Cuantificación y comportamiento de la acrilamida en café Colombiano tipo excelso según origen y altura de cosecha

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Innovación Alimentaria y Nutrición

Jeniffer Calderón Giraldo
Química Farmacéutica

Asesor:
Rafael Álvarez Quintero
Químico Farmacéutico, PhD.

Corporación Universitaria Lasallista
Facultad de Ingeniería
Maestría en Innovación Alimentaria y Nutrición
Grupo de Investigación y Desarrollo Colcafé S.A.S
Caldas – Antioquia
2015

Dedicatoria

“A Dios y a mi Madre”

Agradecimientos

A la Compañía Colombiana de café, Colcafé S.A.S por la financiación del proyecto, el apoyo técnico y logístico en la consecución del café y en el desarrollo de las metodologías de análisis. Al área de compras, materia prima, bodega, materiales y de catación por su colaboración en los distintos procesos.

A mi jefe, Mauricio Naranjo Director de Investigación y Desarrollo, por la aprobación y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A la Cooperativa de Andes por su gestión y acompañamiento en la ubicación de las fincas de muestreo y a los amables caficultores, muchas gracias.

Al grupo de Investigación y Desarrollo de Colcafé, especialmente a Nelson Taborda por su asesoramiento en el tema de tostado y a Ángela Tilano del área de producción por sus valiosos aportes estadísticos.

Al Dr. Luis Fernando Garcés, Vicerrector de Investigación por su apoyo incondicional a los estudiantes y a todos los proyectos que soñamos llevar a cabo.

Al profesor Julián Londoño, por sus valiosos aportes académicos y su apoyo en el proceso de este posgrado y en la realización de la pasantía en La Salle Beauvais.

Al profesor Frédéric Tessier por recibirme en su laboratorio en mi pasantía en La Salle Beauvais, Francia.

Al Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas por permitirme desarrollar ciertas pruebas en su laboratorio.

De manera especial quiero agradecer a mi asesor, el profesor Rafael Álvarez por su acompañamiento y valiosos aportes científicos y a quien he considerado un modelo a seguir desde la primera clase que recibí… ¡Muchas gracias!

Abreviaturas

3-APA: 3-aminopropionamida

3CQA: 3-cafeoilquinic acid (ácido 3-cafeoilquínico)

4CQA: 4-cafeoilquinic acid (ácido 4-cafeoilquínico)

5CQA: 5-cafeoilquinic acid (ácido 5-cafeoilquínico)

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural

ACGS: ácidos clorogénicos

ANOVA: analysis of variance (análisis de varianza)

APCI: atmospheric pressure chemical ionization (ionización química a presión atmosférica)

Aprox.: aproximadamente

BRC: British Retail Consortium

BSTFA: N,O-bis(trimetillsilil) trifluoroacetamida

CQA: cafeoilquinic acid (ácido cafeoilquínco)

CV: coefficient of varince (coeficiente de variación)

DAD: diode array detector (detector de arreglo de diodos)

EFSA: European Food Safaety Authority

ESI: electrospray ionization (ionización de electro-spray)

FDA: Food and Drug Administration

GC/MS: gas chromatography / mass detector (cromatografía de gases / detector de masas)

He: helio

HPLC: high performance liquid chromatography

HPLC/MS: high performance liquid chromatography / mass detector (cromatografía líquida de alta eficiencia / detector de masas)

HPLC/UV: high performance liquid chromatography / ultraviolet visible detector (cromatografía líquida de alta eficiencia / detector ultravioleta-visible)

IARC: International Agency for Research of Cancer

min: minutos

MRP´s: Maillard reaction products (productos de la reacción de Maillard)

MSD: mass selective detector (detector de masas selectivo)

MTBSTFA: N-tert-Butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida

OIC: Organización Internacional del Café

PCA: principal component analysis (análisis de componentes principales)

PFT: polifenoles totales

PLS: partial least squares regression (regresión de mínimos cuadrados parciales)

ppb: partes por billón

rpm: revoluciones por minuto

RSD: relative standar desviation (desviación estándar relativa)

SIM: single ion monitoring (monitoreo de iones individuales)

SNFA: Swedish National Food Administration

SPE: solid phase extraction (extracción en fase sólida)

T&M: tostado y molido

UHPLC/MS: ultra high performance liquid chromatography / mass detector (cromatografía líquida de ultra alta eficiencia / detector de masas)

Tabla de contenido

Resumen **13**

Introducción **14**

Interés y motivación del estudio **17**

Objetivos **18**
Objetivo general 18
Objetivos específicos 18

Marco teórico **19**
Café 19
Café tipo excelso 20
Importancia del origen del café en su expresión metabólica y calidad 21
Reacción de Maillard como origