la audición humana (20000 Hz), es decir, a **más de 20 KHz.**, y de acuerdo al centro de sonoquímica de la Universidad de Coventry en el Reino Unido el ultrasonido puede ser dividido en dos tipos: ultrasonido de señal y de potencia (Azuola & Vargas, 2007).

Ultrasonido de señal: en el ultrasonido de señal el rango de frecuencia de las ondas se sitúa en el rango de 100 Khz hasta 1 Mhz, conocido también como ultrasonido de baja frecuencia; esta señal es afectada por los elementos que entran en contacto con ella, permitiendo de esta manera obtener información acerca del producto, principalmente en el estudio de sus propiedades reológicas (Azuola & Vargas, 2007).

Ultrasonido de potencia: en el ultrasonido de potencia el rango de frecuencia de las ondas se sitúa desde 18 Khz hasta 100 Khz, conocido también como ultrasonido de alta frecuencia; al haber una frecuencia más baja y una potencia más alta se logran producir cambios

fisicoquímicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación (fenómeno donde las ondas de sonido que pasan a través de un medio (solvente) generan procesos de compresión y de expansión), significa que la producción, el crecimiento y el colapso de burbujas es debido a una gran cantidad de energía que se puede producir a partir de la conversión de energía cinética de movimiento esto ocurre asimétricamente en las interfaces y golpes sobre la superficie sólida. Para lograr el efecto antes mencionado se requiere de un medio líquido (agua, u otro), un generador de energía y un transductor, el cual convierte la energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica (Azuola & Vargas, 2007).

Los factores que afectan el fenómeno de cavitación del ultrasonido son: las propiedades físicas del solvente empleado, la temperatura, la frecuencia, la potencia del ultrasonido, la presión hidrostática, la tensión superficial y la potencia de irradiación. Otras propiedades de los materiales orgánicos como el contenido de humedad, el grado de molienda, el tamaño de partículas y el tipo de disolvente son factores también muy importantes que influyen y se deben tener presente para tener una extracción eficiente y de calidad por medio de esta tecnología (Azuola & Vargas, 2007).

Normalmente el soluto de interés se encuentra dentro de la célula, en la pared celular, en el citoplasma y/o los orgánulos, lograr su extracción de manera convencional con solventes no es fácil y la eficiencia es mucho menor, sin embargo con la utilización del ultrasonido se superan estas dificultades debido a la acción del ultrasonido que abre poros en la pared celular y porque disminuye el tamaño de los solutos, este mecanismo de extracción asistida por ultrasonidos implica dos principales tipos de fenómenos físicos, a saber: (a) difusión a través de la pared celular y (b) lavado del contenido de la célula después de romper las paredes. En la industria de

los alimentos se realizan las extracciones sobre materiales bien sean líquidos o sólidos las cuales vibran por la acción de la onda ultrasónica, como resultado se logra que el soluto de interés, pase de la fase sólida al solvente, de esta manera se favorece entonces la difusión del soluto hacia el solvente al existir una mayor área de contacto y porque se favorecen los gradientes de transferencia de masa por los fenómenos de cavitación ultrasónica (Azuola & Vargas, 2007).

Extracción asistida con ultrasonido de componentes orgánicos de interés

En este ítem también de forma general se realizara un retrato de algunas investigaciones acerca de esta tecnología, en especial las relacionadas con la extracción de compuestos bioactivos (antioxidantes, principalmente fenoles) también objeto de la presente investigación, las cuales han considerado los autores se deben mencionar en este ítem.

El autor (González Centeno et al., 2014) acerca de la extracción asistida por ultrasonido acuoso (EAU) de orujo de uva ha investigado por metodología superficie de respuesta (RSM) el efecto de la frecuencia acústica (40, 80, 120 kHz), la potencia ultrasónica (50, 100, 150 W / L) y el tiempo de extracción (5, 15, 25 min) en fenoles totales, flavonoles totales y la capacidad antioxidante. El autor mencionado encontró que todas las variables del proceso mostraron un efecto significativo sobre la EAU acuosa de orujo de uva, encontrando la mejor condición de extracción a 40 kHz, una densidad de potencia de 150 W / L y 25 min de la extracción. En otra investigación también por superficie de respuesta sobre la extracción de los compuestos fenólicos del rizoma *sparganii*, realizada por (Wang et al., 2013) Se estudió la concentración de etanol (%), el tiempo de extracción (MIN) y la proporción de disolvente al material (mL/g).

Los resultados mostraron que la condición óptima EAU se obtuvo con una concentración de etanol de 75,3%, un tiempo de extracción de 40 min y una proporción de disolvente a material de 19,21 ml / g de fenoles totales, y una mezcla de etanol de concentración de 80%, en un tiempo de extracción de 33,54 min y el disolvente al material en proporción de 22,72 ml/g para la combinación de q-hidroxibenzaldehído, ácido q cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico, rutina y kaempferol.

Son muchas las investigaciones actuales que se adelantan sobre la aplicación de la tecnología del ultrasonido en la extracción de compuestos fenólicos difíciles de consignar en su totalidad en este ítem, a manera de referencia se han mencionado las dos anteriores con el propósito de mostrar que los estudios de investigación que se adelantan tienen centrado su interés en conocer cuáles son las condiciones óptimas de extracción con el ultrasonido, de allí que se enfocan en estudiar sus principales variables como son: temperatura, frecuencia, potencia, y tiempo en lo que aplica directamente con el uso de esta tecnología para obtener el máximo rendimiento de extracción, (Azuola & Vargas, 2007), (Ashokkumar, 2014), (Chemat et al., 2011), (Luengo, Condón Abanto, Álvarez, & Raso, 2014); sin embargo existen también muchos estudios que se centran no solo en las variables anteriores, sino en otros factores claves como por ejemplo el tipo de solvente y sus amplias posibilidades bien sean en combinación con las variables antes mencionadas o solos, (Nojavan, Gorji, & Hossiny Davarani, Saied Saeed Morteza Najarian, 2014); la granulometría de los materiales también es un factor importante de estudio.

Sumado a lo anterior son destacables las miles de investigaciones que se apoyan en estudios anteriores y centran su actividad investigativa en la identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos presentes en diferentes materiales mediante técnicas

modernas de cromatografía como HPLC acoplada a una amplia gama de detectores, a modo de ejemplo para pulpa de café (Ramirez Martinez, 1988). Finalmente cabe mencionar que a la fecha no se logró identificar algún estudio de investigación en relación a la aplicación de esta tecnología en la extracción de compuestos de interés contenidos en la pulpa de café, de allí que la presente investigación cobra importancia.

Origen y tratamiento de la muestra

De aquí en adelante se ha estructurado para cada objetivo específico un capítulo independiente en el cual se incluye: presentación, equipos, metodología, resultados, discusión y conclusiones respectivas. Para no ser repetitivo en cuanto a localización, origen y tratamiento de la muestra. A continuación se explica por única vez este procedimiento y se entiende que es igual para cada capítulo.

La materia prima empleada fue pulpa de café de la especie (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, la cual se adquirió en fincas del Suroeste antioqueño a 1700 msnm aproximadamente, los árboles de café tenían en promedio 10 años; al material de estudio (pulpa de café) se le controló el proceso de cosecha con el objetivo de obtener solo cerezas maduras, descartando de la muestra: cerezas verdes, pintonas, sobremaduras y/o secas, se le retiró el exceso de residuos (madera, piedras, otros materiales vegetales, etc.) además el mucilago adherido a la pulpa se retiró mediante un lavado con agua potable hasta completar de cada finca 2 Kg de pulpa de café. El secado se realizó en un secador de bandejas, a una temperatura de 50°C con una velocidad de aire de 2 m/s durante 12 horas con el fin de llevar la materia prima a una humedad del 10 a 12 %H (base húmeda).

La molienda se realizó en un molino de discos y se seleccionó el tamaño de partícula retenido sobre malla No. 30 (0,59 mm) que según (Guevara Barreto, 2005) corresponde a una molienda media; los análisis correspondientes para cada objetivo específico se realizaron en los laboratorios de química y ambiental de la Corporación Universitaria Lasallista.

Análisis y modelamiento granulométrico de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo

El análisis de las propiedades físicas de la pulpa de café es de gran importancia para sus diversas operaciones unitarias de: transporte, manejo y almacenamiento; especialmente para aquellas actividades que están relacionadas con el manejo y análisis de sus compuestos bioactivos en el laboratorio a causa de sus propiedades de cohesión y segregación; es así como entre mayor sea el tamaño de partícula menor es el área de contacto entre el solvente y la pulpa de café y la extracción podría ser subextraída; de otra parte, si el lecho de partículas es demasiado fino, se puede realizar una sobreextracción o presentarse los fenómenos de formación de grumos lo que dificultaría su análisis posterior y/o manejo. Se deduce por lo afirmado anteriormente que el tamaño de partículas tiene una marcada influencia en los procesos de extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa de café, los cuales se favorecen o no en función del tamaño de partícula y de su forma (Guevara Barreto, 2005).

Para el caso de pulpa de café no existe una norma técnica en Colombia sobre los procedimientos para determinar el tamaño de partícula y el coeficiente de uniformidad, de allí que para la presente investigación se siguieron los procedimientos establecidos en la norma NTC 2441 para café (ICONTEC, 1996) con algunas modificaciones en el número de tamices, con el objetivo de realizar un análisis mucho más completo. Además es importante resaltar que los resultados de un análisis granulométrico pueden ser generalizados y correlacionados por expresiones matemáticas denominadas “funciones de distribución de tamaños”, (García, Cuerda Correa, & Díaz Díez, 2004) relacionan el tamaño de partícula (abertura de malla), con un

porcentaje en peso, que generalmente es el acumulado retenido o el pasante. Existen muchas funciones pero las más utilizadas en el análisis de granulometría son las de Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S) y Rosin-Rammler (R-R), (Gimenes & Mendes, 2000), (Vítěz & Travníček, 2011), (Fujiwara, Dohi, Otsuka, Yamashita, & Sako, 2012), (Bitra et al., 2009). Ambos fueron analizados en el presente estudio.

Modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S): El modelo compara o relaciona los valores del porcentaje acumulado pasante $F(x_i)$ con el tamaño de partícula o abertura de malla de la serie empleada (Gimenes & Mendes, 2000). El modelo matemático propuesto se aprecia en la Ecuación 1:

Ecuación 1 Modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S)

$$F_{(x)} = 100 \left[\frac{X}{X_0} \right]^a$$

Dónde:

$F(x)$ = porcentaje en peso acumulado pasante por malla.

X = tamaño de partícula en micrones.

X_0 = módulo de tamaño el cual indica el tamaño teórico máximo de partículas en la muestra.

a = módulo de distribución.

Tomando logaritmos a ambos lados de la Ecuación 1, se tendría la Ecuación 2 linealizada:

Ecuación 2 Ecuación linealizada del modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S)

$$\text{Log}(F(x)) = a \log x + (\log 100 - a \log X_0)$$

Dónde:

$F(x)$ = porcentaje en peso acumulado pasante por malla.

X = tamaño de partícula en micrones.

X_0 = módulo de tamaño el cual indica el tamaño teórico máximo de partículas en la muestra.

a = módulo de distribución.

Modelo Rosin-Rammler (R-R): El modelo Rosin-Rammler (R-R), compara o relaciona los valores del porcentaje acumulado pasante $F(x_i)$ con el tamaño de partícula o abertura de malla de la serie empleada (Vítěz & Travníček, 2011). El modelo matemático propuesto se aprecia en la Ecuación 3:

Ecuación 3 Modelo matemático Rosin-Rammler (R-R)

$$F_{(x)} = 100 \left\{ 1 - \exp \left[- \left[\frac{X}{X_r} \right]^m \right] \right\}$$

Dónde:

$F_{(x)}$ = porcentaje acumulado pasante.

X_r = módulo de tamaño.

m = es el módulo de distribución.

m, X_r son constantes

Tomando logaritmos a ambos lados de la Ecuación 3 se tendría la Ecuación 4 linealizada:

Ecuación 4 Ecuación linealizada del modelo Rosin-Rammler (R-R)

$$\text{Log} \left(\text{Ln} \left(\frac{100}{F(x)} \right) \right) = m \log x - m \log X_r$$

Dónde:

X_r = módulo de tamaño.

m = módulo de distribución.

$F(x)$: % acumulado pasante.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la caracterización granulométrica de la pulpa de café y los modelos de distribución de partículas aplicados.

Materiales y métodos

Equipos

Se llevó a cabo el secado de la pulpa de café en un secador de bandejas; las pulpas secas fueron molidas en un molino de discos, el tamizado se realizó en una maquina Rotap Tyler conforme a la norma técnica colombiana NTC 2441 (ICONTEC, 1996) con algunas variaciones en la serie de tamices así: (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 200 y fondo serie A.S.T.M.E.).

Metodología

Esta fase del proyecto de investigación se desarrolló en tres etapas:

Etapa I. Se realizó una revisión de la normatividad existente en Colombia para el tratamiento de pulpa de café; el resultado obtenido es que no existe una norma relacionada con el análisis de este tipo de material por lo que se determinó adoptar la norma existente para análisis granulométrico del café tostado y molido NTC 2441 (ICONTEC, 1996), con algunas modificaciones.

Etapa II. Al material de estudio (pulpa de café) se le controló el proceso de cosecha como se ha explicado en el ítem de origen y tratamiento de la muestra.

Etapa III. Previo al análisis del tamaño de partícula las pulpas secas fueron molidas en un molino de discos, luego se siguió el procedimiento establecido en la norma del Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC) NTC 2441 (ICONTEC, 1996), tomando una muestra de 100 gramos la cual se ubicó en la parte superior de los tamices (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 200 y fondo) ensamblados de forma descendente, el tamizado se realizó durante diez minutos, y con los pesos inicial y final de cada tamiz se determinó la masa retenida en cada uno. Con los valores obtenidos se elaboró el grafico 1 y a partir de este se determinó el tamaño efectivo de la muestra (D_{10}), el tamaño del 60% (D_{60}) y el coeficiente de uniformidad de Hazen (C_u). Finalmente se calculó el tamaño promedio de partícula aplicando dos modelos matemáticos conocidos como

Ecuación 4 linealizada de Rossin- Rammler y Ecuación 2 linealizada de Gates-Gaudin-Schumann (Guevara Barreto, 2005), (Bitra et al., 2009).

El análisis del tamaño promedio de pulpa de café, relacionando la cantidad retenida acumulada en cada tamiz con la abertura del mismo y el análisis de la distribución del tamaño de partícula, empleando los modelos matemáticos conocidos como ecuación linealizada de Rossin-

Rammler (R-R) y la ecuación linealizada de Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S) se llevó a cabo mediante el uso de la hoja de cálculo EXCEL.

Resultados

Análisis de la granulometría de la pulpa de café

En la Tabla 14 se muestran los resultados de los pesos obtenidos para cada uno de las mallas en las tres replicas. Se ha calculado el porcentaje retenido como (peso retenido para cada tamiz/peso total)*100; el porcentaje retenido acumulado como ($X1=x1$; $X2=x1+x2$; $X3=x1+x2+x3$; ... $X10=100\% = x1+x2+x3+x4+x5+x6+x7+x8+x9+x10$) y el porcentaje acumulado pasante como (100- % en peso retenido acumulado).

Tabla 14 Valores obtenidos de la granulometría en pulpa de café

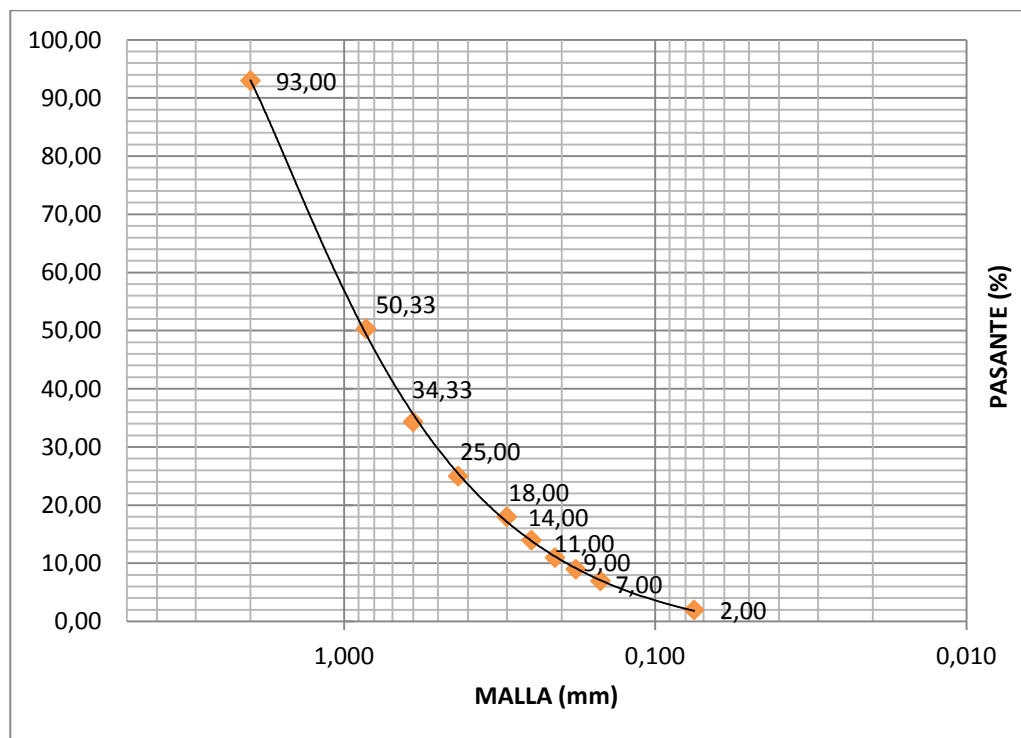
Numero tamiz	Diámetro Dp (mm)	Masa 1 retenida (g)	Masa 2 retenida (g)	Masa 3 retenida (g)	Desviación	Promedio	%cv	% Retenido	% Retenido Acumulado	% Pasante Acumulado
10	2,000	7,00	7,00	7,00	0,0000	7,000	0,00	7,0000	7,00	93,00
20	0,850	43,00	43,00	42,00	0,5774	42,667	1,35	42,6667	49,67	50,33
30	0,600	16,00	15,00	17,00	1,0000	16,000	6,25	16,0000	65,67	34,33
40	0,430	9,00	10,00	9,00	0,5774	9,333	6,19	9,3333	75,00	25,00
50	0,300	7,00	7,00	7,00	0,0000	7,000	0,00	7,0000	82,00	18,00
60	0,250	4,00	4,00	4,00	0,0000	4,000	0,00	4,0000	86,00	14,00
70	0,210	3,00	3,00	3,00	0,0000	3,000	0,00	3,0000	89,00	11,00
80	0,180	2,00	2,00	2,00	0,0000	2,000	0,00	2,0000	91,00	9,00
100	0,150	2,00	2,00	2,00	0,0000	2,000	0,00	2,0000	93,00	7,00
200	0,075	5,00	5,00	5,00	0,0000	5,000	0,00	5,0000	98,00	2,00
Fondo		2,00	2,00	2,00	0,0000	2,000	0,00	2,0000	100,00	0,00
MASA TOTAL		100	100	100				100		

En la tabla anterior se puede observar la distribución de partículas de la granulometría de pulpa de café así: el mayor porcentaje de retenido fue en la malla #20 (42,667 %), seguido por la malla #30 (16 %) y la #40 (9,333 %), las mallas 10 y 50 presentaron el mismo porcentaje (7 %), el resto de mallas presentaron porcentajes que variaron entre el 2 y el 5 %. Se concluye de esta manera que la mayoría de retenidos de la granulometría de la pulpa de café se encuentra entre 0,1 mm y 1,0 mm.

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que los coeficientes de variación encontrados para cada una de las repeticiones se encuentran en rangos adecuados que varían desde 0 % hasta un 6,16 % para las tres repeticiones.

Análisis gráfico de la distribución granulométrica de la pulpa de café

Una mejor forma de analizar la distribución de partículas de un ensayo granulométrico es a través de la realización de una gráfica, que muestre la relación entre el diámetro de partícula y el porcentaje pasante acumulado. En el Gráfico 1 se puede observar esta distribución de partículas, para lograr una mejor representación se suele graficar en escala logarítmica el eje de la abscisa que corresponde al diámetro de partículas y en el eje de la ordenada, en escala cartesiana, el porcentaje pasante.

Gráfico 1 Porcentaje en peso pasante acumulado *versus* diámetro de partícula

A partir del Gráfico 1 y por interpolación se encontraron los siguientes parámetros: Coeficiente de uniformidad ($C_{u=D_{10}/D_{60}}$) igual a 5,3, el tamaño efectivo (D_{10}) fue de 0,20 y el tamaño del 60 % (D_{60}) fue de 1,05; significan estos valores que un coeficiente de uniformidad cercano a la unidad denotaría una molienda uniforme de la pulpa de café, un alto coeficiente correspondería a una gran variación de tamaños, para este caso se cumple la primer afirmación y se deduce que el 60 % de los pasantes tienen en promedio un (1) mm de diámetro.

Análisis del Ajuste de los datos a los modelos empíricos de Rosin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S)

Los valores de la abertura del tamiz (diámetro) y los porcentajes acumulados, ver tabla 14 y gráfico 1, se aplican a unos modelos matemáticos conocidos como ecuación linealizada de Rosin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S), con el objetivo de analizar cuál de estos modelos se ajusta mejor a los datos de granulometría de la pulpa de café obtenidos, es decir, consiste en hallar su función de distribución que lo describa. A continuación se muestran los resultados obtenidos y su análisis.

Representación del modelo Rosin-Rammler (R-R)

En el Gráfico 2 se puede observar el modelo linealizado de Rosin- Ramler (R-R) con su correspondiente ecuación de la recta. Los valores encontrados se aproximan a una recta, dando como resultado una ecuación lineal con un r^2 de 0,9929, a saber:

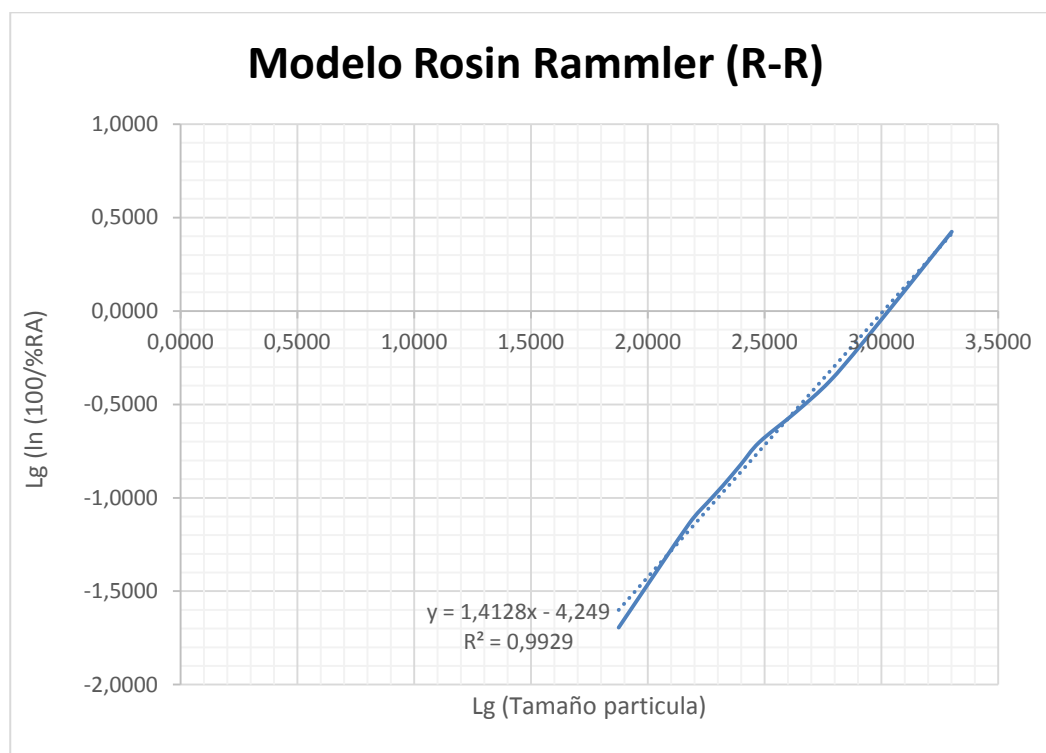
Ecuación 5 Línea recta del modelo linealizado de Rosin-Rammler (R-R)

$$y = 1,4128x - 4,249$$

r^2 de 0,9929

Esta ecuación que se ha encontrado por regresión lineal correlaciona el logaritmo del tamaño de partícula con la función (y) la cual fue obtenida al aplicar la linealización.

Gráfico 2 Modelo linealizado de Rosin-Rammler (R-R) para pulpa de café.



Reemplazando los parámetros obtenidos de la ecuación 5, en la ecuación 4 de linealización del modelo de Rosin-Rammler (R-R) se tendría la siguiente ecuación final para el modelo:

Ecuación 6 Linealización del modelo Rosin-Rammler (R-R) para pulpa de café

$$\text{Log} \left(\text{Ln} \left(\frac{100}{\%Pasante} \right) \right) = 1,4128 \log x - 4,249$$

A partir de esta ecuación se determina el coeficiente de uniformidad (n) el cual fue de 1,4128, la constante de la ecuación B fue de -4,249, con un coeficiente de correlación r^2 muy

bueno de 0,9929. El diámetro de partícula (X) se calcula despejando bien sea de la ecuación 6 o de la ecuación 7 del modelo de Rosin-Rammler para granulometría de pulpa de café dando como resultado un diámetro promedio de partícula de 0,78 mm, equivalente al 50 % de los pasantes.

Finalmente reemplazando los valores de las constantes encontradas m y X_r en la Ecuación 3 del modelo matemático de Rosin-Rammler (R-R), queda como resultado la Ecuación 7 correspondiente a la ecuación (función) que describe la distribución de partículas de la granulometría de pulpa de café.

Ecuación 7 Modelo matemático Rosin-Rammler (R-R) granulometría pulpa de café

$$F_{(x)} = 100 \left\{ 1 - \exp \left[- \left[\frac{X}{1017,4260} \right]^{1,4128} \right] \right\}$$

Dónde:

$F(x)$ = porcentaje acumulado pasante.

$X_r = 1017,4260$ (módulo de tamaño).

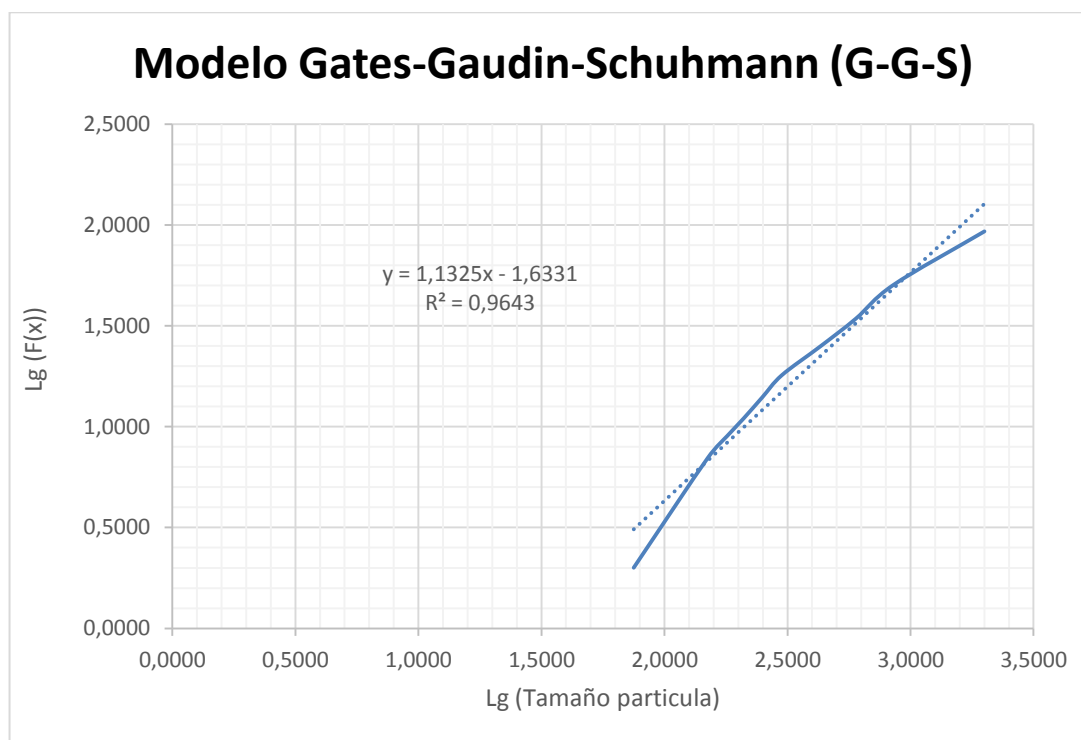
$m = 1,4128$ (módulo de distribución).

X = diámetro de partícula.

Representación del modelo Gates-Gaudin-Schuhmann(G-G-S)

En el Gráfico 3 se puede observar el modelo linealizado de Gates-Gaudin-Schuhmann(G-G-S) con su correspondiente ecuación de la recta.

Gráfico 3 Modelo linealizado de Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S)



Se observa en el Gráfico 3 que los valores encontrados se aproximan a una recta, dando como resultado la Ecuación 8 con un r^2 de 0,9643:

Ecuación 8 Línea recta del modelo Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S)

$$y = 1,1325x - 1,6331$$

Reemplazando en la Ecuación 2 de la linealización del modelo de Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S) se tendría la siguiente ecuación final linealizada:

Ecuación 9 Linealización del modelo Gates-Gaudin-Schumann (G-G-S)

$$\text{Log}(F(x)) = 1,1325 \log x - 1,6331$$

A partir de esta ecuación se determina el coeficiente de uniformidad (n) el cual fue de 1,1325, la constante de la ecuación B fue de -1,6331, con un coeficiente de correlación (r^2) aceptable de 0,9643. El diámetro de partícula (X) se calcula despejando de la

Ecuación 9 del modelo de Gates-Gaudin-Schumann (G-G-S) para granulometría de pulpa de café dando como resultado un diámetro promedio de partícula de 0,87 mm, equivalente al 50 % de los pasantes.

Finalmente reemplazando los valores de las constantes encontradas **a** y **X₀** en la Ecuación 2 del modelo matemático de Gates-Gaudin-Schumann (G-G-S), queda como resultado la Ecuación 10 correspondiente a la ecuación (función) que describe la distribución de partículas de la granulometría de pulpa de café.

Ecuación 10 Modelo Gates-Gaudin-Schumann (G-G-S) granulometría pulpa de café

$$F_{(x)} = 100 \left[\left[\frac{X}{1614,49} \right] \right]^{1,1325}$$

Dónde:

F(x) = porcentaje en peso acumulado pasante por malla.

X₀ = (1614,49) módulo de tamaño (tamaño teórico máximo de partículas en la muestra).

a = (1,1325) módulo de distribución.

X = tamaño de partícula en micrones.

En la Tabla 15 se pueden ver los valores de los parámetros encontrados para los modelos de Rossin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S).

Tabla 15. Parámetros de los modelos empíricos de Rossin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S).

Categoría	Modelos y/o función de distribución	Intercepto	Pendiente (m=a)	r^2	Modulo Tamaño ($X_r=X_0$)
Molino de discos	Rosin-Rammler	-4,2490	1,4128	0,9929	1017,43a
	Gates-Gaudin-Schuhmann	-1,6331	1,1325	0,9643	1614,49b

X_r , X_0 , módulo de tamaño, el cual indica el tamaño teórico máximo de partículas en la muestra; m , a , módulo de distribución, constantes calculadas.

Las letras que aparecen al lado del valor del módulo de tamaño indican diferencias entre promedios, según la prueba de LSD de Fisher a un 95 % de confianza.

Discusión

En Colombia a la fecha de elaboración del presente trabajo de investigación no se cuenta con una norma para el análisis granulométrico de pulpa de café y en la revisión bibliográfica realizada en la diferentes bases de datos no se logró encontrar estudios relacionados en este sentido con este subproducto. A nivel internacional tampoco se logró identificar estudios de granulometría de pulpa de café, sin embargo se identificó que para estudios relacionados con los componentes orgánicos presentes en la pulpa de café, los investigadores normalmente someten

el material de estudio (pulpa de café) a procesos de reducción de tamaño, que varían ampliamente en los equipos utilizados como: molinos de laboratorio, licuadoras, trituración manual etc., (Anabella et al., 2009) y algunos autores no especifican el tratamiento de reducción de tamaño realizado a sus análisis en pulpa de café, (Ramirez Martinez, 1988), (Torres Mancera et al., 2011). En consecuencia a la fecha no se logró establecer estudios dedicados exclusivamente al análisis granulométrico de la pulpa de café.

Conclusiones

De los modelos matemáticos Rossin-Rammler (R-R) y Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S) ajustados a los datos de granulometría de la pulpa de café encontrados; el modelo de Rosin-Rammler presenta un mejor ajuste con un r^2 alto de 0,9929 (ver Ecuación 7), en contraste al modelo de Gates-Gaudin-Schuhmann (G-G-S) que tuvo un r^2 de 0,9643 no tan alto. De allí que el modelo de Rossin-Rammler (R-R) es el que mejor representa la distribución de partículas de pulpa de café obtenida mediante un molino de discos.

Se encontró un coeficiente de uniformidad cercano a la unidad tanto para el análisis gráfico como para los modelos empíricos ajustados lo que se convierte en un buen resultado, es decir, el tamaño de partículas es muy homogéneo. De esta manera se estaría garantizando una materia prima (pulpa de café) en óptimas condiciones físicas para los procedimientos posteriores a realizarse en esta investigación, como es la extracción de sus componentes bioactivos, principalmente fenoles.

A partir de los análisis de granulometría de pulpa de café encontrados para la presente investigación, se opta por seleccionar la masa retenida sobre la malla No. 30 correspondiente a un diámetro de partícula de 0,59 mm valor que se encuentra en el rango de un diámetro promedio entre 0,5 y 0.7 mm, correspondiente a una molienda media, la cual ha sido recomendada en extracción del café por (Guevara Barreto, 2005).

**Determinación de la composición químico proximal de la pulpa de café, (*Coffea arabica* L.)
variedad Castillo.**

Los análisis de laboratorio más comunes que se realizan para conocer la composición química de los alimentos incluyen la determinación de: humedad; cenizas totales; extracto etéreo; fibra cruda y proteína cruda, con el objetivo de determinar su valor nutritivo, en un protocolo conocido como análisis proximal. Igualmente, dependiendo del objetivo del análisis químico y del interés comercial, resultan importantes otras determinaciones relacionadas con la caracterización de algún tipo de nutrientes en particular, por ejemplo el caso del análisis de carbohidratos en el que se podría estudiar la diferenciación de los que presentan un poder reductor; en el mismo sentido se podrían analizar las proteínas solubles o considerar la caracterización de los lípidos extraídos de un alimento, o también podría ser importante conocer el contenido de aminoácidos con respecto a la fracción proteínica, etc., (Bressani, 1979). Para la presente investigación se decidió realizar solamente el análisis químico proximal como ha sido formulado en un objetivo específico y no se profundiza en otros análisis como los mencionados anteriormente.

En relación con la pulpa de café existe un número relativamente bajo de datos sobre su composición química; los primeros estudios fueron realizados en el año 1979 por (Bressani, 1979), para tratar de comprender la estructura genética de los frutos de café así como su composición química, los cuales son influenciados por diferentes factores ambientales, por las prácticas agronómicas que se realizan en los cultivos de café, entre otras. Otros autores en años más recientes han estudiado también la composición química de la pulpa de café dado el interés

en su utilización, bien sea como suplemento de fertilización en las fincas o con otros fines comerciales como es el caso de los autores (Blandon Castaño et al., 1999). De otra parte y sumado a lo anterior, cuando se realiza el estudio de los componentes bioactivos, de cualquier material de gran interés para la industria alimenticia y la salud presentes en la pulpa de café o en cualquier otro material, se debe tener presente el estudio de un análisis proximal (Pandey et al., 2000) y (Nampoothiri, Favela-torres, Aguilar, & Saucedo-castan, 2014).

A continuación se presentan los resultados de las técnicas aplicadas para cada una de las variables analizadas de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad Castillo, mediante métodos descritos para el análisis químico proximal de alimentos del laboratorio de bromatología de la Corporación Universitaria Lasallista, basado en los métodos oficiales de análisis de la A.O.A.C. 15th Edición 1990.

Materiales y métodos

Metodología para la determinación de la humedad

La humedad corresponde al contenido de agua en el porcentaje presente en la muestra. El método se fundamenta en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire de acuerdo a lo establecido en los métodos oficiales de análisis de la A.O.A.C. 15th Edición 1990.

Equipo

Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg; cápsulas de vidrio, porcelana o metálica, con tapa; desecador con deshidratante adecuado; estufa Memmert UN55 regulada a 105 ± 1 °C; y material usual de laboratorio.

Procedimiento

Se efectuó el análisis por triplicado en parejas y se pesaron 2 g de muestra previamente homogeneizada, se registró (m_2); se trasladó la cápsula tapada al desecador y se dejó enfriar durante 30 a 45 min; se pesó la cápsula con tapa con una aproximación de 0.1 mg, y se registró (m_1); se colocó la muestra con cápsula destapada y la tapa en la estufa a la temperatura y tiempo recomendado de 105 °C x 5 horas. Finalmente se tapó la cápsula con la muestra, se sacó de la estufa, se enfrió en desecador durante 30 a 45 min y se repitió el procedimiento de secado por una hora adicional, hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedieran de 5 mg, se registró (m_3).

Cálculo y expresión de los resultados

La humedad de la pulpa de café expresada en porcentaje, se puede ver en la Ecuación 11:

Ecuación 11 Cálculo de humedad

$$\%Humedad = \left[\frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} \right] * 100$$

Dónde:

m_1 : masa de la cápsula vacía y de su tapa, en gramos.

m_2 : masa de la cápsula tapada con la muestra antes del secado, en gramos.

m_3 : masa de la cápsula con tapa más la muestra desecada, en gramos.

Resultados

En la Tabla 16 se relacionan los valores obtenidos en el laboratorio, se ha calculado el valor de la humedad de acuerdo a la Ecuación 11.

Tabla 16 Datos y resultados laboratorio cálculo de humedad

No repeticiones	Peso tara (gr)	Peso muestra (gr)	Peso tara más muestra (gr)	Peso final (gr)	Humedad (%)
1	13,8345	2,0042	15,8387	15,5969	12,0647
2	13,8405	2,0054	15,8459	15,5960	12,4614
3	13,9263	2,0023	15,9286	15,6839	12,2209
4	13,6026	2,0050	15,6076	15,3627	12,2145
5	13,9337	2,0054	15,9391	15,6945	12,1971
6	13,7687	2,0005	15,7692	15,5283	12,0420
DESVIACIÓN	0,1222	0,0020	0,1222	0,1219	0,1498
PROMEDIO	13,818	2,004	15,822	15,577	12,200
%cv	0,88%	0,10%	0,77%	0,78%	1,23%

En la Tabla 17 se presenta el resumen del análisis estadístico realizado para humedad mediante el software Statgraphics Centurión.

Tabla 17 Resumen estadístico para humedad

Recuento	6
Promedio	12,2001
Desviación Estándar	0,1498
Coefficiente de Variación	1,22816%
Mínimo	12,042
Máximo	12,4614
Rango	0,4194
Sesgo Estandarizado	1,0183
Curtosis Estandarizada	0,7794

El promedio de humedad encontrada para la pulpa de café fue de 12,2001 % como se observa en la Tabla 18, para un recuento de 6 repeticiones. Los resultados del coeficiente de variación estuvieron de acuerdo a lo establecido en los Métodos Oficiales de Análisis. A.O.A.C. 15th Edición 1990, el cual establece que el coeficiente de variación no debe ser superior al 5 %. En este caso los valores cumplen al ser de 1,22816 %. La Tabla 17 Incluye además las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma.

De particular interés aquí es el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indicaría desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se

encuentra también dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal en (Statgraphics Centurión, 2015).

Metodología para la determinación de las cenizas totales

Las cenizas están consideradas, de forma general, como el residuo inorgánico de una muestra que se obtiene al incinerar la muestra seca a 550 °C en una mufla hasta que todo el carbono desaparezca y están constituidas por óxidos, carbonatos, fosfatos y sustancias minerales. (Lasallista, 2015).

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra por calcinación y determinación gravimétrica del residuo de acuerdo a lo establecido en los métodos de la AOAC 923.03 Cap. 32, pág. 2. (A.O.A.C, 2005) y los referenciados en las guías bromatológicas del Laboratorio de Química de la Corporación Universitaria Lasallista, (Lasallista, 2015).

Equipo

Balanza analítica de sensibilidad 0,1 mg; mufla marca terrígeno serie 655 regulada a 550 ±2 °C; desecador con deshidratante adecuado (silicagel), placa calefactora y material usual de laboratorio.

Procedimiento

Se efectuó el análisis quintuplicado y se pesaron 3 gramos de pulpa de café, a continuación se relacionan los pasos realizados:

1. Se calcinó los crisoles vacíos a 550°C durante 2 h, se dejó enfriar (hasta $\pm 40^\circ\text{C}$) en la mufla, y se llevó al desecador y se pesó a temperatura ambiente (m_0).

2. Para muestras sólidas. Se pesaron 3 g de muestra en un crisol previamente tarado y deshumedecido (m_1).

3. Se colocaron los crisoles con la muestra en la mufla y se calcinó a 550°C durante 3 h hasta obtener cenizas de color blancas o grisáceas.

5. Se enfrió en la mufla apagada (hasta $\pm 40^\circ\text{C}$) y luego se traspasó a desecador y se pesó a temperatura ambiente (m_2).

Cálculo y expresión de los resultados

Con la Ecuación 12 y la Ecuación 13 se calcula el porcentaje de las cenizas de la pulpa de café en base húmeda y en base seca respectivamente.

Ecuación 12 Cálculo de cenizas en base húmeda

$$\% \text{ cenizas } (bh) = \left[\frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \right] * 100$$

Dónde:

m_2 : masa de la cápsula con las cenizas, en gramos.

m_1 : masa de la capsula con la muestra, en gramos.

m_0 : masa de la cápsula vacía, en gramos.

Ecuación 13 Cálculo de cenizas en base seca

$$\% \text{ cenizas (bs)} = \left[\frac{m_3}{m_1} \right] * 100$$

Para realizar los cálculos del porcentaje de materia orgánica se emplea la Ecuación 14:

Ecuación 14 Cálculo materia orgánica

$$\% \text{ materia orgánica} = [100 - \% \text{ cenizas(bs)}] * \left[\frac{100}{100 - \% \text{ humedad}} \right]$$

Resultados

A continuación en la Tabla 18 se relacionan los datos encontrados en el laboratorio y se ha calculado el porcentaje de cenizas en base húmeda y en base seca mediante la Ecuación 12 y la Ecuación 13 respectivamente, también se registran los valores encontrados para el porcentaje de materia orgánica calculados según la ecuación 14.

Tabla 18 Datos obtenidos y cálculo del porcentaje de cenizas en base húmeda, en base seca y materia orgánica

No repeticiones	Peso crisol (gr)	Peso muestra (gr)	Peso crisol más muestra (gr)	Peso final (gr)	% cenizas (bh)	% cenizas (bs)	% materia orgánica
1	34,8033	3,0069	37,8102	34,9758	5,737	7,4964	80,3036
2	33,6631	3,0001	36,6632	33,8339	5,693	7,7170	80,0830
3	35,6065	3,0039	38,6104	35,7785	5,726	7,3346	80,4654
4	32,4293	3,008	35,4373	32,6048	5,834	7,9930	79,8070
5	37,5635	3,0098	40,5733	37,7364	5,745	6,9920	80,8080

No repeticiones	Peso crisol (gr)	Peso muestra (gr)	Peso crisol más muestra (gr)	Peso final (gr)	% cenizas (bh)	% cenizas (bs)	% materia orgánica
DESVIACIÓN	1,9493	0,0038	1,9507	1,9487	0,0527	0,3793	0,3793
PROMEDIO	34,813	3,006	37,819	34,986	5,747	7,507	80,293
%cv	5,60%	0,13%	5,16%	5,57%	0,92%	5,05%	0,47%

A continuación en la Tabla 19 y en la Tabla 20 se presenta el resumen del análisis estadístico realizado para la humedad de pulpa de café en base húmeda y en base seca obtenido mediante el software Statgraphics Centurión.

Tabla 19 Resumen estadístico para cenizas en base húmeda

Recuento	5
Promedio	5,747
Desviación Estándar	0,0525119
Coefficiente de Variación	0,913727%
Mínimo	5,693
Máximo	5,834
Rango	0,141
Sesgo Estandarizado	1,28915
Curtosis Estandarizada	1,30056

Tabla 20 Resumen estadístico para cenizas en base seca

Recuento	5
Promedio	7,5066
Desviación Estándar	0,379261
Coefficiente de Variación	5,05236%
Mínimo	6,992

Máximo	7,993
Rango	1,001
Sesgo Estandarizado	-0,118346
Curtosis Estandarizada	-0,0959576

Los resultados promedio encontrados fueron: cenizas (bh): 5,747 %; cenizas (bs): 7,507 %; y materia orgánica: 80,293 %, los cuales son muy similares a los reportados por otros autores. Se puede ver en la Tabla 19 y en la Tabla 20 que el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada también se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El coeficiente de variación fue de 5,05236 %, valor esperado para este tipo de pruebas, lo que indica una baja dispersión de los resultados promedio obtenidos.

Metodología para la determinación de la Grasa

El análisis de grasa o extracto etéreo de una muestra (pulpa de café), consiste en someter la muestra exenta de agua (deshidratada) a un proceso de extracción continuo mediante el método de Soxhlet, utilizando como disolvente inorgánico hexano al 100 % para la disolución de las sustancias. La grasa entonces se obtiene al someter la muestra de pulpa a una extracción continua durante varias horas y evaporando luego el disolvente. La desventaja de este método es que en el residuo que queda se encuentran no solo las grasas verdaderas, sino también otras sustancias que no son grasas, tales como: ceras, ácidos orgánicos, alcoholes entre otros, razón por la cual se le llama grasa total y se expresa en porcentaje.

Equipo

Se realizó la determinación del porcentaje de grasa presente en la muestra de pulpa de café en un equipo Soxhlet automático de marca Velp Scientifica (SER 148) y material usual de laboratorio.

Procedimiento

A continuación se relacionan los principales pasos realizados para el análisis del extracto etéreo, para mayor información ver las guías bromatológicas de la Corporación Universitaria Lasallista.

1. preparación previa de la muestra; 2. Fijar las condición iniciales del equipo antes de encenderlo; 3. Encendido; 4. Preparación el equipo con el material a estudiar; 5. Funcionamiento del equipo (ver manual); 6. Dejar enfriar los platos calefactores, idealmente hasta temperatura ambiente, antes de sacar los vasos receptores; 7. Una vez fríos los vasos con extracto etéreo, subir la palanca de retención, primero presionando levemente hacia abajo, retirando el seguro y subiéndola lentamente; 8. Colocar los vasos en estufa a 105 °C hasta peso constante, registrar valor y calcular % extracto etéreo; 9. Pesar los vasos a temperatura ambiente y registrar el resultado (P1); 10. El equipo debe quedar apagado, desenchufado y el agua del grifo cortada.

Cálculo y expresión de los resultados

Con la Ecuación 15 se calcula el porcentaje de grasa encontrada en pulpa de café.

Ecuación 15 Cálculo del extracto etéreo (grasa)

$$\%EE = \left[\frac{(P_1 - P_0)}{P_2} \right] * 100$$

Dónde:

P₂: masa del matraz sin grasa, en gramos.

P₁: masa del matraz con grasa, en gramos.

P₀: masa de la muestra, en gramos.

Resultados

En la Tabla 21 se relacionan los datos encontrados en el laboratorio y se ha calculado el % de extracto etéreo mediante la Ecuación 15.

Tabla 21 Datos y cálculo del extracto etéreo

Repetición	Peso matraz (g)	Peso muestra (g)	Peso matraz con grasa (g)	Extracto etéreo (%)
1	73,0245	10,0165	73,1645	1,3977
2	72,8326	10,0069	72,9622	1,2951
3	72,8835	10,0091	73,0154	1,3178
4	73,6045	10,008	73,7374	1,3279
5	73,7795	10,0063	73,9215	1,4191
DESVIACIÓN	0,4365	0,0041	0,4396	0,0538
PROMEDIO	73,423	10,008	73,558	1,355
%cv	0,59%	0,04%	0,60%	3,97%

A continuación en la Tabla 22 se presenta el resumen del análisis estadístico realizado para extracto etéreo mediante el software Statgraphics Centurión.

Tabla 22 Resumen estadístico para extracto etéreo

Recuento	5
Promedio	1,35152
Desviación Estándar	0,0538001
Coefficiente de Variación	3,98071%
Mínimo	1,2951
Máximo	1,4191
Rango	0,124
Sesgo Estandarizado	0,429916
Curtosis Estandarizada	-1,12199

De acuerdo a la Tabla 21 el extracto etéreo encontrado en el presente análisis para pulpa de café fue de 1,355 % en promedio para las cinco repeticiones realizadas, el valor es inferior en una unidad con respecto a los datos reportados por Bressani, (Bressani, 1979), sin embargo el valor coincide con los hallados por otros investigadores como es el caso de (Murthy & Naidu, 2012) que ha reportado para grasa en pulpa de café el 2 %. Esta diferencia desde luego obedece a que los análisis se han realizado sobre diferentes variedades de café y también por diferencias de los estudios con respecto a la oferta climática particular en cada caso; lo importante de resaltar es que este contenido de grasa no es muy significativo si comparamos este material, con otras fuentes de grasa que son mas importante, por ejemplo las semillas oleaginosas que tiene un alto contenido de grasa, mayor a un 10%.

Finalmente se puede observar en la Tabla 22 que el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada también se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal y el coeficiente de variación fue de 3,98071 %, valor aceptable y que para estos casos es inferior al 5 % significa que la metodología empleada para este análisis está bien, lo que indica una baja dispersión de los resultados promedio obtenidos.

Metodología para la determinación de fibra cruda

Para la determinación de la fibra cruda en la pulpa de café se utilizó el método de fibra cruda (Weende), el cual está basado en la solubilidad de la fibra no celulósica por medio de soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio; el fundamento del método es asemejar este proceso al que desempeña el organismo en su función digestiva. El procedimiento empleado en esta investigación para su determinación consistió en efectuar dos digestiones; la primera con ácido sulfúrico y la segunda con hidróxido de potasio; con ello se logra eliminar las proteínas, carbohidratos solubles, residuos de grasas, vitaminas y otros compuestos diferentes que interfieren en la determinación de la fibra cruda.

Equipo

El extractor utilizado para la determinación de fibra cruda fue de la marca Velp Scientifica Fiwe Raw Fiber Extractors serie F30540200, lo que permite un análisis rápido, resultados fiables y con una alta reproducibilidad.

Procedimiento

El método consiste en someter la pulpa de café seca y desengrasada a una primera digestión ácida con ácido sulfúrico H_2SO_4 al 1,25 % - $0,255 \pm 0,005N$ y posteriormente a una segunda digestión alcalina con hidróxido de potasio KOH al 1,25% - $0,253 \pm 0,005N$ libre de carbonato. La materia orgánica del residuo obtenido se considera la fibra cruda y se calcula según la ecuación 16. El protocolo que se siguió para su determinación fue de acuerdo a la U.S AOAC 15 th Edición de 1990.

Cálculo y expresión de los resultados

Con la Ecuación 16 se calcula el % de fibra cruda en la pulpa de café.

Ecuación 16 Cálculo de fibra cruda

$$\%Fibra\ cruda = \left[\frac{(F_1 - F_2)}{(F_0)} \right] * 100$$

Dónde:

F_2 : masa del crisol, en gramos.

F_1 : masa del crisol lavado, en gramos.

F_0 : masa de la muestra, en gramos.

Resultados

A continuación en la Tabla 23 se relacionan los datos encontrados en el laboratorio y se ha calculado el porcentaje de fibra cruda mediante la Ecuación 16.

Tabla 23 Datos y resultados fibra cruda

Repetición	Peso crisol vacío (g)	Peso muestra (g)	Peso muestra más crisol (g)	Peso crisol lavado (g)	Peso crisol mufla (g)	Fibra cruda (%)
1	30,421	0,3048	30,7258	30,4936	30,4128	26,5092
2	30,5723	0,3034	30,8757	30,6489	30,5658	27,3896
3	30,3262	0,301	30,6272	30,4115	30,3238	29,1362
4	30,3228	0,3076	30,6304	30,4079	30,3256	26,7555
5	30,5139	0,306	30,8199	30,5907	30,5055	27,8431
6	30,167	0,3019	30,4689	30,2448	30,1623	27,3269
DESVIACIÓN	0,1468	0,0025	0,1477	0,1449	0,1448	0,9352
PROMEDIO	30,387	0,304	30,691	30,466	30,383	27,493
%cv	0,48%	0,82%	0,48%	0,48%	0,48%	3,40%

A continuación en la Tabla 24 se presenta el resumen del análisis estadístico realizado mediante el software Statgraphics Centurión.

Tabla 24 Resumen estadístico para fibra cruda

Recuento	6
Promedio	27,4934
Desviación Estándar	0,935171
Coefficiente de Variación	3,40144%
Mínimo	26,5092
Máximo	29,1362
Rango	2,627
Sesgo Estandarizado	1,14273
Curtosis Estandarizada	0,780258

Los resultados obtenidos para fibra cruda se pueden observar en la Tabla 23. La fibra cruda fue de 27,493 % un valor mayor al encontrado por Bressani que en sus ensayos encontró

para pulpa de café un porcentaje del 21 %, (Bressani, 1979), dicha diferencia se debe principalmente a la variedad y a factores climáticos principalmente.

En la Tabla 24 se puede observar que el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada también se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal, lo que le da validez al análisis realizado y el coeficiente de variación se encuentra en el rango esperado 3,4014 %, lo que indica una baja dispersión de los resultados promedio obtenidos.

Metodología para la determinación de proteína cruda

Se cuantificó por el método de Kjeldahl's ($\% \text{ proteína} = \%N \times 6,25$), a continuación se presentan los fundamentos de esta metodología.

Equipo

Se utilizaron dos equipos: un digestor de marca Velp Scientifica DK20 de la serie F30100184 y un equipo de destilación también de la marca Velp Scientifica UDK142, sin serie. Se utilizó también material usual de laboratorio.

Procedimiento

El procedimiento para determinar la proteína cruda se base en tres fases a saber:

Digestión: Se Homogeniza la muestra alimenticia/agrícola a analizar, después de reducirla de tamaño/ Se Pesó exactamente 0,1000g - 0,3000g /en un papel de filtro (se realizó ensayo en blanco con el papel de filtro para restar el aporte de trazas de nitrógeno si existen) y se

llevó al tubo digestor./se adiciono 4,0 g de catalizador y 10 ml de ácido sulfúrico al 96 % / se colocó el tubo digestor en el equipo de digestión de nitrógeno y se encendió el equipo (45 min a 420°C)/ Se encendió la bomba recirculadora (Scrubber) de vapores para evacuar los gases generados en la digestión/Al concluir el proceso de digestión, se apagó el equipo digestor y la bomba recirculadora (Scrubber) de vapores; se dejó enfriar y se adiciono con un frasco lavador agua destilada, disolviendo por rotación suave la solución y por rotación fuerte el sulfato de potasio cristalizado (en caso de presentarse)/ Se retiró el tubo digestor con la muestra y se incorporó en el equipo de destilación de nitrógeno (previamente encendido).

Destilación: Se ubicó un Erlenmeyer de 250 ml. en la zona de recolección del destilador y se seleccionó el programa establecido para el proceso (programa 1)/se comenzó con el proceso de destilación programado y se recogió el destilado, luego se retiró la solución cuando el proceso de destilación finalizó.

Titulación: Se adicionaron al destilado 3 gotas de indicador mixto o de Tashiro. (Solución verde)/ Se valoró el borato de amonio formado con HCl 0.1N (solución volumétrica)/La titulación finalizó cuando la solución cambió a color violeta y este permanece por 30 segundos.

Para calcular el % de Nitrógeno se utiliza la Ecuación 17 y con el resultado obtenido se reemplaza en la Ecuación 18 para calcular el porcentaje de proteína.

Ecuación 17 Calculo porcentaje nitrógeno

$$\%N = \left[\frac{(14 * (V_m - V_b) * N)}{W} \right] * 100$$

Dónde:

%N: Porcentaje de nitrógeno total.

14: Peso de un mili equivalente de Nitrógeno.

V_m: Volumen en ml de HCl 0.1N gastados por la muestra en la titulación.

V_b: Volumen en ml de HCl 0.1N gastados por el blanco de reactivos.

N: Normalidad del Titulante.

W: Peso en mg de la muestra alimenticia/agrícola.

Ecuación 18 Calculo porcentaje proteína

$$\%P = [\%N * F]$$

Dónde:

%P: Porcentaje de proteína en base húmeda.

F: Factor de cálculo

El factor de cálculo es equivalente al 6,25 obtenido del anexo de la guía bromatológica del laboratorio de análisis químicos de la Corporación Universitaria Lasallista, correspondiente al ítem otros alimentos.

Resultados

Los datos obtenidos en el laboratorio se reemplazan en la Ecuación 17 y en la Ecuación 18 dando como resultado los datos en porcentaje de nitrógeno y proteína que se aprecian en la Tabla 25. Es bueno aclarar que para este componente en específico se utilizaron todos los tubos

correspondientes a la digestión lo cual daría un total de 19 repeticiones, de esta manera se estabilizan mejor las condiciones de trabajo del equipo y se disminuye el error debido al mayor número de muestras analizadas.

Tabla 25 Datos obtenidos y cálculo del nitrógeno y proteína en porcentaje

Repetición	Peso muestra (g)	Peso K ₂ SO ₄ (g)	Catalizador (g)	Titulación (ml)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)
1	0,3012	7,0292	4,0111	0,5000	1,8592	11,6202
2	0,3090	7,0046	4,0797	0,5000	1,8123	11,3269
3	0,3067	7,0017	4,0617	0,5000	1,8259	11,4118
4	0,3037	7,0097	4,035	0,5000	1,8439	11,5245
5	0,3000	7,0267	4,0624	0,5000	1,8667	11,6667
6	0,3025	7,0185	4,0631	0,5000	1,8512	11,5702
7	0,3019	7,0573	4,0014	0,5000	1,8549	11,5932
8	0,3028	7,0380	4,0562	0,5000	1,8494	11,5588
9	0,3042	7,0170	4,0378	0,5000	1,8409	11,5056
10	0,3072	7,0533	4,0294	0,5000	1,8229	11,3932
11	0,3051	7,0100	4,0444	0,5000	1,8355	11,4716
12	0,3024	7,0324	4,0428	0,5000	1,8519	11,5741
13	0,3098	7,0124	4,0866	0,5000	1,8076	11,2976
14	0,3005	7,0787	4,0624	0,5000	1,8636	11,6473
15	0,3078	7,0062	4,0835	0,5000	1,8194	11,3710
16	0,3095	7,0375	4,0292	0,5000	1,8094	11,3086
17	0,3070	7,0440	4,0034	0,5000	1,8241	11,4007
18	0,3057	7,0318	4,0185	0,5000	1,8319	11,4491
19	0,3009	7,0185	4,0375	0,5000	1,8611	11,6318
Blanco	0,0000	7,0536	4,0451	0,1000		
DESVIACIÓN	0,0032	0,0204	0,0258	0,0000	0,0192	0,1201
PROMEDIO	0,305	7,028	4,045	0,500	1,839	11,491
%cv	1,05%	0,29%	0,64%	0,00%	1,04%	1,04%

A continuación en la Tabla 26 se relacionan los análisis estadísticos calculados mediante el software Statgraphics Centurión.

Tabla 26 Resumen estadístico para proteína

Recuento	19
Promedio	11,4907
Desviación Estándar	0,120069
Coefficiente de Variación	1,04492%
Mínimo	11,2976
Máximo	11,6667
Rango	0,3691
Sesgo Estandarizado	-0,304353
Curtosis Estandarizada	-1,16177

Los resultados obtenidos de acuerdo a la Tabla 25 de proteína realizados por el método de Kjeldahl's fue de 11,4907 % en promedio para la pulpa de café, este resultado coincide con los datos reportados por Bressani (ver Tabla 1), confirmándose de esta manera que este subproducto de la industria del café tiene un porcentaje importante de proteína. (Bressani, 1979). Es de resaltar que para el análisis de proteína por este método se comprenden las proteínas tales como: aminoácidos, aminos, glucósidos, nitrogenados, glucolípidos y ciertas vitaminas del complejo B que contienen nitrógeno, de allí que estudios más detallados tendrían la exigencia de realizar análisis más profundos, como por ejemplo caracterizar la composición de aminoácidos entre otros.

Para este caso basta con un análisis proximal como el reportado en este estudio de investigación. Finalmente se puede observar en la Tabla 26 que: el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El

valor de curtosis estandarizada también se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal, el valor esperado del coeficiente de variación de 1,04492 %, lo que indica una baja dispersión de los resultados promedio obtenidos.

Discusión

Los valores encontrados para los diferentes análisis relacionados con la determinación de la composición químico proximal de la pulpa de café (*Coffea Arabica L.*) de la variedad Castillo es a saber: Humedad: 12,20 %; cenizas (bh): 5,7470 %; cenizas (bs): 7,5066 %; extracto etéreo: 1,355 %; fibra cruda: 27,493 %; proteína cruda: 11,49 %. Estos valores coinciden cronológicamente a los encontrados por otros autores, (Bressani, 1979), (Blandon Castaño et al., 1999) y (Anabella et al., 2009).

En relación a las cenizas estos resultados coinciden con los hallados hace ya años por el investigador Bressani, (Bressani, 1979), autor que también reporto el fraccionamiento correspondiente a los minerales que en su orden son potasio, calcio, fosforo, sodio, boro, hierro, manganeso, cobre, zinc y algunas trazas de magnesio. La acumulación del material inorgánico en el café al parecer se presenta principalmente en la pulpa de café, sin embargo es lo esperado y el valor está en el rango encontrado en otras fuentes, por ejemplo cascara de arroz que es del orden del 3 %.

En relación a la fibra cruda Bressani por ejemplo en sus ensayos encontró para pulpa de café un porcentaje del 21 %, (Bressani, 1979), un valor inferior al encontrado en esta

investigación el cual correspondió al 27,493 %; dicha diferencia se debe principalmente a la variedad y a factores climáticos principalmente.

Con respecto a las otras variables analizadas se observó que la pulpa de café no es rica en grasas y que el porcentaje de humedad fue el adecuado para análisis de la química proximal el cual debe oscilar entre un 10 al 15 % según se plantean en las normas de la A.O.A.C.

Conclusión

La pulpa de café es uno de los mayores subproductos de la industria del café y posee algunos componentes de importancia de acuerdo a su composición química proximal realizada como: fibra y proteína con un 27,4934% y 11,4907 % respectivamente. Se concluye igualmente que la pulpa de café no es fuente rica en grasas, con un extracto etéreo de apenas 1,3549%.

Determinación del contenido de fenoles totales de la pulpa de café, (*Coffea arabica* L.) de la variedad Castillo, obtenidos mediante la tecnología de extracción convencional.

Para la determinación del contenido de fenoles totales en la pulpa de café se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, esta es una técnica mundialmente aceptada (AOAC 1997) para determinar el contenido de fenoles totales en una muestra. El principio del método se fundamenta en la reducción de los ácidos fosfomolibdico y fosfotungstico hasta un complejo elemental de molibdeno y tungsteno por acción de los fenoles presentes en la muestra. El complejo formado puede ser analizado espectrofotométricamente y mediante una curva de calibración con ácido Gálico se puede expresar el contenido de fenoles totales como equivalentes de ácido Gálico (GAE), es decir la concentración de ácido Gálico genera una respuesta equivalente a la producida por los compuestos fenólicos presentes en la muestra (Londoño, 2011). Para el logro de este objetivo específico se adoptó este método por su sencillez y porque dado el alcance del objetivo por ahora solo interesa conocer la cantidad de fenoles totales de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo extraídos por medio de la tecnología de extracción convencional y no su capacidad antioxidante, la cual será realizada por otro método y posterior a este objetivo. A partir de los análisis realizados en este capítulo se descartaran algunos solventes y los que sean seleccionados serán la base para desarrollar el próximo objetivo de la presente investigación.

Finalmente, la hipótesis nula que se ha planteado para este objetivo es que el promedio de extracción de los fenoles totales es igual para los tres solventes empleados (metanol, etanol y agua) y la hipótesis alternativa sería que el promedio de fenoles totales es diferente.

Materiales y métodos

La materia prima es la referida en el ítem de origen y tratamiento de la muestra

Equipos

La extracción de compuestos fenólicos de pulpa de café se realizó con agua destilada, etanol al 96,6%, y metanol al 99,9% en un agitador magnético, posteriormente el material se centrifugó en una centrifugadora marca Clay Adams serie 116257 modelo Dinac; el sobrenadante, al cual se le evaporó el solvente por destilación se le realizó el vacío en un evaporador rotatorio marca Buchi de un rango de 30 a 90°C±5°C modelo B-480 serie 10037959 y para la medición de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UV visible Jenway 6305.

Metodología

Preparación de la muestra y determinación de fenoles totales de pulpa de café.

Se procesaron 5,0000 ± 0,01 gramos de pulpa de café con un diámetro de partícula igual a $D_p=0,59$ mm (retenido sobre malla No. 30), los cuales se sometieron a extracción sucesiva con agua destilada, etanol al 96,6% y metanol al 99,9% en relación (1:10 w/v materia seca/solvente), en un agitador magnético a 200 rpm durante 20 horas a temperatura ambiente, posteriormente, el material se centrifugó a 5500 rpm por espacio de 10 minutos, seguidamente se extrajo el sobrenadante, al cual se le evaporó el solvente por destilación al vacío en un evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura de 40°C, el extracto de cada solvente se almaceno a -23°C en viales ámbar hasta su posterior evaluación.

Se realizó una curva de calibración de ácido Gálico con soluciones de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm, para poder expresar los resultados en mg de ácido Gálico/ 100 g de extracto, luego se llevaron las muestras al espectrofotómetro para realizar la lectura de la absorbancia a 765 nm.

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el método publicado por Folin y Ciocalteu (1997), empleado por Kuskoski, (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005). La reacción se realizó con 0,1 ml de la solución a analizar, 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,5 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20 % p/v; aforando a 10 ml con agua destilada. Transcurridas 2 horas se tomó lectura de absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro, luego interpolando los resultados con la curva de ácido Gálico elaborada a la concentración en un rango de 50-500 ug/ml se determinó el contenido de fenoles totales.

Diseño de Experimentos

Es claro que por sus características fisicoquímicas el tipo de solvente influye directamente en la variable de respuesta fenoles totales, se opta para este objetivo estudiar tres solventes diferentes a saber: agua destilada, etanol al 96,6% y metanol al 99,9%. El tipo de diseño experimental utilizado para este objetivo es un diseño completamente al azar (DCA). El procedimiento formulado para el diseño experimental es el siguiente:

Evaluación del sistema: Extracción con solvente (agua, etanol y metanol).

Identificación de respuestas a obtener: fenoles totales.

Identificación de factores a considerar: los factores o variable es el tipo de solvente; los niveles fueron etanol, agua y metanol.

Planteamiento de la hipótesis.

Ho: $u_1 = u_2 = u_3$

Ha: $u_1 \neq u_2 \neq u_3$

Donde u: es el promedio de valor de la variable de respuesta.

Condiciones matriz de experimentos: solvente (agua destilada, etanol (96,6%), metanol (99,9%)), tamaño de partícula de la muestra ($D_p=0,5$ mm) y las condiciones de extracción se realizaron bajo condiciones de extracción convencional, es decir, por agitación continua. En la Tabla 27 se puede ver la matriz de experimentos.

Tabla 27 Matriz de experimentos diseño completamente al azar

Tratamiento	Repeticiones		
Etanol	X	X	X
Agua	X	X	X
Metanol	X	X	X

Dónde: X es la variable respuesta.

Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos y el resumen de los análisis estadísticos realizados.

Valores encontrados en el laboratorio de la curva de calibración de ácido Gálico

En la Tabla 28 se muestran los valores encontrados en el laboratorio para la curva de ácido Gálico que fue elaborada a la concentración en un rango de 50-500 ug/ml. Se ha reportado

en esta tabla igualmente el análisis estadístico resumen, correspondiente para la curva de ácido Gálico.

Tabla 28 Resultados curva de calibración ácido gálico

AGE (ppm)	Replica 1 (Abs)	Replica 2 (Abs)	Replica 3 (Abs)	Desviación	Promedio (Abs)	%cv
50	0,017	0,016	0,017	0,0003	0,017	2,01
100	0,043	0,042	0,043	0,0008	0,043	1,84
150	0,075	0,074	0,075	0,0006	0,075	0,86
200	0,124	0,122	0,125	0,0013	0,124	1,03
500	0,442	0,437	0,446	0,0044	0,442	0,99

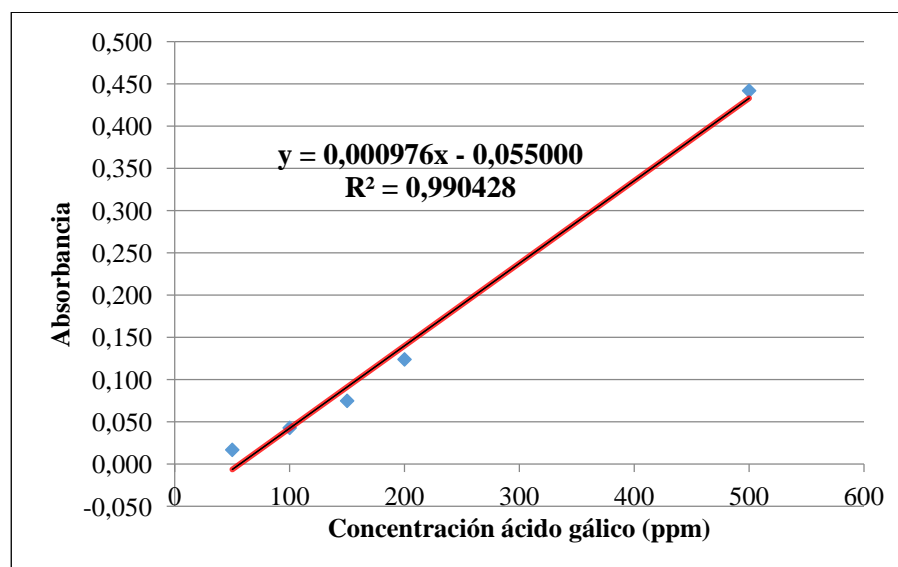
AGE: ácido gálico, Abs: Absorbancia

En la tabla anterior se puede observar que el coeficiente de variación fue menor al 5%, lo que indica una baja dispersión de los resultados promedio obtenidos.

Análisis gráfico de la curva de calibración de ácido Gálico

La ecuación de la recta encontrada para la curva de calibración de ácido Gálico se observa en el Gráfico 4 la cual presento una alta linealidad con un r^2 de 0,990428. De esta manera la curva de ácido Gálico elaborada se ajusta a los siguientes criterios: tiene un comportamiento lineal, el coeficiente de variación es menor al 3%, y la respuesta (abs 765nm) es directamente proporcional a la concentración en un rango de 50-500 ug/ml., lo que permite realizar la interpolación para encontrar los valores de fenoles totales presentes en la pulpa de café con bastante precisión.

Gráfico 4 Curva de calibración de ácido gálico



Valores encontrados para fenoles totales mediante la extracción por método convencional

En la Tabla 30 se puede observar los resultados de absorbancia encontrados en el laboratorio para la extracción de los componentes fenólicos presentes en la pulpa de café mediante extracción convencional con los solventes agua, etanol y metanol. Se ha calculado los mg AGE/100 g muestra seca de pulpa de café, con base en la interpolación realizada con la curva del Gráfico 4, realizada en el punto anterior.

Tabla 29 Contenido de fenoles totales en pulpa de café, extracción convencional

Solvente	Absorbancia	Concentración (ppm)	mg AGE / g muestra seca	mg AGE / 100 g muestra seca
agua	0,038	95,2869	47,643	4764,344
agua	0,042	99,3852	49,693	4969,262
agua	0,035	92,2131	46,107	4610,656
DESVIACIÓN	0,0035	3,60	1,80	179,91
PROMEDIO	0,038	95,63	47,81	4781,42

Solvente	Absorbancia	Concentración (ppm)	mg AGE / g muestra seca	mg AGE / 100 g muestra seca
%cv	9,16%	3,76%	3,76%	3,76%
Etanol	0,032	89,1393	44,570	4456,967
Etanol	0,035	92,2131	46,107	4610,656
Etanol	0,029	86,0656	43,033	4303,279
DESVIACIÓN	0,0030	3,0738	1,5369	153,6885
PROMEDIO	0,0320	89,1393	44,570	4456,967
%cv	9,38%	3,45%	3,45%	3,45%
Metanol	0,081	139,3443	69,672	6967,213
Metanol	0,0885	147,0287	73,514	7351,434
Metanol	0,0735	131,6598	65,830	6582,992
DESVIACIÓN	0,0075	7,68	3,8422	384,2213
PROMEDIO	0,081	139,34	69,672	6967,213
%cv	9,26%	5,51%	5,51%	5,51%

AGE: ácido gálico

De acuerdo a la Tabla 29 los mg AGE/100 g de muestra seca promedio hallados para cada uno de los solventes evaluados es como sigue: agua (**4781,42** mg AGE/100 g muestra seca), etanol (**4456,967** mg AGE/100 g muestra seca) y metanol (**6967,213** mg AGE/100 g muestra seca). El agua para este caso en particular resultó tener mayor extracción de fenoles totales que el solvente etanol, sin embargo el metanol sigue siendo el solvente de mayor extracción de estos compuestos y es de esperarse que así sea debido a su polaridad y afinidad por estos componentes. A continuación en la Tabla 30 y 31 se muestra el análisis estadístico de los valores encontrados.

Tabla 30 Resumen estadístico para fenoles totales, extracción convencional

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Agua	3	4781,42	179,910	3,76361%	4610,66	4969,26	358,606
Etanol	3	4456,97	153,689	3,44828%	4303,28	4610,66	307,377
Metanol	3	6967,21	384,221	5,5147%	6582,99	7351,43	768,442
Total	9	5404,59	1202,12	22,2426%	4303,28	7351,43	3048,15

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Agua	0,0128008	
Etanol	0,00000690136	
Metanol	0,0	
Total	1,05684	-0,795869

Tabla 31 Análisis de varianza (ANOVA) para fenoles totales por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,1154E7	2	5,57699E6	82,26	0,0000
Intra grupos	406792,	6	67798,6		
Total (Corr.)	1,15608E7	8			

En la Tabla 31 se puede analizar: se realizaron tres repeticiones para lo cual se obtuvo un promedio para los fenoles totales de 5404,59 mg AGE/100 g muestra seca, el coeficiente de variación fue de 3,76361%, 3,44828%, 5,5147% para agua, etanol y metanol respectivamente, siendo estos valores los adecuados según la norma; estadísticamente se refiere a que los valores obtenidos son fiables y el método tuvo una alta precisión, es decir, se controlaron los factores que pudieran afectar los resultados reduciendo al mínimo el margen de error.

De la Tabla 31 puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de fenoles totales entre un nivel de tratamiento y otro (agua, etanol y metanol), con un nivel del 95,0% de confianza, sin embargo para este tipo de análisis fue necesario aplicar otro análisis estadístico para determinar cuáles

medias son significativamente diferentes de otras, a continuación en la Tabla 32 se presentan los resultados de las prueba de múltiples rangos aplicada .

Tabla 32 Pruebas de múltiple rangos para fenoles totales por tratamiento

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Etanol	3	4456,97	X
Agua	3	4789,6	X
Metanol	3	6967,21	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Agua - Etanol		332,631	520,217
Agua - Metanol	*	-2177,61	520,217
Etanol - Metanol	*	-2510,25	520,217

* indica una diferencia significativa.

En la Tabla 32 el asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. En la parte superior de la tabla, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas (No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's). El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. (Statgraphics Centurión, 2015). En resumen no existe diferencia significativa entre los tratamientos de agua y etanol empleados en la extracción de compuestos fenólicos por medio de la tecnología de extracción convencional.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula de que el promedio de fenoles totales por tratamiento (agua, etanol y metanol) sea igual y en cambio se acepta la hipótesis alternativa de que el promedio de extracción de fenoles totales por tratamiento es diferente; aplicada la prueba de múltiples rangos se concluye que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de agua y etanol. Los resultados obtenidos en este capítulo de la investigación para los compuestos fenólicos totales extraídos convencionalmente y medidos mediante la prueba de Folin Ciocalteu fueron así: con metanol de **69,672** mg GAE/g de pulpa de café en seco (6967,21 mg AGE/100 g), con etanol **44,56967** mg AGE/g muestra seca de pulpa (4456,97 mg/100 g) y con agua de **47,81** mg GAE/g de pulpa de café (4781,42 mg/ 100g).

Los estudios de análisis de fenoles totales extraídos por método convencional para pulpa de café no son muchos, tan solo un par que reportan lo siguiente: los autores (López et al., 2013) encontraron para pulpa de café en diferentes momentos de fermentación hasta un máximo de 1200 mgAGE/100g pulpa fresca, un valor menor comparado con los obtenidos en este estudio, debido a que el reporte fue para pulpa fresca y no para pulpa seca como los reportados aquí. Otros autores como (Arellano González, Ramírez Coronel, Torres Mancera, Pérez Morales, & Saucedo Castañeda, 2011) han reportado 335 ± 71 g/kg de pulpa seca para la cantidad de fenoles totales para pulpa de café, para metanol los polifenoles encontrados fue de 122 ± 71 g/kg. Valores que están por encima a los obtenidos aquí en esta investigación debido a que estos autores emplearon primero extracción con metanol, luego hidrolisis alcalina y además lo realizaron sobre pulpa fermentada, condiciones muy diferentes a las realizadas para la presente investigación.

Por la escasez de estudios referidos a pulpa de café, a continuación se referencian algunos estudios realizados en otros productos del café con el fin de tener otras fuentes para comparar, es por ello que varias tecnologías de extracción han sido utilizadas para recuperar compuestos polifenólicos de varios subproductos y productos de la industria del café, los cuales se han enfocado principalmente en granos de café verde, grano de café tostado y en café molido, para este último subproducto varios autores han encontrado los siguientes resultados utilizando extracción convencional: (Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, 2012) usando la tecnología de extracción sólido líquido con varios solventes (métodos convencionales), encontraron valores de: 16 mg GAE/g molido bajo las condiciones de Metanol al 60 %, 40 ml/g, 60–65 °C, por 90 minutos y de 18 mg GAE/g molido bajo las condiciones de metanol al 50 %, 25 ml/g, 60–65 °C, por 90 minutos. De otra parte (Panusa A, Zuurro A, Lavecchia R, Marrosu G, 2013) empleando etanol 60 %, 50 ml/g, 60°C, por 30 minutos halló 11-28 mg GAE/g molido y empleando agua 50 ml/g, a 60°C, por 30 minutos reportó 6-19 mg GAE/g molido.

Comparando, se ve que los valores obtenidos en la presente investigación son mayores que los reportados por los autores antes mencionados para otros productos (café molido), lo que es prometedor hacia el futuro por tener en Colombia una fuente de materia prima (pulpa de café) que es económica y abundante.

Finalmente es importante resaltar que el metanol es un solvente por excelencia, que debido a sus cualidades fisicoquímicas lo hacen un solvente adecuado para la extracción de los compuestos fenólicos, ello se corroboró en la presente investigación, sin embargo por ser un solvente que puede afectar la salud y porque es un producto que es regulado por las autoridades de estupefacientes colombianas no será tenido en cuenta para estudios posteriores de este trabajo

de investigación, de allí que en base a los resultados obtenidos los solventes seleccionados para continuar con el siguiente objetivo de la presente investigación son: **el agua y el etanol**.

Conclusiones

La cantidad de fenoles totales encontrados en la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad Castillo mediante la tecnología de extracción convencional mostró unos valores altos, comparados con los encontrados en otros productos de esta industria, lo cual es muy significativo hacia el futuro por tener en Colombia una fuente de materia prima que es económica y abundante en compuestos bioactivos para su aplicación en diferentes industrias.

Se rechaza entonces la hipótesis nula que el promedio de fenoles totales sometidos a extracción con agua, etanol y metanol sean iguales y se acepta la hipótesis alternativa, es decir son diferentes, sin embargo realizada la prueba de múltiples rangos al 95 % prueba de LSD se encontró que el agua y el etanol utilizados en la extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, no mostraron diferencias significativas entre ellos, lo cual es importante por tener dos solventes de un lado a un costo menor y de otro por ser más inocuos comparados con el metanol.

Identificación del solvente con el que se obtenga la mejor extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en la pulpa de café

Es claro según los datos obtenidos en el capítulo anterior que el solvente tiene una marcada influencia en la cantidad de extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.). Descartado el metanol por las razones antes explicadas, surge la pregunta ¿será posible mejorar la cantidad de fenoles extraídos del material de estudio, con los solventes agua y etanol seleccionados?, la respuesta es sí. Se puede mejorar la extracción mediante el empleo del ultrasonido, es decir, esta tecnología por el fenómeno de cavitación que genera por la frecuencia y la potencia empleada logra producir pequeñas burbujas en zonas de baja presión que luego al llegar a zonas de alta presión implosionan causando rupturas en la pared celular, permitiendo de esta manera que el solvente llegue hasta los ácidos fenólicos que se encuentran esterificados en la pared celular, logrando de esta forma una mejor eficiencia en el proceso de extracción, de allí que el método se conoce como extracción asistida con ultrasonido.

Para identificar la influencia del solvente en la extracción asistida con ultrasonidos de compuestos fenólicos de la pulpa de café en el presente objetivo de investigación fue necesario mantener fijas las condiciones de trabajo del ultrasonido y en la condición mínima posible durante el tiempo de extracción, las condiciones de las variables fueron: temperatura (ambiente), frecuencia (25 Khz) y potencia (300 watios), esto debido a que en este objetivo por ahora solo interesaba conocer bajo condiciones del ultrasonido fijas, ¿cuál es la influencia o el comportamiento del solvente en la extracción de compuestos fenólicos? Y de esta manera seleccionar el solvente que mejor desempeño tuviera bajo las condiciones antes descritas.

Finalmente a los resultados obtenidos se les aplicó los análisis estadísticos correspondientes para aceptar o rechazar la hipótesis nula, de que el promedio de fenoles es igual para los solventes agua, etanol y su mezcla al 50:50 y/o aceptar o rechazar la hipótesis alternativa de que son diferentes (planteadas en la metodología), para lo cual se planteó en este capítulo mediante la técnica de diseño unifactorial categórico completamente al azar, identificar la influencia del tipo de solvente en la extracción de compuestos fenólicos de los solventes agua, etanol y su mezcla al 50:50. El contenido de fenoles totales (variable de respuesta) fue determinado utilizando el método publicado por Folin y Ciocalteu (1997), empleado por Kuskoski (Kuskoski et al., 2005) e interpolando los resultados en el Gráfico 4.

Materiales y métodos

Equipos

La extracción sucesiva con agua grado analítico, etanol al 96,6 %, y la mezcla agua etanol 50:50, se realizó en un equipo de ultrasonidos modelo SB-300DTY de capacidad 10 litros, posteriormente el extracto se centrifugó en una centrifugadora marca Clay Adams serie 116257 modelo Dinac; el sobrenadante, al cual se le evaporó el solvente por destilación se le realizó el vacío en un evaporador rotatorio Buchi R-114A equipado con una bomba de vacío marca Boeco r-300 y para la medición de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UV visible Jenway 6305.

Metodología

Preparación muestra y determinación de fenoles totales.

Se procesaron $5,0000 \pm 0,01$ gramos de cascara con un diámetro de partícula promedio $D_p=0,59$ mm (retenido sobre malla No. 30), los cuales se sometieron a extracción asistida con el ultrasonido a un tiempo 30 minutos y frecuencia de 25 Khz con agua destilada, etanol al 96,6 % y la mezcla agua etanol al 50:50 en relación (1:10 w/v materia seca/solvente), posteriormente, el material se centrifugó a 5500 rpm por espacio de 10 minutos, enseguida se extrajo el sobrenadante, al cual se le evaporó el solvente por destilación al vacío en un evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura de 40°C , el extracto de cada solvente se almaceno a -23°C en viales ámbar hasta su posterior evaluación. El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el método publicado por Folin y Ciocalteu (1997), empleado por Kuskoski (2005). La reacción se realizó con 0,1 ml de la solución a analizar, 0,5 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y 1,5 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20 % p/v; aforando a 10 ml con agua destilada. Transcurridas 2 horas se tomó lectura de absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro. Para expresar los resultados en mg de ácido Gálico/ 100 g de extracto se utilizó una curva de calibración de ácido Gálico con soluciones de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm, (realizada en el capítulo anterior, Gráfico 4).

Diseño de Experimentos:

Basándose en el hecho de que el tipo de solvente influye directamente en la variable de respuesta fenoles totales, se opta por tomarlo como factor de estudio. El tipo de diseño

experimental utilizado para este objetivo es un diseño completamente al azar (DCA). El procedimiento formulado para el diseño experimental es el siguiente:

Evaluación del sistema: Extracción con solvente.

Identificación de respuestas a obtener: fenoles totales.

Identificación de factores a considerar: los factores o variables son: tipo de solvente y los niveles son: etanol, agua y la mezcla agua etanol al 50:50.

Planteamiento de la hipótesis.

Ho: $u_1 = u_2 = u_3$

Ha: $u_1 \neq u_2 \neq u_3$

Donde u: es el promedio de valor de la variable de respuesta.

Condiciones matriz de experimentos: solvente (agua, etanol, agua/etanol (50 %), tamaño de partícula de la muestra 0,59 mm (retenido sobre malla No. 30) y condiciones de operación del equipo de ultrasonidos (tiempo: 30min. y Frecuencia: 25 Khz) se trabajaron bajo las mismas condiciones, para los diferentes solventes, con tres repeticiones como se observa en Tabla 33.

Tabla 33 Matriz de experimentos diseño completamente al azar

Tratamiento	Repeticiones		
Etanol	X	X	X
Agua	X	X	X
50% Etanol: 50% Agua	X	X	X

Dónde: X es la variable respuesta.

Resultados

En la Tabla 34 se observan los resultados encontrados del estudio de la influencia de los solventes: agua, etanol y la mezcla agua etanol al 50:50 % mediante la extracción asistida con ultrasonido, en el laboratorio se han calculado los fenoles totales (mg AGE/100g).

Tabla 34 Datos y resultados de la influencia del solvente en la extracción asistida con ultrasonido de fenoles totales

Tratamiento (Extracción)	Solvente	ABS	Concentración (ppm)	mg AGE / g muestra seca	mg AGE / 100 g muestra seca
1	Agua	0,035	92,2131	46,107	4610,656
	Agua	0,031	88,1148	44,057	4405,738
	Agua	0,030	87,0902	43,545	4354,508
2	Agua	0,027	84,0164	42,008	4200,820
	Agua	0,032	88,8320	44,416	4441,598
	Agua	0,028	84,7336	42,367	4236,680
3	Agua	0,033	90,4713	45,236	4523,566
	Agua	0,030	87,3975	43,699	4369,877
	Agua	0,029	86,0656	43,033	4303,279
DESVIACIÓN		0,0026	2,6218	1,3109	131,0893
PROMEDIO		0,031	87,659	43,83	4382,97
%cv		8,37%	2,99%	2,99%	2,99%
1	Etanol	0,022	78,8934	39,447	3944,672
	Etanol	0,019	75,8197	37,910	3790,984
	Etanol	0,025	81,9672	40,984	4098,361
2	Etanol	0,023	79,9180	39,959	3995,902
	Etanol	0,023	79,4057	39,703	3970,287
	Etanol	0,021	77,3566	38,678	3867,828
3	Etanol	0,022	78,3811	39,191	3919,057
	Etanol	0,025	81,4549	40,727	4072,746
	Etanol	0,022	78,8934	39,447	3944,672
DESVIACIÓN		0,0019	1,9016	0,9508	95,0779
PROMEDIO		0,0222	79,1211	39,561	3956,056
%cv		8,35%	2,40%	2,40%	2,40%
1	Agua (50%)/etanol (50%)	0,042	99,3852	49,693	4969,262
	Agua (50%)/etanol (50%)	0,048	105,5328	52,766	5276,639
	Agua (50%)/etanol (50%)	0,041	98,3607	49,180	4918,033
2	Agua (50%)/etanol (50%)	0,050	107,5820	53,791	5379,098
	Agua (50%)/etanol (50%)	0,044	101,0246	50,512	5051,230

Tratamiento (Extracción)	Solvente	ABS	Concentración (ppm)	mg AGE / g muestra seca	mg AGE / 100 g muestra seca
3	Agua (50%)/etanol (50%)	0,052	110,0410	55,020	5502,049
	Agua (50%)/etanol (50%)	0,045	102,8689	51,434	5143,443
	Agua (50%)/etanol (50%)	0,046	103,0738	51,537	5153,689
	Agua (50%)/etanol (50%)	0,045	102,4590	51,230	5122,951
	DESVIACIÓN	0,0037	3,7842	1,8921	189,2104
	PROMEDIO	0,046	103,370	51,685	5168,488
	%cv	8,05%	3,66%	3,66%	3,66%

En la Tabla 34 se pueden observar los datos encontrados de la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro; con estos valores se ha calculado los mg de ácido Gálico/100 g de extracto, de acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de calibración de ácido Gálico, ver Gráfico 4. El promedio de mg AGE/ 100 g de extracto encontrado para el solvente agua fue de 4382,97 mg AGE/ 100 g; etanol 3956,056 mg AGE/ 100 g y de la mezcla agua etanol fue de 5168,488 mg AGE/ 100 g.

Análisis estadístico de los resultados de la influencia del solvente (agua, etanol y su mezcla 50:50) en la extracción asistida con ultrasonido de fenoles totales.

En la Tabla 35 y 36 se pueden ver los resultados del análisis estadístico realizado con el propósito de identificar la influencia del solvente, es decir, conocer cual o cuales de los solventes realiza una mejor extracción de fenoles totales de la muestra objeto de estudio (pulpa de café); el análisis fue realizado mediante el software Statgraphics Centurión.

Tabla 35 Resumen estadístico para Fenoles Totales

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Agua	9	4382,97	131,089	2,99088%	4200,82	4610,66	409,836
Agua:Etanol	9	5168,49	189,21	3,66084%	4918,03	5502,05	584,016

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Etanol	9	3956,06	95,078	2,40335%	3790,98	4098,36	307,377
Total	27	4502,5	530,024	11,7718%	3790,98	5502,05	1711,07

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Agua	0,444814	-0,194244
Agua:Etanol	0,650207	-0,215811
Etanol	-0,160692	0,0168647
Total	0,950236	-1,26416

En la Tabla 35 resumen estadístico, se relacionan los recuentos realizados para cada tratamiento con tres repeticiones (9) para un total de 27 ensayos, el promedio encontrado de fenoles totales fue de 4502,5 mg AGE/100 g de muestra, se observa que la mejor extracción se logró con el solvente agua etanol en la relación 50:50, el coeficiente de variación para este análisis estuvo por debajo del 3,6 % siendo un valor muy bueno lo que indica una baja dispersión de los resultados promedio obtenidos, indicando además que se controló bien las variables involucradas en la investigación.

En la Tabla 36 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de Fenoles totales para cada uno de los tres niveles de tratamiento aplicados en la extracción de fenoles totales con el fin de identificar la influencia de los solventes en su extracción y se analizan las hipótesis planteadas al inicio de este capítulo.

Tabla 36 ANOVA para Fenoles por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,80786E6	2	3,40393E6	164,64	0,0000
Intra grupos	496198,	24	20674,9		
Total (Corr.)	7,30405E6	26			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Fenoles en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón F, que en este caso es igual a 164,64, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de fenoles entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. De acuerdo a este resultado se rechaza la hipótesis nula de que el promedio de fenoles totales por tratamiento sea igual y en cambio se acepta la hipótesis alternativa de que el promedio de extracción de fenoles totales por tratamiento es diferente.

Sin embargo, para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se le aplicó a los resultados obtenidos la prueba de múltiples rangos, a continuación en la Tabla 37 se puede observar los resultados de la prueba.

Tabla 37 Pruebas de Múltiple Rangos para Fenoles por Tratamiento

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Etanol	9	3956,06	X
Agua	9	4382,97	X
Agua:Etanol	9	5168,49	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Agua - Agua:Etanol	*	-785,519	139,896
Agua - Etanol	*	426,913	139,896
Agua:Etanol - Etanol	*	1212,43	139,896

* indica una diferencia significativa

Método: 95,0 porcentaje LSD de Fisher

En la Tabla 37 se observa el procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3

pares de contraste indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. En la parte superior de la Tabla 37 se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas, del cual se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher al 95 %.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula, de que el promedio de fenoles totales por tratamiento (agua, etanol y la mezcla agua:etanol) sea igual y en cambio se acepta la hipótesis alternativa, de que el promedio de extracción de fenoles totales por tratamiento es diferente.

La cantidad de fenoles totales encontrados en la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad Castillo mediante la tecnología de extracción asistida con ultrasonidos, bajo condiciones mínimas de operación mostró el siguiente comportamiento: Se observó que los valores de fenoles totales empleando el solvente agua fue de 4382,97 mg AGE/100 g muestra y etanol de 3956,056 mg AGE/100 g muestra, estos valores fueron ligeramente menores en la extracción con ultrasonido comparados con los resultados encontrados en el objetivo anterior donde la extracción se realizó por método convencional a saber: agua 4781,42 mg AGE/100 g muestra y etanol 4456,97 mg AGE/100 g muestra, se explica este resultado por la aplicación en el tiempo, es decir, fue mucho mayor el tiempo de exposición en el sistema convencional de

extracción que en el del ultrasonido, además porque el ultrasonido se trabajó a condiciones fijas y con las mínimas (frecuencia: 25 Khz y tiempo: 30 min.) para no generar demasiado daño en la pared celular. Sin embargo destaca el resultado obtenido con la mezcla agua etanol empleados en el ultrasonido, el cual presentó un valor mucho más alto a saber de 5168,488 mg AGE/100g de muestra, ello se explica porque se favorecen las relaciones e interacciones moleculares de los compuestos en la mezcla lo que facilita las reacciones entre los solventes utilizados y los solutos a extraer, este valor es muy significativo y es mucho más alto que los obtenidos por agua o etanol tanto en el sistema convencional como en el ultrasonidos, además es importante resaltar que se mantiene la constante de que, la extracción con agua de fenoles totales es mayor tanto en extracción convencional como en la extracción asistida con ultrasonidos en comparación con el etanol, lo que se explica por el mismo hecho manifestado anterior del favorecimiento o no de las interacciones moleculares, dado que se generan polaridades en el sistema que favorecen la extracción de los compuestos fenólicos (Monroy vázquez et al., 2007).

Hasta la fecha no se logró encontrar en las diferentes bases de datos consultadas estudios relacionados con la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de café mediante la tecnología del ultrasonido, lo que de alguna manera es una dificultad por no tener datos para realizar comparaciones.

A partir de los resultados obtenidos en el presente capítulo del trabajo de investigación se seleccionó la mezcla de agua etanol al 50:50 como el mejor solvente para la extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa de café. En el capítulo siguiente se presentan la metodología y los resultados obtenidos de la maximización de la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa

de café mediante la extracción asistida con ultrasonidos, un objetivo muy importante de este trabajo de investigación.

Conclusiones

Se rechaza la hipótesis nula que el promedio de fenoles totales sometidos a extracción con agua, etanol y etanol agua al 50:50 % sean iguales y se acepta la hipótesis alternativa, es decir son diferentes, realizada la prueba de múltiples rangos al 95 % prueba de LSD de Fisher se confirmó que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Se encontró que bajo condiciones mínimas del ultrasonido (frecuencia 25 Khz, tiempo 30 minutos y a temperatura ambiente) la mezcla agua etanol al 50:50 %, es el mejor solvente para la extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica L.*) variedad Castillo y el de menor rendimiento fue con el solvente etanol.

El solvente seleccionado es el agua etanol al 50:50 %, con el cual se realizara la maximización de la extracción asistida con ultrasonido de compuestos fenólicos en la pulpa de café, objetivo muy importante del próximo capítulo de esta investigación.

Determinación de las mejores condiciones para la extracción de compuestos fenólicos a partir de pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, mediante la tecnología de extracción asistida con ultrasonidos.

En esta época y en especial para el área de la alimentación y la nutrición se requiere de una alta precisión y eficiencia en cada una de las operaciones unitarias que se llevan a cabo dentro de las empresas que se dedican a ofrecer diferentes productos alimenticios para este sector. De allí que para lograr mejorar la eficiencia y la calidad de las operaciones industriales, así como para ofrecer productos alimenticios con un óptimo balance entre utilidad y economía, tanto para la empresa como para los consumidores, es menester encontrar las condiciones de operación adecuada para que los diferentes equipos de la empresa operen en los puntos más rentables, siendo además controlables y seguros.

Existen múltiples herramientas para lograr este cometido, una de ellas es la **optimización de procesos** que es una herramienta cuantitativa y que se fundamenta sobre una formulación matemática que por medio de métodos numéricos adaptados permite obtener resultados precisos, como por ejemplo el diseño de experimentos que es una poderosa herramienta no solo para el investigador sino también para la aplicación práctica del conocimiento por parte de los ingenieros de procesos.

Para lograr las mejores condiciones de la extracción asistida con la tecnología del ultrasonidos de compuestos fenólicos de la pulpa de café, se ha empleado un diseño factorial 3^2 completamente aleatorizado el cual se llevó a cabo por triplicado, con el fin de determinar el efecto de los factores de estudio (tiempo y frecuencia), sobre la variable de respuesta fenoles

totales en la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de café mediante el solvente agua y etanol en una relación de 50:50 %, solventes seleccionados del objetivo anterior. A continuación se consigna la metodología y los resultados obtenidos.

Materiales y métodos

Equipos

La extracción sucesiva con agua destilada, etanol al 96,6 %, y la mezcla agua etanol 50:50, se realizó en un equipo de ultrasonidos modelo SB-300DTY de capacidad 10 litros, posteriormente el extracto se centrifugó en una centrifugadora marca Clay Adams serie 116257 modelo Dinac; el sobrenadante, al cual se le evaporó el solvente por destilación se le realizó el vacío en un evaporador rotatorio Buchi R-114A de un rango de 30 a 90°C±5°C modelo B-480 serie 10037959 equipado con una bomba de vacío marca Boeco r-300 y para la medición de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UV visible Jenway 6305.

Metodología

Preparación muestra y determinación de fenoles totales.

Al igual que en el capítulo anterior se procesaron $5,0000 \pm 0,01$ gramos de cascara con un diámetro de partícula promedio $D_p=0,59$ mm (retenido sobre malla No. 30), los cuales se sometieron a extracción asistida con el ultrasonido a un tiempo y frecuencia de acuerdo con el diseño de experimentos utilizado (ver tabla 38), empleando la mezcla de los solventes agua

destilada y etanol al 96,6 % en relación 50:50, el tratamiento posterior de la muestra fue el mismo que se empleó en el capítulo anterior.

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el método publicado por Folin y Ciocalteu (1997), empleado por Kuskoski (2005), el procedimiento fue el mismo que se ha realizado en capítulos anteriores. Transcurridas 2 horas se tomó lectura de absorbancia a 765nm en el espectrofotómetro.

Diseño de Experimentos

Los factores y niveles de estudio evaluados fueron: el **tiempo** (15, 30 y 45 min., según lo optimizado para uva por (Larrea Posadas, 2012)) y de acuerdo a (Casazza, Aliakbarian, Mantegna, Cravotto, & Perego, 2010); la **frecuencia** (28, 40 y 59 kHz, correspondiente a la salida del equipo); con una **potencia** fija de 300 vatios, de acuerdo a lo encontrado por (Wang et al., 2013). Se utilizó un diseño factorial 3^2 completamente aleatorizado (ver Tabla 38) el cual se llevó a cabo por triplicado, con el fin de determinar el efecto de los factores de estudio, sobre la variable de respuesta fenoles totales. El diseño experimental fue realizado con ayuda del programa Statgraphics Centurión © Plus versión XV.II., al igual que el análisis de los resultados obtenidos.

Tabla 38 Matriz de experimentos diseño factorial 3^2 completamente aleatorizado

Tiempo	Frecuencia	Fenoles Totales
45	59	x
15	40	x
45	40	x
30	59	x
30	40	x

Tiempo	Frecuencia	Fenoles Totales
15	28	x
30	28	x
45	28	x
15	59	x
45	59	x
15	40	x
45	40	x
30	59	x
30	40	x
15	28	x
30	28	x
45	28	x
15	59	x
45	59	x
15	40	x
45	40	x
30	59	x
30	40	x
15	28	x
30	28	x
45	28	x
15	59	x

Dónde: X es la variable respuesta.

Resultados

Diseño base del diseño factorial por superficie de respuesta 3^2

En la Tabla 39 se muestran los valores obtenidos de fenoles totales para cada uno de los factores y niveles de estudio evaluados en la maximización de la extracción asistida con ultrasonido del tiempo (15, 30 y 45 minutos) y la frecuencia (28, 40 y 59 kHz) del diseño factorial empleado.

Tabla 39 Datos y resultados de fenoles extracción asistida con ultrasonido, maximización

Frecuencia (Khz)	Tiempo (min.)	Replicas	Solvente (50:50)	ABS Experimental	Concentración (ppm)	mg AGE / g muestra seca	mg AGE / 100 g muestra seca
59	45	1	agua:etanol	0,062	119,8770	59,939	5993,852
59	45	2	agua:etanol	0,061	118,8525	59,426	5942,623
59	45	3	agua:etanol	0,058	115,7787	57,889	5788,934
40	45	1	agua:etanol	0,071	129,0984	64,549	6454,918
40	45	2	agua:etanol	0,075	133,1967	66,598	6659,836
40	45	3	agua:etanol	0,078	136,2705	68,135	6813,525
28	45	1	agua:etanol	0,055	112,7049	56,352	5635,246
28	45	2	agua:etanol	0,059	116,8033	58,402	5840,164
28	45	3	agua:etanol	0,054	111,6803	55,840	5584,016
59	30	1	agua:etanol	0,053	110,6557	55,328	5532,787
59	30	2	agua:etanol	0,052	109,6311	54,816	5481,557
59	30	3	agua:etanol	0,051	108,6066	54,303	5430,328
40	30	1	agua:etanol	0,046	103,4836	51,742	5174,180
40	30	2	agua:etanol	0,045	102,4590	51,230	5122,951
40	30	3	agua:etanol	0,042	99,3852	49,693	4969,262
28	30	1	agua:etanol	0,044	101,4344	50,717	5071,721
28	30	2	agua:etanol	0,045	102,4590	51,230	5122,951
28	30	3	agua:etanol	0,048	105,5328	52,766	5276,639
59	15	1	agua:etanol	0,045	102,4590	51,230	5122,951
59	15	2	agua:etanol	0,041	98,3607	49,180	4918,033
59	15	3	agua:etanol	0,043	100,4098	50,205	5020,492
40	15	1	agua:etanol	0,044	101,4344	50,717	5071,721
40	15	2	agua:etanol	0,043	100,4098	50,205	5020,492
40	15	3	agua:etanol	0,040	97,3361	48,668	4866,803
28	15	1	agua:etanol	0,033	90,1639	45,082	4508,197
28	15	2	agua:etanol	0,033	90,1639	45,082	4508,197
28	15	3	agua:etanol	0,036	93,2377	46,619	4661,885

En los resultados obtenidos (ver tabla anterior) se puede observar que los valores mayores de fenoles totales se obtuvieron con el tratamiento a una frecuencia de 40 Khz y un tiempo de 45 minutos (6642,760 mg AGE/100g en promedio), el tratamiento que menor rendimiento mostro fue el de 28 Khz y un tiempo de 15 minutos (4559,426 mg AGE/100g en promedio). A continuación se muestran los análisis realizados en el software Statgraphics de maximización de la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de café.

Análisis de varianza del modelo

Para evaluar la significancia estadística del modelo de regresión del diseño factorial 3^2 completamente aleatorizado, se realizó en el software Statgraphics Centurión el análisis de varianza (ANOVA). Su interpretación indica que para un modelo dado, un valor p menor hace que el modelo sea mucho más representativo (Yuang et al, 2008). El análisis de varianza Además parte la variabilidad de fenoles totales en piezas separadas para cada uno de los efectos, prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

Tabla 40 Análisis de Varianza para el diseño factorial 3^2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Frecuencia	507542,	1	507542,	7,79	0,0109
B:Tiempo	6,54851E6	1	6,54851E6	100,54	0,0000
AA	560737,	1	560737,	8,61	0,0079
AB	83632,7	1	83632,7	1,28	0,2699
BB	303317,	1	303317,	4,66	0,0427
Error total	1,36527E6	21	65133,0		
Total (corr.)	9,44069E6	26			

R-cuadrado = 85,5117 por ciento
R-cuadrado (ajustado por g.l.) = 82,0621 por ciento
Error estándar del est. = 255,212
Error absoluto medio = 178,116
Estadístico Durbin-Watson = 3,3515 (P=0,9999)
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,730794

En este caso, 4 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0 %. (Ver Tabla 40) a saber: La variable tiempo ($p < 0,0000$) es altamente significativa, seguida por la interacción AA ($p < 0,0116$), la frecuencia ($p < 0,0155$) y la interacción BB ($p < 0,0427$).

El estadístico R-Cuadrado que aparece arriba indica que el modelo, así ajustado, explica 85,5117 % de la variabilidad en Fenoles Totales. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es de 82,0621 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 255,212. El error medio absoluto (MAE) de 178,116 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0 %, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0 %.

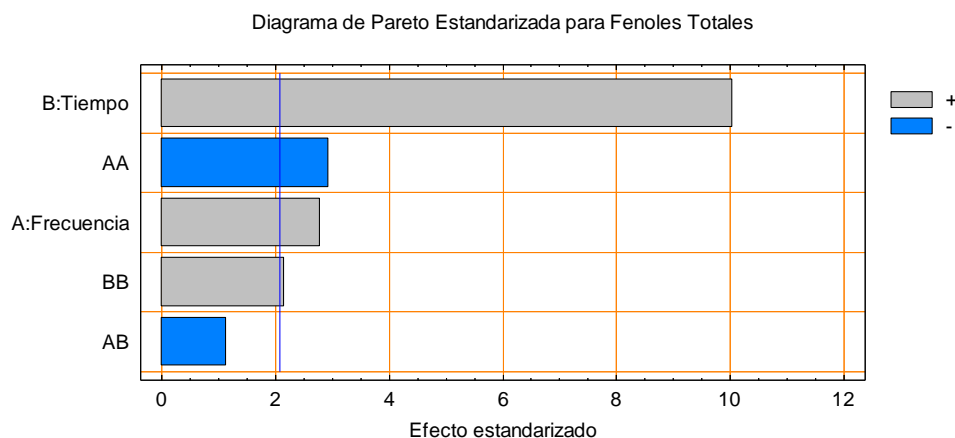
Análisis gráfico del modelo de maximización de la extracción asistida con ultrasonidos de fenoles totales de la pulpa de café

Análisis diagrama de Pareto

La influencia en la respuesta del sistema ante variaciones puede observarse de forma estandarizada en el diagrama de Pareto (ver Gráfico 5). En él se puede observar de manera decreciente la magnitud de los efectos estimados, la longitud de la barra es proporcional al efecto estandarizado y se calcula como el efecto estimado dividido entre su error estándar.

A partir de la línea se puede estimar cuales efectos son estadísticamente significativos con un nivel del 95 % de confianza, en este caso tres efectos son estadísticamente significativos a saber: tiempo, la interacción AA, la interacción BB y la frecuencia, los cuales tienen influencia significativa sobre la variable de respuesta fenoles totales, indicar además que la interacción AA (frecuencia) significa que a medida que se incrementa el valor de esta variable se obtiene un aumento en la extracción de compuestos fenólicos (es significativa) pero al llegar al punto máximo ocurre un descenso en la extracción de estos compuestos, es decir deja de ser significativa, a partir de este máximo.

Gráfico 5 Diagrama de Pareto estandarizado para fenoles totales



Las variables e interacciones que no sobrepasan el límite estadístico del valor P representan un aporte insignificante, pero se tienen en cuenta para un mejor ajuste del modelo.

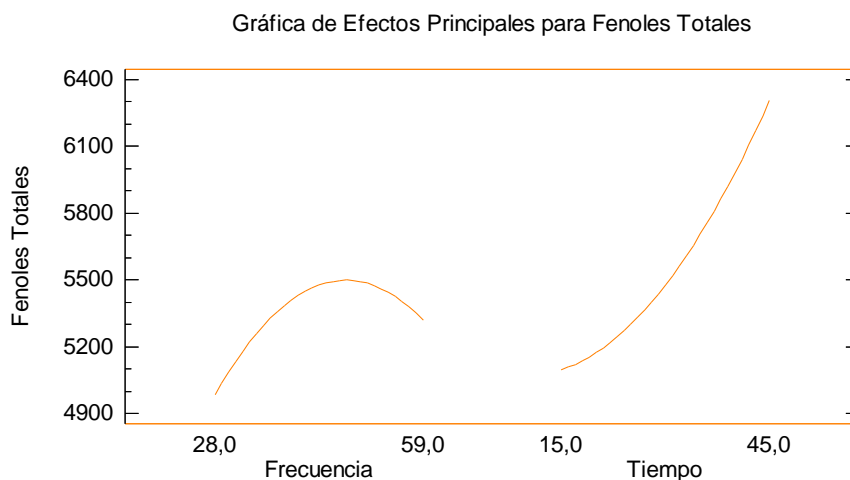
Análisis efectos de las variables e interacciones en el diseño factorial 3^2

Los estimados de fenoles totales como una función de cada factor experimental pueden observarse en el gráfico de efectos principales (ver Gráfico 6), se advierten allí los efectos principales de las variables independientes sobre la variable de respuesta fenoles totales; se observa que el factor de interés varía desde el nivel más bajo hasta el nivel más alto, mientras que el resto de factores se mantienen constantes, a medida que la pendiente sea mayor, el efecto influye mucho mayor sobre la variable de respuesta.

En este caso vemos que las variables de efectos principales son: **frecuencia y tiempo**, esta última tiene una mayor pendiente con respecto a la frecuencia donde su valor inferior es de 15 minutos hasta un máximo 45 minutos, lo que significa que el tiempo es una variable que influye fuertemente en la respuesta fenoles totales, es decir con un cambio pequeño en el ascenso

del tiempo también se produce un fuerte incremento en la variable de respuesta fenoles totales; para la variable frecuencia si bien influye en la extracción de compuestos fenólicos no es tan marcada su influencia como el tiempo, tiene un ascenso desde 28 Khz hasta un máximo de 45 Khz aproximadamente donde se alcanza el valor máximo de la variable respuesta, para luego empezar a descender a medida que se alcanzan valores mayores hasta llegar a 59Khz.

Gráfico 6 Efectos principales para fenoles totales

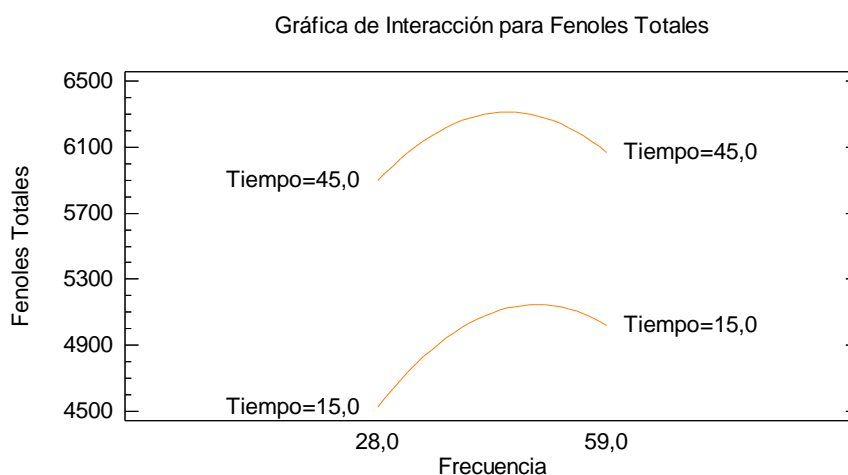


La grafica anterior confirma lo analizado en el apartado anterior mediante el análisis de ANOVA, mostrando que la variable tiempo fue el efecto que más influyó sobre la variable de respuesta fenoles totales medida en el extracto de pulpa de café.

Ahora bien si se observa como es la interacción entre factores y su influencia en la variable respuesta (fenoles totales), en la Gráfico 7 podemos observar cómo se dan estas interacciones. La respuesta de fenoles totales no es afectada significativamente por la interacción

frecuencia-tiempo, es decir, a medida que se aumenta la frecuencia aumenta la variable respuesta, sin embargo a partir de cierta frecuencia si se sigue aumentando la frecuencia decrece al igual que el valor de la variable respuesta. Finalmente las interacciones frecuencia-frecuencia y la interacción tiempo-tiempo son significativas dentro del modelo obtenido.

Gráfico 7 Interacción de factores para fenoles totales



Maximización de la variable de respuesta fenoles totales

La meta es maximizar la variable respuesta de fenoles totales. En la Tabla 41 se puede observar la combinación de los factores que se maximizan para obtener un valor óptimo de 6313,31 mg AGE/100 g muestra y en el Gráfico 8, se puede observar la superficie de respuesta estimada, mediante el software Statgraphics.

Tabla 41 Maximizar respuesta

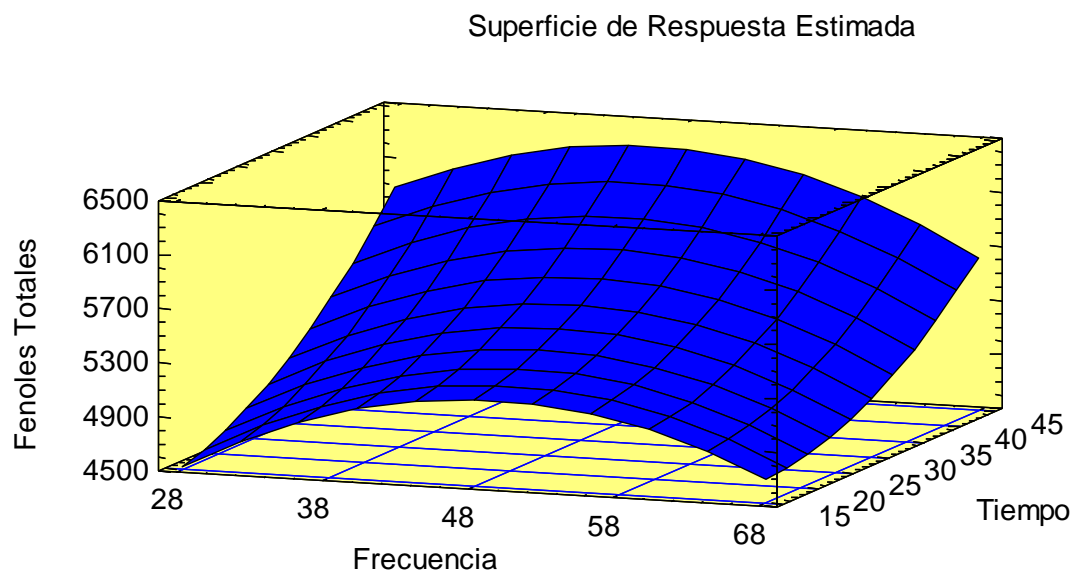
<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Frecuencia	28,0	59,0	45,5293- 47,5092
Tiempo	15,0	45,0	45,0

Meta: maximizar Fenoles Totales

Valor óptimo modelo completo = 6313,31 mg AGE/100 g muestra

Valor óptimo modelo reducido = 6335,67 mg AGE/100 g muestra (para un óptimo de frecuencia: 47,5092 y un tiempo: 45)

Gráfico 8 Superficie de respuesta estimada



El gráfico obtenido para el modelo de superficie de respuesta, muestra en el eje vertical la variable respuesta de fenoles totales y en el eje de las abscisas aparecen los factores estudiados en la extracción asistida con el ultrasonido, se observa en la región azul (superficie) los puntos de

máximos y mínimos. La combinación de los factores de frecuencia de 45Khz y del tiempo a los 45 minutos son los que presentan el punto más alto en la superficie, para fenoles totales de 6313,31 mg AGE/100 g muestra y en contraste el punto más bajo de la superficie coincide con el eje a los ceros para una frecuencia de 28 Khz y un tiempo de 15 minutos, para un contenido de fenoles totales de 4500 mg AGE/100 g de muestra, de acuerdo al modelo completo; para el modelo reducido la combinación de los factores de frecuencia de 47,5092 Khz y del tiempo a los 45 minutos son los que presentan el punto más alto en la superficie, para fenoles totales de 6335,67 mg AGE/100 g muestra.

Análisis del modelo ajustado para el diseño factorial 3²

En la Tabla 42 se pueden observar los resultados obtenidos para el diseño experimental, en esta se pueden ver los valores de los coeficientes estimados para cada variable y para la interacción entre ellos, se observa en la ecuación 19 el modelo encontrado y en la ecuación 20 se observa la ecuación del modelo reducido, sin tener en cuenta la interacción AB (no significativa).

Tabla 42 Coeficiente de regresión para Fenoles Totales

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	1670,69
A:Frecuencia	139,153
B:Tiempo	-4,09038
AA	-1,35216
AB	-0,356053
BB	0,999287

A continuación se relaciona la ecuación del modelo ajustado (diseño factorial 3²) la cual es construida con los valores que se presentan en la tabla anterior:

Ecuación 19. Ecuación de regresión múltiple ajustada a los datos experimentales

$$\mathbf{Fenoles\ Totales} = 1670,69 + 139,153 * \text{Frecuencia} - 4,09038 * \text{Tiempo} - 1,35216 * \text{Frecuencia}^2 - 0,356053 * \text{Frecuencia} * \text{Tiempo} + 0,999287 * \text{Tiempo}^2$$

Ecuación 20. Ecuación de regresión múltiple ajustada a los datos experimentales (modelo reducido)

$$\mathbf{Fenoles\ Totales} = 2122,87 + 128,472 * \text{Frecuencia} - 19,1633 * \text{Tiempo} - 1,35216 * \text{Frecuencia}^2 + 0,999287 * \text{Tiempo}^2$$

Las ecuaciones anteriores son de tipo polinómica y de segundo orden y fue la que por interrelación de factores se elaboró en el programa Statgraphics Centurión. El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo completo y el reducido, así ajustado, explican 85,54 % y 84,63 % respectivamente de la variabilidad en Fenoles Totales.

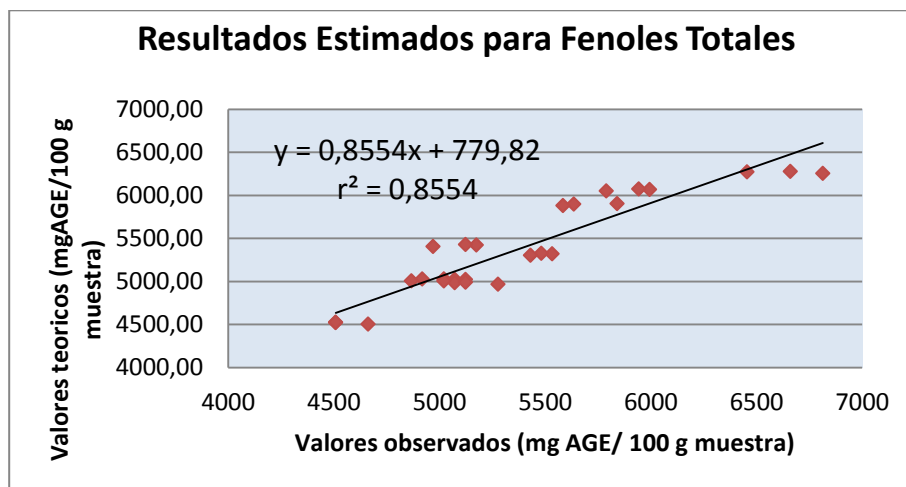
Es importante, una vez obtenidas las ecuaciones del modelo de maximización presentado en el ítem anterior, realizarle la validación, es decir, establecer la correlación existente entre los datos experimentales versus los datos teóricos encontrados. En la Tabla 43 se pueden ver los datos obtenidos experimentalmente y los datos obtenidos por el modelo teórico, tanto para el

modelo completo como para el modelo reducido, es decir, sin tener en cuenta las interacciones no significativas.

Tabla 43 Resultados estimados para fenoles totales teórico versus experimental

	Valores Observados	Valores modelo completo	Valores modelo reducido
Fila	(mg AGE/100 gr muestra)	(mg AGE/100 gr muestra)	(mg AGE/100 gr muestra)
1	5993,85	6071,81	6085,88
2	5532,79	5324,08	5473,97
3	5174,18	5426,53	5576,43
4	6454,92	6275,74	6188,33
5	5635,25	5901,54	5750,04
6	5122,95	5026,02	4862,06
7	4508,2	4524,62	4526,22
8	5071,72	5027,0	4964,52
9	5071,72	4988,24	5138,13
10	5942,62	6077,5	6091,57
11	5481,56	5329,77	5479,66
12	5122,95	5432,22	5582,12
13	6659,84	6281,43	6194,02
14	5840,16	5907,23	5755,73
15	4918,03	5031,71	4867,75
16	4508,2	4530,31	4531,91
17	5020,47	5032,69	4970,21
18	5122,95	4993,93	5143,82
19	5788,93	6054,73	6068,8
20	5430,33	5307,0	5456,89
21	4969,26	5409,46	5559,35
22	6813,52	6258,67	6171,26
23	5584,02	5884,46	5732,96
24	5020,49	5008,94	4844,98
25	4661,89	4507,54	4509,14
26	4866,8	5009,92	4947,44
27	5276,64	4971,16	5121,05

A continuación en el Gráfico 9 se puede observar la correlación realizada para los datos teóricos versus los experimentales según el modelo completo.

Gráfico 9 Validación del modelo experimental *versus* teórico completo

La ecuación encontrada para la correlación de datos teóricos versus los experimentales es la ecuación 21.

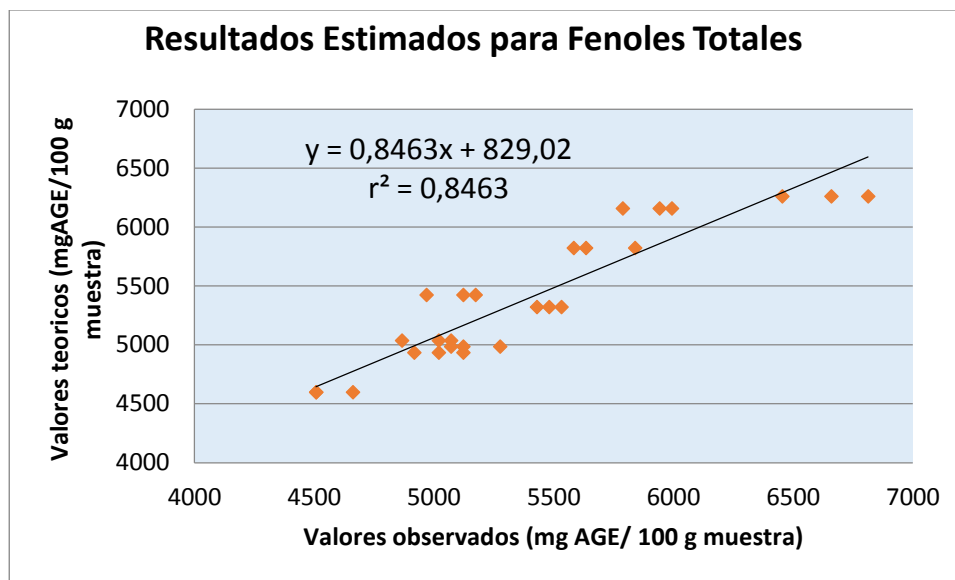
Ecuación 21. Correlación valores experimentales versus valores teóricos

$$Y = 0,8554x + 779,82$$

La correlación entre los valores de fenoles totales encontrados experimental versus los valores de fenoles totales encontrados teóricamente presentaron un r^2 de 0,8554. Significa lo anterior que el modelo de maximización teórico encontrado predice en un 85,54 % los datos encontrados experimentalmente, es decir, el modelo teórico tiene buena capacidad de predicción y por lo tanto se acepta, dado que supera el 80 %.

A continuación en el Gráfico 10 se puede observar la correlación realizada para los datos teóricos versus los experimentales según el modelo reducido.

Gráfico 10 Validación del modelo experimental *versus* teórico reducido



La ecuación encontrada para la correlación de datos teóricos versus los experimentales es la ecuación 22:

Ecuación 22. Correlación valores experimentales versus teóricos modelo reducido

$$Y = 0,8463x + 829,02$$

La correlación entre los valores de fenoles totales encontrados experimental versus los valores de fenoles totales encontrados teóricamente presentaron un r^2 de 0,8463 %. Significa lo

anterior que el modelo de maximización teórico encontrado predice en un 84,63 % los datos encontrados experimentalmente, es decir, el modelo teórico tiene buena capacidad de predicción y por lo tanto se acepta, dado que supera el 80 %. Esto permite hasta ahora concluir que el tiempo y la frecuencia son variables que influyen significativamente en la extracción asistida con ultrasonidos de compuestos fenólicos de la pulpa de café.

Discusión

La combinación de los factores de frecuencia de 45Khz y del tiempo de 45 minutos, son los que presentan el punto más alto en la superficie de maximización de la extracción asistida con ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, con un total de fenoles totales de 6313,31 mg AGE/100 g muestra, según el modelo completo, es decir teniendo en cuenta aquellas interacciones no significativas y en contraste el punto más bajo de la superficie coincide con el eje a los ceros para una frecuencia de 28 Khz y un tiempo de 15 minutos, para un contenido de fenoles totales de 4500 mg AGE/100 g de muestra. La combinación de los factores de frecuencia de 47,5092Khz y del tiempo de 45 minutos, son los que presentan el punto más alto en la superficie de maximización de la extracción asistida con ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo, con un total de fenoles totales de 6335,67 mg AGE/100 g muestra, según el modelo reducido, es decir, eliminando las interacciones no significativas del modelo.

Comparando la extracción máxima de compuestos fenólicos (frecuencia de 40 Khz y tiempo de 45 minutos) con respecto a la mínima obtenida (frecuencia de 28 Khz y tiempo de 15 minutos), se logró obtener un 33,85 % más de compuestos fenólicos (ver tabla 43).

A partir del análisis de varianza del diseño experimental se logró establecer que los factores frecuencia y tiempo tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativos en el modelo con un nivel de confianza del 95,0%. (Ver Tabla 40) es decir: La variable tiempo ($p < 0,0000$) es altamente significativa igualmente la frecuencia ($p < 0,0109$), seguida por la interacción AA ($p < 0,0079$) y la interacción BB ($p < 0,0427$). Significa lo anterior que la variable que más influye en la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de café es el tiempo seguida por la frecuencia, teniendo presente que según la interacción AA (frecuencia) indica que esta variable es también significativa hasta lograr un valor máximo y deja de ser significativa a medida que continúa aumentando el valor, para esta investigación el valor máximo alcanzado sería teóricamente de 45,5293 Khz y de 47,5092 Khz para el modelo completo y el reducido respectivamente, a partir de este valor la frecuencia influye de manera negativa en la extracción de compuestos fenólicos.

Conclusiones

Las mejores condiciones para la extracción asistida con ultrasonidos de compuestos fenólicos de pulpa de café se lograría con una frecuencia de 45,5293 Khz y de 47,5092 Khz para el modelo completo y el reducido respectivamente, con un tiempo de 45 minutos y con una

potencia fija de 300 vatios, el valor obtenido teórico sería de 6313,31 mg AGE/100 g muestra y de 6335,67 mg AGE/100 g muestra, según el modelo reducido.

El análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta, tuvo un ajuste adecuado con una función de tipo cuadrático, con un $r^2 = 0.8554$ y de $0,8463$ para el modelo completo y el reducido respectivamente. Esto significa que el modelo teórico tiene la capacidad de predecir en un 85,54 % y en un 84,63 % los fenoles totales (variable de respuesta) con respecto a los datos experimentales, por tanto se acepta el modelo de superficie de respuesta encontrado.

**Evaluación de la composición de algunos compuestos fenólicos y la actividad antirradical
In-vitro de los extractos de pulpa de café, con mayor contenido de fenoles totales.**

Las sustancias que son comunes a los seres vivos y que son esenciales para el mantenimiento de células como: lípidos, proteínas, hidratos de carbono, y ácidos nucleicos se originan a partir del metabolismo primario, (Lourdes & Giada, 2013, 2) de las plantas; los compuestos fenólicos, objeto de estudio de la presente investigación se constituyen en uno de los grupos más importantes y ampliamente distribuidos y hacen parte de los metabolitos secundarios de las plantas, (Moure et al., 2001, 146), (Stalikas, 2007, 2), (Ignat, Volf, & Popa, 2011), (Robards, 2003, 662), (Zhang, Yang, & Wang, 2011, 1). Sobre estos últimos, existe una gran abundancia en la pulpa de café fresca a saber: flavanonas, ácidos hidroxicinámicos, ácidos clorogénicos, flavonoles, antocianinas y los taninos condensados (proantocianidinas) (Clifford, 1985b; Clifford y Ramírez - Martínez, 1991b, 2), citados por (Esquivel & Jiménez, 2012, 2).

Es de resaltar que para el presente trabajo de investigación solo se planteó evaluar inicialmente la composición de los antioxidantes correspondientes a los ácidos hidroxicinámicos libres: caféico, cumárico, ferúlico, y sinápico, sin embargo el trabajo de investigación mostró otras posibilidades, de allí que también se cuantificaron algunos ácidos clorogénicos: ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ácido criptoclorogénico, ácido 3,5-dicafeoilquinico y ácido 4,5-dicafeoilquinico, según su disponibilidad de estándares en el mercado local.

Materiales y métodos

Equipos

La extracción con la mezcla agua etanol al 50:50 % se realizó en un equipo de ultrasonidos modelo SB-300DTY de capacidad 10 litros, posteriormente el extracto se centrifugó en una centrifugadora marca Clay Adams serie 116257 modelo Dinac; el sobrenadante, al cual se le evaporó el solvente por destilación se le realizó el vacío en un evaporador rotatorio Buchi R-114A de un rango de 30 a 90 °C±5°C modelo B-480 serie 10037959 equipado con una bomba de vacío marca Boeco r-300; para la cuantificación de algunos compuestos fenólicos se utilizó un cromatógrafo de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos HPLC-DAD (SPD-M20A) y para la medición de actividad antioxidante se utilizó un espectrofluorímetro Biotek.

Tratamiento de la muestra para la extracción de compuestos fenólicos por ultrasonido

Se procesó $5,0000 \pm 0,01$ gramos de pulpa de café, los cuales se sometieron a extracción asistida con ultrasonidos, con la mezcla 50:50 de los solventes agua destilada y etanol (96,6 %) en relación (1:10 w/v materia seca/solvente, 5g/50 mL), en un equipo de ultrasonidos modelo SB-300DTY de capacidad 10 litros a una frecuencia de 40 Khz y para un tiempo de 45 minutos (condiciones cercanas a las obtenidas en el capítulo anterior de maximización del ultrasonido), el extracto se centrifugó a 5500 rpm; al sobrenadante se le evaporó el solvente por destilación al vacío en un evaporador rotatorio y el extracto obtenido se guardó en refrigeración a -23°C hasta su posterior análisis.

Preparación de la muestra para cuantificación de los compuestos fenólicos (Clorogénicos y ácidos hidroxicinámicos) por HPLC-DAD

Aproximadamente 1.0 mL del extracto (muestra) fue desgasificado por sonicación y posteriormente centrifugado a 5500 rpm. Para la cuantificación por HPLC-DAD se realizó por triplicado sin dilución. La cuantificación y preparación de la muestra se realizó conforme a lo estipulado en el procedimiento operativo de la norma DIN 10767 de 1978.

Condiciones cromatográficas

El perfil cromatográfico se realizó en un HPLC-DAD de marca Agilent, equipado con una columna Zorbax Eclipse`Plus C18 (5,0mm x 150 mm 5-Micron) para separar los diferentes ácidos, el detector un SPD-M20A, una columna de horno CTO-20AC. Se utilizaron dos solventes para la fase móvil, Solvente A (10 mL H₃PO₄ al 85% de pureza, aforado a 1000 mL con Agua Milli-Q) Solvente B (acetonitrilo grado HPLC), eluidos en modo gradiente como se ve en la Tabla 44.

Tabla 44 Modo gradiente solvente fase móvil.

TIEMPO	SOLVENTE A	SOLVENTE B
0	90	10
20	80	20
25	70	30
35	60	40
40	60	40
50	90	10

El flujo se ajustó a 1mL/min y la detección se efectuó a 324 nm UV para los ácidos hidroxicinámicos y 325,4nm UV para los ácidos clorogénicos; el volumen de inyección que se

utilizó fue de 10 µL. La identificación de los picos de ácidos hidroxicinámicos se realizó por comparación con el tiempo de retención de los estándares inyectados así: 3,4 dihidrocinámico (ácido caféico) de pureza superior al 99 %; p-hidroxicinámico (ácido p-cumárico) de pureza superior al 98 %; 4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico), 99 % de pureza, 3,5 di-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinápico), 97 % y de los ácidos clorogénicos: ácido clorogénico (3CQ, 99%), ácido neoclorogénico (5CQ, 99,3%) , ácido criptoclorogénico (4CQ, 99,8 %), ácido 3,5-dicafeoilquinico (99,2 %) y ácido 4,5-dicafeoilquinico (98,2%) de la marcas biopurify y extrasinthese.

Curva de calibración

El análisis cuantitativo se realizó por el método de estándar externo y para ello se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de cada estándar, con el fin de expresar los resultados en términos de miligramos de analito por gramo de muestra, para lo cual se utilizó la Ecuación 23 según se muestra a continuación:

Ecuación 23 modelo de cálculo de compuestos fenólicos por HPLC DAD

$$\frac{mg \text{ analito}}{100 mL \text{ muestra}} = \left[\frac{\frac{ug}{mL} (Curva) * FD * 1mg}{1000 ug} \right] * 100$$

Dónde:

FD: factor de dilución/Para la muestra FD=1

Capacidad antioxidante ORAC

El análisis se realizó según el método por Ou et al. (2001) y modificado por (Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2004) para su realización en formato de micrométodo utilizando uno de 96 pozos. La medida de la Fluorescencia se llevó a cabo a intervalos de 1 minuto en un espectrofluorimetro Biotek empleando 485 y 520 nm como longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente, a una temperatura de 37°C durante 121 minutos. Los resultados fueron calculados empleando el software del equipo usando el área neta bajo la curva (AUC) de caída de la fluoresceína mediante la fórmula $AUC=1+f_{104}/f_0+f_{103}/f_0+\dots+f_1/f_0+\dots+f_0/f_0$.

Donde la f_0 es la lectura de fluorescencia a tiempo 0 min y f_i es la lectura de fluorescencia a tiempo i . Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y se empleó el extracto de pulpa de café bajo el mismo tratamiento mostrado en la metodología de este capítulo. Los resultados se expresan a partir de la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones en la que se utilizó el análogo soluble en agua de los polifenoles conocido como Trolox en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 μM , en buffer de fosfato 10Mm a pH 7,4.

Capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox (Ensayo TEAC)

La técnica consiste en observar la decoloración del radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ debido a la interacción con sustancias donantes de hidrógeno o de electrones. El radical es un cromóforo con un máximo de absorción a 415 nm y una serie máximos secundarios de absorción a 645, 660, 732, 815 y 820 nm y se genera por la reacción de oxidación del ABTS (2,2' ---azino--- bis--(3---etil benzotiazolin ---6--- sulfonato de amonio)) (3,5 mM). Para el desarrollo del método se

suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical $ABTS^{\bullet+}$ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde--azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el $ABTS^{\bullet+}$ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este. El ensayo TEAC presenta además variaciones en el modo mediante el cual se genera el radical catión $ABTS$. Principalmente se consideran dos modos.

La generación por reacciones enzimáticas, en las que el $ABTS$ se incuba con H_2O_2 y con metamioglobina, hemoglobina o peroxidasa de rábano, y la generación por reacciones químicas, en las que el $ABTS$ se hace reaccionar con dióxido de manganeso, persulfato potásico o cloruro de 2,2'---azo---bis---(2--- amidinopropano) (ABAP). Estas reacciones químicas por lo general requieren tiempos largos de incubación (16 horas en el caso del persulfato potásico) o altas temperaturas ($60^\circ C$ en el caso del ABAP). Para el caso de este protocolo se ha empleado la generación por reacción química con persulfato de potasio (1,25 mM) e incubación en la oscuridad por 24 horas. $ABTS$ (inoloro) $ABTS^{\bullet+}$ (verde) $ABTS^{\bullet+} + RH \rightarrow ABTS + R^{\bullet}$. Los resultados se expresan como valores TEAC mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de TROLOX®.

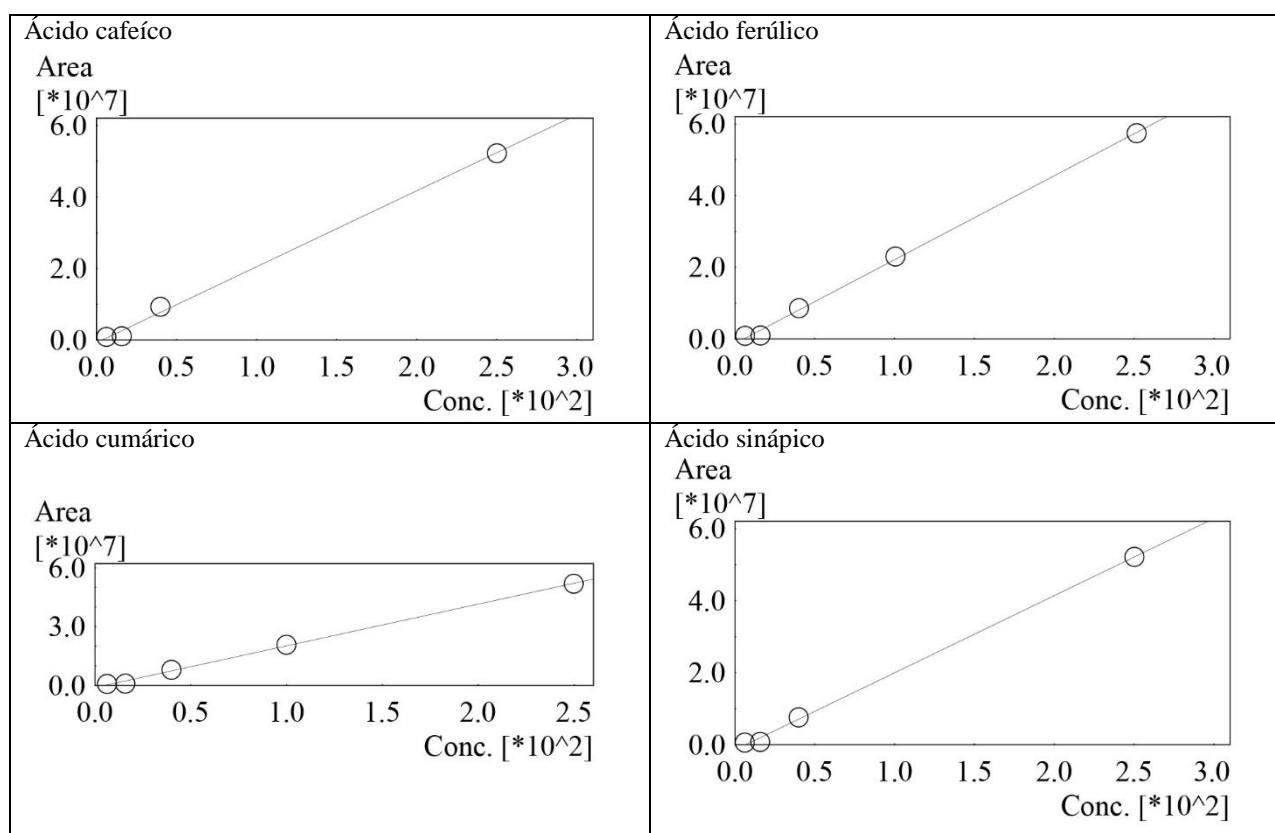
Resultados

Inicialmente se evaluó la composición de los ácidos hidroxicinámicos en el extracto de pulpa de café. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

Curvas de calibración de estándares de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos)

En el Gráfico 11 se observan las curvas de calibración obtenidas para los estándares: ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido sinápico arrojadas por el software del equipo HPLC-DAD.

Gráfico 11 Curvas de calibración estándares de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos)



En la Tabla 45 se pueden ver todos los parámetros correspondientes a las ecuaciones de la línea recta para cada uno de los analitos (estándares) corridos en el HPLC-DAD, de las curvas de calibración de los ácidos hidroxicinámicos.

Tabla 45 Parámetros de las curvas de calibración para los ácidos hidroxicinámicos

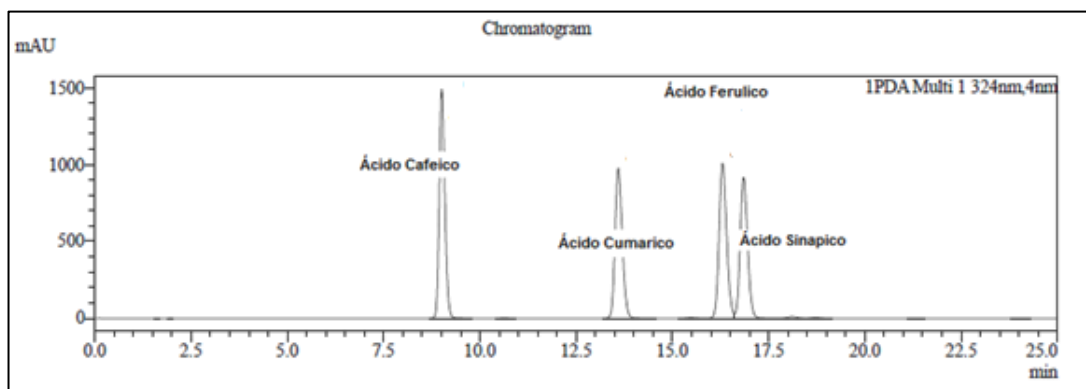
Analíto	Ecuación Lineal	r ²
Ácido Cafeico	Y=212489x - 788346	r ² =0,9972057
Ácido Cumárico	Y=212727x - 1,13247e+6	r ² =0,9984312
Ácido Ferúlico	Y=234195x - 1,32042e+6	r ² =0,9984393
Ácido Sinápico	Y=214106x - 1,48696e+6	r ² =0,9988727

En la tabla anterior se pueden ver las correlaciones obtenidas para cada uno de las curvas de calibración de los estándares, la cual fue superior al 99,7 %, lo que da confianza y valida los resultados obtenidos.

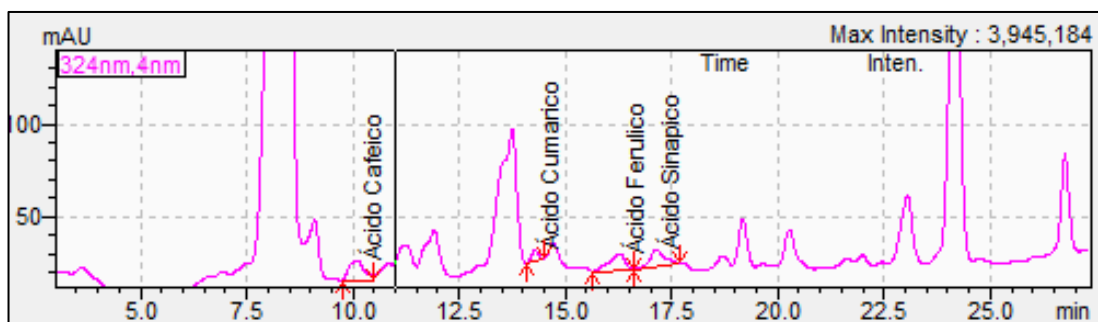
Análisis grafico de los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos) de la pulpa de café

Cromatogramas ácidos hidroxicinámicos: En el Gráfico 12 se pueden ver los cromatogramas correspondientes a la muestra de análisis del extracto de pulpa de café, aparece el mix de estándares en el grafico (a) y el correspondiente a la muestra de análisis pulpa de café en el grafico (b).

Gráfico 12 Cromatogramas comparativo entre una muestra de análisis (pulpa de café) (a) y el mix de estándares de ácidos hidroxicinámicos (b).



(a)



(b)

En razón a que los valores encontrados para los ácidos cinámicos fueron muy pequeños, fue necesario realizar una ampliación del cromatograma, el cual se puede ver en el anterior gráfico (b). Los compuestos no identificados corresponden a otros analitos presentes en pulpa de café como ácidos esterificados, prontocianidinas, clorogénicos, etc., que se obtienen en el mismo nivel de lectura de UV de 324 nm.

Tiempo de retención

En la Tabla 46 se ven los resultados obtenidos para el tiempo de retención de cada uno de los ácidos hidroxicinámicos evaluados, su orden de aparición fueron: ácido cumárico, ferúlico y sinápico, coincidiendo con lo reportado por otros autores (Balyay, K.J; Klifford, M.N. 1995, 348), (Clifford, M.N. ; Kazi, 1987, 55) y (María, C.B.A, 2004, 586).

Tabla 46 Tiempo de retención de los ácidos hidroxicinámicos evaluados para extracto de pulpa de café

N. Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)
1	Ácido Cafeico	10,580
2	Ácido Cumárico	14,688
3	Ácido Ferúlico	16,887
4	Ácido Sinápico	17,188

Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos de la pulpa de café

En la Tabla 47 se observan los valores cuantificados promedios para los diferentes ácidos hidroxicinámicos mediante HPLC-DAD. Los cuales se han obtenido reemplazando el área bajo la curva en la ecuación de cada curva de calibración y luego con la ecuación 23 se ha calculado la cantidad en mg analito/100ml expresados en ppm de cada analito, correspondiendo a una sola muestra para tres corridas en el equipo (n).

Tabla 47 Cuantificación de los compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos) en extracto de pulpa de café.

Compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos)	n	Extracto pulpa de café	
		ppm	±SD
Ácido ferúlico	3	75,70	0,003
Ácido cafeico	3	57,42	0,003
Ácido cumárico	3	63,74	0,003
Ácido sinápico	3	90,71	0,006

En la tabla anterior, todos los ácidos hidroxicinámicos de la muestra estuvieron por debajo de 100 ppm, siendo el sinápico el de mayor cantidad con 90,71 ppm y el de menor cantidad el ácido cafeico con 57,42 ppm.

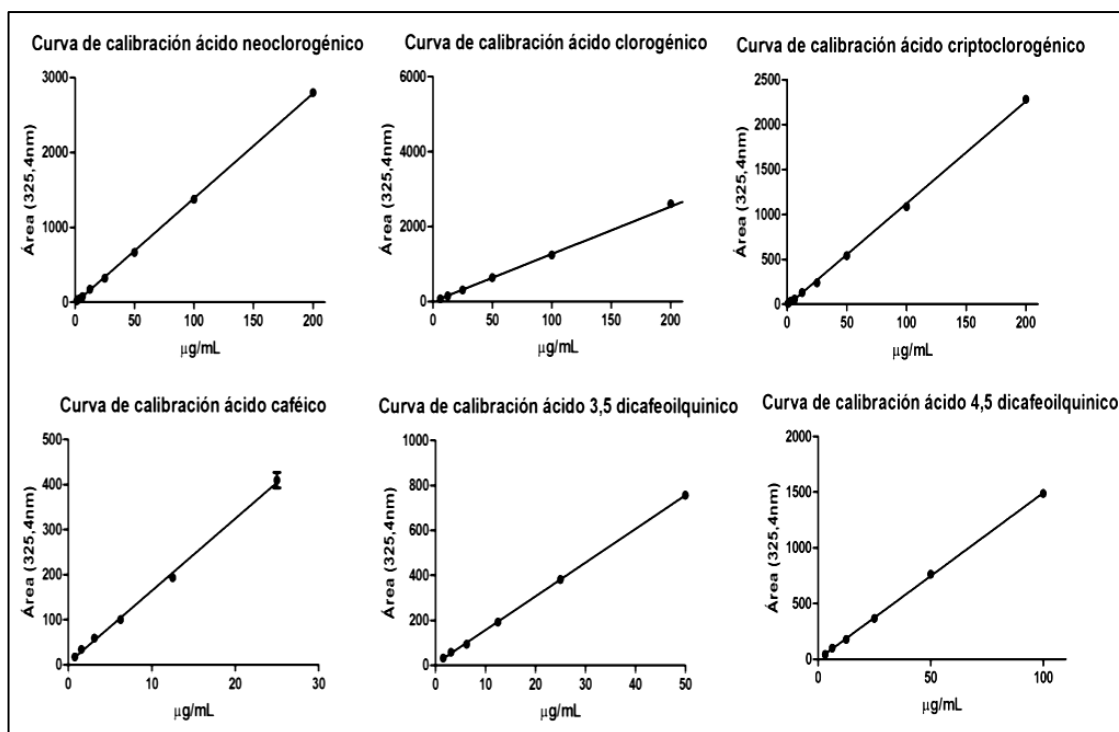
En el Grafico 12 Se observa que con el aumento en la imagen del cromatograma persiste la baja resolución en los picos correspondientes a los ácidos evaluados, ello posiblemente se deba a la baja cantidad en ppm del analito y de otra parte porque aparecen otros compuestos fenólicos de mayor cantidad que hacen que la resolución de los de menor no sea clara; lo anterior posiblemente se deba a los ácidos clorogénicos que también se leen a 324 nm UV y que están presentes en pulpa de café.

Dado lo anterior se realizó otra evaluación de la composición de compuestos fenólicos en pulpa de café, pero esta vez centrados en los ácidos clorogénicos de acuerdo a los estándares disponibles en el mercado local. A continuación se consigna la evaluación de estos ácidos siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

Análisis gráfico de la curva calibración para estándares de compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos)

En el Gráfico 13 se observan las curvas de calibración obtenidas para los estándares: ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ácido criptoclorogénico, ácido cafeico, ácido 3,5-dicafeoilquinico y ácido 4,5-dicafeoilquinico, entregadas por el software del equipo HPLC-DAD.

Gráfico 13 Curvas de calibración de los estándares de compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos)



En la Tabla 48 se pueden ver todos los parámetros correspondientes a las ecuaciones de la línea recta para cada uno de los analitos (estándares) corridos en el HPLC-DAD, de las curvas de calibración de los ácidos clorogénicos.

Tabla 48 Datos de la curva de calibración estándares de ácidos clorogénicos

Parámetro	Ácido neoclorogénico	Ácido clorogénico	Ácido criptoclorogénico	Ácido cafeico	Ácido 3,5-dicafeoilquinico	Ácido 4,5-dicafeoilquinico
Rango dinámico (µg/mL)	6.25-200	1.5625-400	6.25-200	0.78125-25	1.5625-50	6.25-100
Pendiente	14.01±0.1167	12.66±0.07455	11.37±0.1042	16.01±0.3970	14.98±0.1087	14.93±0.1257
Y- intercepto	-12.35±9.529	5.890±13.01	-15.76±8.019	4.292±4.811	7.217±2.561	0.8319±5.923
X-intercepto	0.8815	-0.4654	1.386	-0.2681	-0.4816	-0.05570
Intervalo de confianza 95%						
Pendiente	13.77 a 14.25	12.50 a 12.81	11.16 a 11.59	15.16 a 16.86	14.75 a 15.22	14.67 a 15.20
Y- intercepto	-32.11 a 7.414	-21.35 a 33.13	-32.28 a 0.7572	-5.961 a 14.54	1.788 a 12.65	-11.72 a 13.39
X-intercepto	-1.246 a 2.980	-3.646 a 2.680	-0.8400 a 3.581	-1.187 a 0.6015	-1.006 a 0.03440	-1.265 a 1.133
Bondad de ajuste						
r²	0.9985	0.9993	0.9979	0.9909	0.9992	0.9989
Sy.x	36.99	45.34	34.06	13.99	7.800	18.4

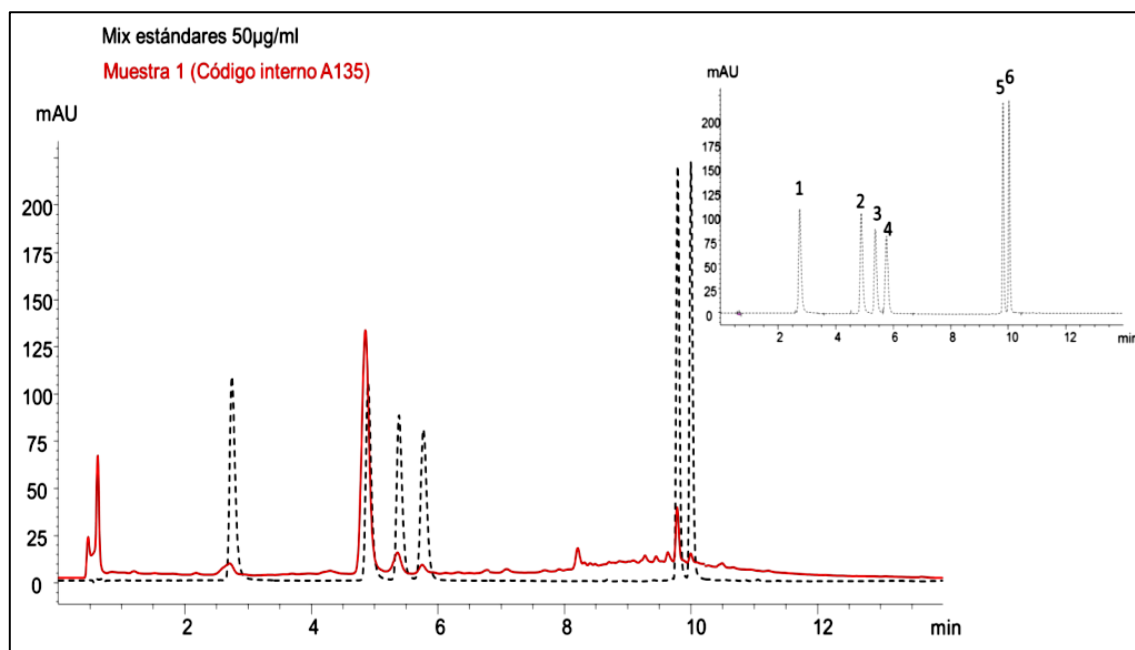
De acuerdo a la Tabla 48 el coeficiente de correlación r^2 para cada uno de los analitos estuvo por encima del 99,09 %, indicando una alta correlación entre los µg/mL versus el área de la curva leída a 325,4 nanómetros, lo que indica la validez de los datos obtenidos.

Análisis gráfico de los cromatogramas representativos de los ácidos clorogénicos

Se logró la separación cromatográfica de los diferentes ácidos clorogénicos contenidos en el extracto de pulpa de café y se obtuvo los cromatogramas correspondientes con sus respectivos picos de resolución, las interferencias en la línea base fue de tipo medio. A continuación se relacionan los cromatogramas obtenidos para los ácidos clorogénicos:

En el Gráfico 14 se pueden ver los cromatogramas correspondientes a la muestra de análisis del extracto de pulpa de café, aparece en línea roja el cromatograma correspondiente a la muestra y en color negro el cromatograma correspondiente al mix de estándares a 50 ug/mL.

Gráfico 14 Cromatograma comparativo entre una muestra de análisis (pulpa de café) y el mix de estándares de ácidos clorogénicos.



Mix de estándares 50 ug/ml: ácido neoclorogénico (1), ácido clorogénico (2), ácido criptoclorogénico (3), ácido cafeico (4), ácido 3,5-dicafeoilquinico (5) y ácido 4,5-dicafeoilquinico (6).

Cuantificación de los compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos) en extracto de pulpa de café

La cuantificación de los ácidos clorogénicos (ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ácido criptoclorogénico, ácido cafeico, ácido 3,5-dicafeoilquinico y ácido 4,5-dicafeoilquinico) corridos por HPLC-DAD, se llevó a cabo mediante el reemplazo del área arrojada por el software correspondiente del equipo, en la ecuación de la línea recta correspondiente para cada uno de los estándares (ver Tabla 48), luego con este valor obtenido (ug analito/ml) se reemplazó en la ecuación 23 expresando los resultados obtenidos por cada analito en ppm, teniendo presente la concentración de la muestra. En la tabla 49 se observan los valores obtenidos para los diferentes ácidos clorogénicos mediante HPLC-DAD.

Tabla 49 Cuantificación de los compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos) en extracto de pulpa de café.

Compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos)	n	Extracto pulpa de café	
		ppm	±SD
Ácido neoclorogénico (5CQ)	3	72,85	0,002
Ácido clorogénico (3CQ)	3	971,28	0,02
Ácido criptoclorogénico (4CQ)	3	117,31	0,003
Ácido cafeico	3	24,97	0,003
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	3	265,51	0,003
Ácido 4,5-dicafeoilquinico	3	52,55	0,006

En la tabla anterior se pueden observar los resultados de la concentración de ácidos clorogénicos presentes en la pulpa de café, resalta el ácido clorogénico con un valor de 971,28

ppm, siendo el ácido más alto, le sigue en orden de importancia el Ácido 3,5-dicafeoilquínico con 265,51 ppm, el Ácido criptoclorogénico con 117,31 ppm y el resto de ácidos cuantificados presentaron valores menores a 72,85 ppm.

Parámetros sobre la calidad del método analítico empleado en los análisis de los ácidos clorogénicos.

Selectividad

La selectividad (Sogorb S. & Vilanova G., 2004) es una propiedad deseable en los detectores de HPLC, un detector selectivo es aquel que permite ver solo un componente de interés a pesar de que coeluya con otros. Para este caso la selectividad de los estándares fue buena para los ácidos hidroxicinámicos de acuerdo al Gráfico 11 (a), sin embargo esta selectividad disminuye en la muestra problema analizada de acuerdo al gráfico (b), y es debida a la alta concentración de analitos desconocidos *versus* la concentración muy pequeña de los ácidos hidroxicinámicos. De otra parte la selectividad para los ácidos clorogénicos fue muy buena tanto para los estándares como para la muestra de estudio la cual se puede observar en el Gráfico 13. Ello se debe en buena parte al detector empleado (DAD), el cual permite fijar la longitud de onda adecuada.

Sensibilidad

En cuanto a la sensibilidad una cualidad importante de los HPLC, es descrita como la capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. (Sogorb S. & Vilanova G., 2004). El detector SPD-M20A utilizado en este análisis alcanza niveles de

sensibilidad cercano a los detectores UV-Vis más avanzadas, tiene un modo de alta sensibilidad con un ancho de ranura de 8 nm., el uso de compensación de luz de fuente, ofrece un nivel de ruido de $0,6 \times 10^{-5}$ UA. Esto se comprueba observando en la Tabla 45 y 48 chequeando la pendiente de los analitos corridos para los ácidos cinámicos y los clorogénicos respectivamente, a mayor pendiente mayor sensibilidad del lector, en la Tabla 45 se puede ver de mayor a menor la pendiente así: ácido ferúlico, sinápico, cumárico y cafeico y en la Tabla 49 ácido cafeico, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-dicafeoilquinico, ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico.

Linealidad

Se considera lineal si la diferencia de respuesta entre dos concentraciones de un compuesto es proporcional a la diferencia entre las concentraciones. Bajo las condiciones descritas del ensayo en la metodología se obtuvo una relación lineal entre la concentración de los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos clorogénicos y la absorbancia UV a 324 nm y 325,4 respectivamente, se obtuvieron los coeficientes de correlación para cada curva estándar que invariablemente superó un r^2 de 0,99 para todos los ácidos hidroxicinámicos identificados, los resultados se pueden ver en la Tabla 45 y en el Gráfico 11 y para los ácidos clorogénicos se pueden ver en Tabla 48 y el Gráfico 13.

Límite de detección y cuantificación

El valor mínimo de analito que es capaz de detectar el HPLC y el de cuantificación se calcularon basándose en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente de las curvas de calibración para los ácidos cafeico, p-cumárico, ferúlico y cumárico.

Límite de detección: se calcula con la curva de calibración realizada para cada ácido hidroxicinámico:

$$LOD = \frac{3 (\text{pendiente})}{\text{Intercepto}}$$

De esta misma forma es posible determinar el **Límite de cuantificación** para cada analito donde la curva de calibración continua siendo lineal. Aplicando la siguiente ecuación:

$$LOC = \frac{10 (\text{pendiente})}{\text{Intercepto}}$$

Dando como resultado:

Tabla 50 Límites de detección y límites de cuantificación

Analíto	Pendiente	Intercepto	LDM	LCM
Ácido Cafeico	212489	788346	0,807	2,695
Ácido Cumárico	212727	1,13247e+6	0,564	1,878
Ácido Ferúlico	234195	1,32042e+6	0,532	1,774
Ácido Sinápico	214106	1,48696e+6	0,432	1,440
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	14,98	0,4816	93	311,05
4,5-dicafeoilquinico	14,93	0,0557	804.13	2680
Neoclorogénico	14,01	0,8815	47,68	158,93
Clorogénico	12,66	0,4654	81,61	272,02
Criptoclorogénico	11,37	1,386	24,61	82,03

Idoneidad del método

Durante todo el estudio, tanto para la obtención del extracto de pulpa de café, así como para la idoneidad del sistema cromatográfico se realizó el monitoreo respectivo, la norma DIN 10767 empleada en esta investigación, se viene aplicando con bastante confiabilidad desde hace

más de veinte años en los análisis correspondientes para el café, en el centro de investigaciones de Cenicafé por la doctora Gloria Inés Puerta, a quien se contactó personalmente para la discusión acerca de la aplicación de este método (Puerta, 2014). Los parámetros cromatográficos como la resolución, la selectividad, fue satisfactoria para los compuestos analizados.

Precisión

La precisión del método analítico se evaluó midiendo el área para cada pico cromatográfico correspondiente a los ácidos evaluados, tres (3) veces sobre la misma muestra. El coeficiente de variación (RSD%) fue como se observa en la Tabla 51 que oscila desde un 0,0155 (A. cafeico) hasta un máximo de 0,0437 (A. ferúlico). Se tiene así una muy buena precisión en el método de análisis con HPLC.

Tabla 51 Análisis de la precisión del método cromatográfico

Área bajo la curva				
No repeticiones	A. Cafeico	A. Cumárico	A. Ferúlico	A. Sinápico
1	285328,0000	54429,0000	241813,0000	208975,00
2	276988,0000	58459,0000	239526,0000	219708,00
3	283419,0000	58035,0000	222995,0000	221237,00
DESVIACIÓN	4369,5469	2214,4944	10268,2476	6681,9630
PROMEDIO	281911,667	56974,333	234778,000	216640,000
%cv	1,55%	3,89%	4,37%	3,08%

%cv: coeficiente de variación

En la tabla anterior se puede ver el coeficiente de variación el cual fue inferior al 1% en todos los casos.

Capacidad antioxidante extractos pulpa de Café

Análisis gráfico de las curvas de calibración medición actividad antioxidante ORAC y TEAC-ABTS

Las ecuaciones de las rectas encontradas para las curvas de calibración del método ORAC se pueden ver en el Gráfico 15 y la Tabla 52 y para ABTS se observan en el Gráfico 16 y la Tabla 53.

Gráfico 15 Curva calibración para el método ORAC

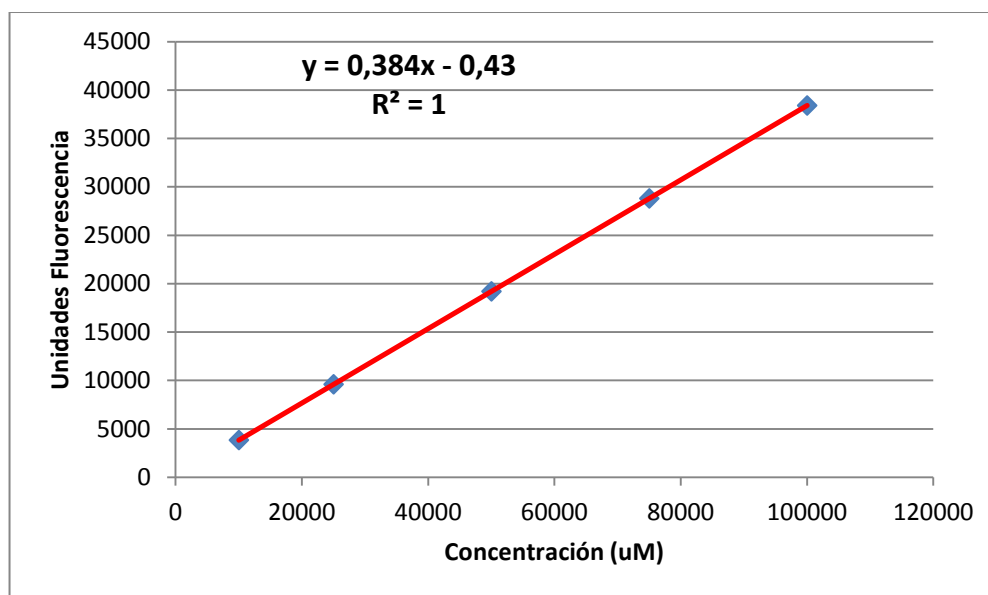


Tabla 52 Ecuación de la línea recta para la curva calibración ORAC

Nombre Curva	Formula	A	B	R ²
Trolox	Y=A*X + B	0,384	-0,43	1

Gráfico 16 Curva calibración TEAC ABTS

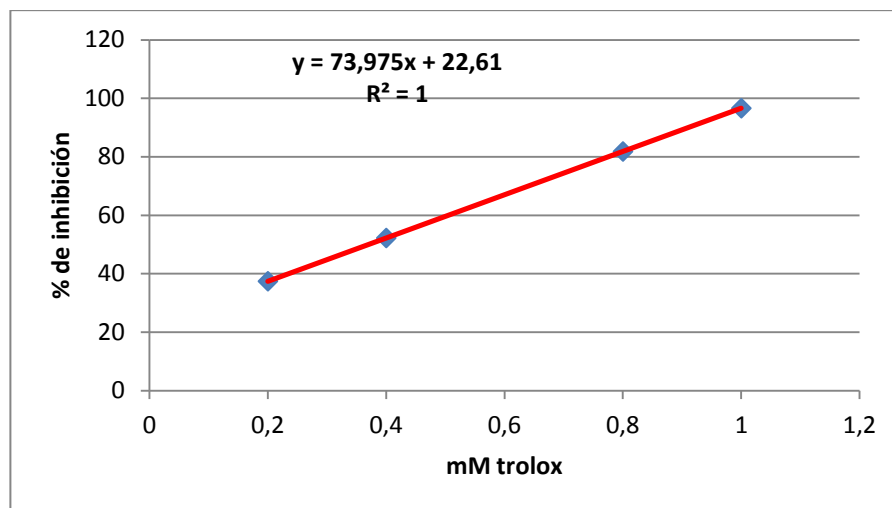


Tabla 53 Curva calibración TEAC ABTS

Nombre Curva	Formula	A	B	R ²
Estándar	$Y=A*X + B$	73,975	22,61	1

Se puede ver en el Gráfico 15 y el Gráfico 16 que las curvas de calibración presentaron una alta linealidad con un r^2 de 1, para ambos métodos de medición de actividad antioxidante. De esta manera las curvas de calibración elaboradas se ajustan a los siguientes criterios: tienen un comportamiento lineal y la respuesta es directamente proporcional a las concentraciones utilizadas, lo que permite realizar la interpolación para encontrar los valores de la actividad correspondiente para cada uno de los ensayos aplicados al extracto de pulpa de café con bastante precisión.

Cuantificación de la actividad antioxidante en extracto de pulpa de café

Cuantificación método ORAC: En la Tabla 54 se presentan los resultados obtenidos para el análisis de la actividad antioxidante en extracto de pulpa de café medida por el método de ORAC.

Tabla 54 Actividad antioxidante ORAC

Actividad antioxidante (valor ORAC)					
Id muestra	Muestra	Resultados mg TE/ml	Promedio	Desv. Std	Cv%
1	Extracto pulpa de café	6244	6426 mg TE/ml	231,2	3,6
2		6752			
3		6281			

TE: Trolox equivalente

El promedio encontrado fue de 6426 mg TE/100 ml, presento una desviación estándar de 231,2 y un coeficiente de variación de 3,6 menor al 5% que es lo recomendado para este tipo de análisis.

Cuantificación TEAC ABTS: En la Tabla 55 se presentan los resultados obtenidos para el análisis de la actividad antioxidante en extracto de pulpa de café medida por el método de TEAC ABTS.

Tabla 55 Actividad antioxidante TEAC ABTS

Actividad antioxidante (valor TEAC-ABTS)					
Id muestra	Muestra	Resultados mg te/ml	Promedio	Desv. Std	Cv%
1	Extracto pulpa de café	10761,51	11010,55 mg TE/ml	219	2

Actividad antioxidante (valor TEAC-ABTS)					
Id muestra	Muestra	Resultados mg te/ml	Promedio	Desv. Std	Cv%
2		10974,97			
3		11295,17			

TE: Trolox equivalente

El promedio encontrado fue de 11010,55 mg TE/100 ml, presento una desviación estándar de 219 y un coeficiente de variación de 2,0 menor al 5% que es lo recomendado para este tipo de análisis.

Discusión

En relación a la evaluación de la composición de los compuestos fenólicos de la pulpa de café mediante HPLC-DAD, las investigaciones han sido muy pocas y las condiciones han variado ampliamente en lo concerniente al solvente empleado en la preparación de la muestra, los más comunes han sido: agua, etanol, metanol y hexano y en ninguna hasta la fecha se ha reportado el uso del ultrasonido. Esto de alguna manera es una restricción por cuanto la comparación en relación uno a uno es muy difícil de establecer. A continuación se realiza un análisis con aquellos estudios que reportan también valores para los ácidos aquí evaluados.

En relación a la evaluación de los ácidos hidroxicinámicos en pulpa de café el autor que más ha investigado la composición de la pulpa de café por HPLC ha sido Ramírez, el primer estudio lo realizo en el año de 1988 sobre los componentes fenólicos en pulpa de café y el segundo estudio lo realizo en el año 2007, lo importante de resaltar es que el autor logró cuantificar en pequeñas concentraciones los ácidos cinámicos y también algunos clorogénicos; la

tendencia en sus investigaciones mostró siempre un valor alto en los clorogénicos y un valor muy bajo en los ácidos hidroxicinámicos (Ramirez Martinez, 1988), (Ramírez Coronel et al., 2007) no reporto datos para los hidroxicinámicos cuando utilizó solamente agua para su extracción y encontró además que son altamente solubles en metanol; tendencia que en este trabajo de investigación también se mantuvo, sin embargo es de resaltar que se logró mediante la mezcla del agua con etanol extraer ácidos hidroxicinámico, algo que no logro Ramírez con agua.

Otro autor que también ha estudiado estos compuestos es (Arellano Gonzalez et al., 2011). En el año 2011 logró identificar y cuantificar los ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café, empleando como solvente metanol acuoso y acetato de etilo, con este último obtuvo las mayores concentraciones promedio en comparación con el metanol acuoso, la preparación de la muestra fue realizada con hexano, los valores reportados por este autor son consecuentes con los valores encontrados por Ramírez (metanol) y también con los valores encontrados en este trabajo de investigación, ver tabla 9 del marco teórico.

Un aspecto importante a resaltar es que el mejor solvente para extraer estos compuestos es el metanol, hecho confirmado por los autores anteriores y también por el estudio presente; en cuanto al solvente agua el autor Ramírez no logro cuantificar cinámicos pero si clorogénicos esta tendencia fue mejorada en este proyecto de investigación ya que se logró con la mezcla agua etanol extraer ambos compuestos fenólicos (Hidroxicinámicos y Clorogénicos). Lo que es muy significativo, porque el empleo del ultrasonido favoreció la penetración del solvente para la extracción de estos compuestos.

En relación a la actividad antioxidante encontrada en este trabajo de investigación para pulpa de café, lo ideal sería medir la actividad antioxidante de cada componente de la muestra

por separado, debido a la complejidad de la muestra, la actividad antioxidante se realizó por métodos generales como ORAC y por TEAC ABTS los valores encontrados fueron (6426 mg TE/g) y (11010,55 mg TE/g) respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la pulpa de café tiene una capacidad antioxidante considerable en comparación con otros materiales orgánicos, por ejemplo si se compara con la base de datos de la USDA, (Haytowitz & Bhagwat, 2010) también están en correspondencia con los valores encontrados por (Baggio et al., 2007).

Conclusiones

Se logró identificar en el extracto de pulpa de café los ácidos hidroxicinámicos: caféico, cumárico, ferúlico y sinápico, al igual que los ácidos clorogénicos: ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-dicafeoilquinico, ácido neoclorogénico 5CQ, ácido clorogénico 3CQ, ácido criptoclorogénico 4CQ).

De todos los ácidos encontrados mediante el HPLC-DAD, se destaca la concentración del ácido clorogénico que en relación al resto de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos tuvo una concentración mayor.

En este capítulo del trabajo de investigación se logró establecer que los ácidos clorogénicos se presentan en mayor cantidad en la pulpa de café en comparación con los ácidos hidroxicinámicos que fueron menores.

Conclusión general

En el desarrollo de este trabajo de investigación se logró encontrar que las mejores condiciones de la extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de la pulpa de café (*coffea arabica* L.) variedad Castillo, se logran con una frecuencia de 45,54 Khz y con 47,5092 Khz para el modelo completo y el reducido respectivamente, con un tiempo de 45 minutos, empleando la mezcla de agua etanol al 50 %, el valor máximo que se obtendría de fenoles totales sería de **6313,31** mg AGE/100 g muestra seca y de **6335,67** mg AGE/100 g muestra respectivamente.

También se logró identificar mediante HPLC-DAD los principales compuestos fenólicos contenidos en el extracto de pulpa de café, específicamente los ácidos hidroxicinámicos en concentraciones pequeñas (cafeico, cumárico, sinápico y ferúlico), así como los principales ácidos clorogénicos (ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-dicafeoilquinico, ácido neoclorogénico 5CQ, ácido clorogénico 3CQ, ácido criptoclorogénico 4CQ) siendo el de mayor concentración el ácido clorogénico 3CQ.

Sumado a lo anterior se encontró una alta actividad antirradical in vitro del extracto de pulpa de café, por el método ORAC se obtuvo un valor de 6426 mg TE/g y por el método TEAC ABTS un valor de 11010,55 mg TE/g.

Aporte del trabajo de investigación

Este trabajo de investigación que tuvo como propósito encontrar las mejores condiciones para la extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de la pulpa de café, es el primero que se hace, teniendo presente que no se encontraron artículos en este sentido en las principales bases de datos consultadas.

A partir de la linealización del modelo empírico de Rosin- Rammler (R-R) sobre la distribución de tamaños de partículas, se ha logrado encontrar un modelo con un r^2 de 0,99 el cual tiene la capacidad de representar la distribución granulométrica de las partículas de pulpa de café, obtenida mediante su molido en un molino de discos. Este tipo de análisis y modelamiento de la granulometría en pulpa de café es el primero que se hace.

A partir del análisis de varios estudios ya realizados en pulpa de café, se ha comprobado que los ácidos hidroxicinámicos son altamente solubles en metanol, ello se corroboró en uno de los objetivos aquí planteados arrojando un resultado de 6967,213 mg AGE /100 gr muestra seca. En este sentido hubo un aporte importante al lograr que con la mezcla agua etanol al 50:50 % y bajo las condiciones descritas de extracción asistida por ultrasonido, se lograría un valor teórico cercano de 6313,31 mg AGE/100 g muestra seca y de 6335,67 mg AGE/100 g muestra para el modelo reducido; siendo solventes aceptados en la industria de alimentos.

El desarrollo de un posible ingrediente rico en compuestos fenólicos a partir del principal subproducto de la industria del café, abre las puertas para posibles aplicaciones en la industria de los alimentos y/o farmacéutica en el futuro.

Futuras líneas de investigación

El elevado contenido en ácidos clorogénicos y la facilidad con la cual se obtiene, coloca a este subproducto en vías de su utilización, mediante enzimas de tipo hidrolasas los cuales pueden ser biotransformados en aromas y antioxidantes cuyas propiedades farmacéuticas y por sus aplicaciones en la industria de los alimentos son ampliamente reconocidos.

Realizar una experimentación en base al camino de máximo ascenso para una frecuencia de 48,5 KHz y un tiempo de 108 minutos, para comprobar una posible extracción de 14952,8 mg AGE/100 g muestra seca.

Escalar la extracción de compuestos fenólicos de pulpa de café mediante extracción asistida por ultrasonido, a escala semiindustrial.

A partir de la mejor condición de extracción de compuestos fenólicos de pulpa de café, realizar una microencapsulación con aplicación en alguna matriz alimentaria para medición de actividad antioxidante y de vida útil.

Referencias bibliográficas

- A.O.A.C. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC international. *AOAC Official Methods*, 18.
- Adebowale, B. A., Ogunjobi, M. K., Olubamiwa, O., & Omidiran, V. A. (2012). Quality improvement and value addition of processed fish (*Clarias gariepinus*) using phenolic compounds in coffee pulp smoke. *Journal of the Agriculture Science and Soil Science*, 2(December), 520–524.
- Anabella, V., Joachin, G., & Brossini, R. (2009). Fibra pulp Coffee. *Revista de La Universidad Del Valle de Guatemala*, 19, 58–65.
- Arellano González, M. A., Ramírez Coronel, M. A., Torres Mancera, M. T., Pérez Morales, G. G., & Saucedo Castañeda, G. (2011). Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), 374–378.
- Arellano Gonzalez, M. A., Ramírez Goronel, M. A., Torres Mancera, M. T., Pérez Morales, G. G., & Saucedo Castañeda, G. (2011). Antioxidant Activity of Fermented and Nonfermented Coffee (*Coffea arabica*) Pulp Extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), 374–378.
- Ashokkumar, M. (2014). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.012>
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología En Marcha*, 20(4), 30–40. <http://doi.org/ISSN:0379-3962>
- Baggio, J., Lima, A., & Mancini, J. (2007). Identification of phenolic acids in coffee (*Coffea arabica* L .) dust and its antioxidant activity. *J. Food Sci.*, 19, 191–202.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bitra, V. S., Womac, A. R., Yang, Y. T., Miu, P. I., Igathinathane, C., & Sokhansanj, S. (2009). Mathematical model parameters for describing the particle size spectra of knife-milled corn stover. *Biosystems Engineering*, 104(3), 369–383. <http://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.08.007>
- Blandon Castaño, G., Davila Arias, M. T., & Rodriguez Valencia, N. (1999). Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago. *Avance Tecnico*, 50(1), 5–23.
- Boettler, U., Sommerfeld, K., Volz, N., Pahlke, G., Teller, N., Somoza, V., ... Marko, D. (2011). Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(5), 426–440. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.03.011>
- Bressani, R. (1979). *Coffee pulp: composición, technology and utilization*.
- Casazza, A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50–55. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.026>

- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–835. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(1), 48–54. <http://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, *46*(2), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee, *18*(1), 23–36.
- Ferrer, J. R., Páez, G., Chirinos, M., & Mármol, Z. (1995). Silage of coffee pulp. *Revista Facultad de Agronomía*, (920), 417–428.
- Fujiwara, M., Dohi, M., Otsuka, T., Yamashita, K., & Sako, K. (2012). Evaluation of Models for Predicting Spray Mist Diameter for Scaling-Up of the Fluidized Bed Granulation Process. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *60*(11), 1380–1386. <http://doi.org/10.1248/cpb.c12-00432>
- García, M., Cuerda Correa, E. M., & Díaz Díez, M. (2004). Application of the Rosin-Rammler and Gates-Gaudin-Schuhmann models to the particle size distribution analysis of agglomerated cork. *Materials Characterization*, *52*(2), 159–164. <http://doi.org/10.1016/j.matchar.2004.04.007>
- Gimenes, M. L., & Mendes, E. S. (2000). Linearização do modelo log-normal para distribuição de tamanho de partículas. *Acta Scientiarum*, *22*(5), 1235–1239.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., & Cusido, R. (2013). Natural Products. (K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon, Eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>
- González Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(6), 2176–2184. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021>
- Guerrero A., G., Suarez, M., & Moreno Ruiz, G. (2003). Derivados hidroxycinámicos para la discriminación de genotipos de café, *54*(3), 234–241.
- Guevara Barreto, R. A. (2005). Caracterización granulométrica del café colombiano tostado y molido. *Avance Técnico Cenicafé*, *56*(1), 5–18.
- Häkkinen, S. (2000). *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. (U. of Kuopio, Ed.). Finland.
- Hamidi, A. el. (1963). The Distribution Pattern of chlorogenic acid and caffeine in *coffea arabica*. *Planta*, *61*, 6.
- Haytowitz, D., & Bhagwat, S. (2010). USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. *US Department of Agriculture*, 10 – 48. <http://doi.org/http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Hernandez, C. E., Chen, H.-H., Chang, C.-I., & Huang, T.-C. (2009). Direct lipase-catalyzed lipophilization of chlorogenic acid from coffee pulp in supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, *30*(3), 359–365. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.004>
- ICONTEC. (1996). Método para la determinación del tamaño de partícula (NTC 2441).

- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Chlorogenic Acid Is Absorbed in Its Intact Form in the Stomach of Rats. *American Society for Nutrition*, (December 2005).
- Larrea Posadas, J. (2012). *Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. Tesis Fin de Master*. Retrieved from <http://academica-e.unavarra.es/handle/2454/6531>
- Lasallista, C. U. (2015). Guías bromatológicas.
- Londoño, L. J. (2011). Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad. In L. F. G. Giraldo (Ed.), *Desarrollo y transversalidad* (pp. 129–162). Itagui Colombia.
- López, T., Prado-Barragán, a., Nevárez-Moorillón, G. V., Contreras, J. C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2013). Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido. *CyTA - Journal of Food*, 11(4), 359–365. <http://doi.org/10.1080/19476337.2013.773563>
- Lourdes, M. De, & Giada, R. (2013). Food Phenolic Compounds : Main Classes , Sources and Their Antioxidant Power (p. 26).
- Luengo, E., Condón Abanto, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Separation and Purification Technology*, 136, 130–136. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.008>
- Machado, E. M. S., Rodriguez-Jasso, R. M., Teixeira, J. a., & Mussatto, S. I. (2012). Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 87–90. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2011.10.007>
- Marín García, C., & Puerta Quintero, G. I. (2008). Contenido de ácidos clorogénicos en granos Coffea Arábica y C. Canephora, según el desarrollo del fruto. *Avance Tecnico*, 59(1), 7–28.
- Marín López, S. M., Arcila Pulgarín, J., Montoya Restrepo, E. C., & Oliveros Tascón, C. E. (2003). Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café (. *Revista Avance Técnico Cenicafé*, 54(3), 208–225.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. a. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365–73. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>
- Monroy vázquez, A., Totosaus, A., Rodrigo, L., González, G., Angélica, K., & Fuente, D. (2007). Antioxidantes I . Chile ancho (*Capsicum annum* L . *grossum* sendt .) y romero (*Rosmarinus officinalis* L .) como fuentes naturales de antioxidantes. *Ciencia Y Tecnología*, 6, 112–116.
- Montilla Pérez, J., Arcila Pulgarín, J., Aristizábal Loaiza, M., Montoya Restrepo, E. C., Oliveros Tascón, C. E., Puerta Quintero, G. I., & Cadena Gómez, G. (2008). Propiedades físicas y

- factores de conversión del café en el proceso de beneficio. *Revista Avance Tecnico Cenicafé*, 370, 8.
- Moure, Á., Cruz, J. M., Franco, D., Domôânguez, J. M., Sineiro, J., Domôânguez, H., ... Parajo, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72.
- Murthy, P. S., Manjunatha, M. R., Sulochannama, G., & Naidu, M. M. (2012). Extraction , Characterization and Bioactivity of Coffee Anthocyanins. *European Journal of Biological Sciences*, 4(1), 13–19. <http://doi.org/10.5829/idosi.ejbs.2012.4.1.6149>
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2010). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 897–903. <http://doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z>
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition. *Resources, Conservation & Recycling*, 66, 45–58. <http://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2012). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Agricultural Food Chemistry*, 60, 8.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661–672. <http://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>
- Nampoothiri, K. M., Favela-torres, E., Aguilar, N., & Saucedo-castan, G. (2014). Soluble and Bound Hydroxycinnamates in Coffee Pulp (Coffea arabica) from Seven Cultivars at Three Ripening Stages. *Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7.
- Naso, L. G., Lezama, L., Rojo, T., González Baróa, A. C., Williams A.M., P., & G.Ferrer, E. (2011). Efectos antioxidantes del ácido clorogénico y su complejo con el catión oxovanadio (IV). *Centro de Química Inorganica*, 2(Iv), 7.
- Nojavan, S., Gorji, T., & Hossiny Davarani, Saied Saeed Morteza Najarian, A. (2014). Solvent selection in ultrasonic-assisted emulsification microextraction: Comparison between high- and low-density solvents by means of novel type of extraction vessel. *Analytica Chimica Acta*, 838, 51–57. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.004>
- Oliveros Tascón, C. E., Sanz Uribe, J. R., Ramírez Gomez, C. A., Alvarez Hernández, J. R., Roa Mejía, G., & Alvarez Gallo, J. (1995). Desmucilaginosos mecánicos de café. *Avance Técnico 0217*. Retrieved from <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0217.pdf>
- Oliveros Tascon, C., & Gonzalo Roa, M. (1999). *Beneficio Ecológico del café*.
- Oliveros, T., C. E., Sanz, U., J. R., Ramírez, G., C. A., & Tibaduiza, V., C. A. (2013). ECOMILL ® Tecnología de bajo impacto ambiental para el lavado del café. *Avance Tecnico*, 8.
- Orozco, A. L., Pérez, M. I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Vila, F. J., ... Arias, M. E. (2008). Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 81(2), 247–252. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2007.12.002>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Radjiskumar, M., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 153–162. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959086>

- Panusa A, Zuorro A, Lavecchia R, Marrosu G, P. R. (2013). Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Agricultural Food Chemistry*, 61, 8.
- Paur, I., Balstad, T. R., & Blomhoff, R. (2010). Degree of roasting is the main determinant of the effects of coffee on NF- κ B and EpRE. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(9), 1218–1227. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.005>
- Pérez M., G. G., Ramírez C., A., Guzmán .L, O., Cruz S., F., & Saucedo C., G. (2007). Análisis de la extracción de ácidos hidroxicinámicos no esterificados de la pulpa de café por superficie de respuesta. In *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* (p. 1).
- Pérez Morales, G. G., Ramirez Coronel, A., Guzmán López, O., Cruz Sosa, F., Perraud Gaime, I., Roussos, S., & Saucedo Castañeda, G. (2011). Feruloyl Esterase Activity from Coffee Pulp in Solid-State Fermentation. *Food Technology Biotechnology*, 49(3), 352–358.
- Puerta, I. G. (2014). *Entrevista Gloria Ines Puerta*.
- Puerta Quintero, G. I. (2003). Especificaciones de origen y buena calidad del café de colombia. *Avances Técnicos*, (316), 7.
- Puerta Quintero, G. I. (2010). Rendimientos y calidad de Coffea arabica L., según el desarrollo del fruto y la remoción del mucílago. *Avance Técnico Cenicafé*, 61(1), 67–89.
- Ramírez Coronel, M. A., Mancera Torres, M. T., Augur, C., & Castañeda, S. (2007). Estudio del contenido de ácidos hidroxicinámicos de la pulpa del café para su biotransformación. In *Congreso Nacional de Biotecnología* (p. 1).
- Ramirez Coronel, M. A., Marnet, N., Kolli, K., Roussos, S., Guyot, S., & Augur, C. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (Coffea arabica) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1344–9. <http://doi.org/10.1021/jf035208t>
- Ramirez Martinez, J. R. (1988). Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 43, 10.
- Rathinavelu, R., & Graziosi, G. (2005). Potential alternative uses of coffee wastes and by-products.
- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Chromatography*, 1000, 657–691.
- Rodriguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. A. (2012). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Avances Técnicos*, (3).
- Sadeghian khalajabadi, S., Mejía Muñoz, B., & Arcila Pulgarín, J. (2006). Composición elemental de frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha en zona cafetera de Colombia. *Avance Técnico*, 57(4), 251–261.
- Sogorb S., M., & Vilanova G., E. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos*.
- Stalikas, C. D. (2007). Review Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Science*, 3268–3295. <http://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Suri, R., & Crozier, A. (2012). Free phenolic acids in human urine after drinking coffee rich in chlorogenic acids. *Tropical Agricultural*, 40(2), 221–232.
- Tavares Menezes, E. G., do Carmo, J. R., Tavares Menezes, A. G., Lembi Ferreira Alves, J. G., Pimenta, C. J., & Queiroz, F. (2013). Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(2), 673–87. <http://doi.org/10.1007/s12010-012-0030-0>

- Torres Mancera, M. T., Cordova López, J., & Rodríguez Serrano, G. (2011). Enzymatic Extraction of Hydroxycinnamic Acids from Coffee Pulp. *Food Technology Biotechnology*, 49(3), 369–373.
- Ulloa Rojas, J. B., Verreth, J. J., Amato, S., & Huisman, E. a. (2003). Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology*, 89(3), 267–274. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00070-1](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00070-1)
- Ulloa Rojas, J. B., Verreth, J. J., Van Weerd, J. H., & Huisman, E. (2002). Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1-4), 195–204. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00050-0)
- Urbaneja, G., Arenas, L. de M., Paez, G., Colina, G., & Sandoval, L. (1997). Acid hydrolysis and carbohydrates characterization of coffee pulp. *Revista Facultad de Agronomía*, 265–275.
- Viñas, M., Gruschwitz, M., Schweiggert, R. M., Guevara, E., Carle, R., Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Identification of Phenolic and Carotenoid Compounds in Coffee (*Coffea Arabica*) Pulp , Peels and Mucilage by HPLC Electrospray Ionization Mass Spectrometry.
- Vítěz, T., & Travníček, P. (2011). Particle Size Distribution of a Waste Sand From a Waste Water Treatment Plant With Use of Rosin–Rammler and Gates–Gaudin. *Acta Universitatis Agriculturae Et ...*, LIX(3), 197–202. Retrieved from <http://acta.mendelu.cz/pdf/actaun201159030197.pdf>
- Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q. (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 846–854. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.11.007>
- Zhang, H., Yang, X., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants : Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 672–688. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.07.003>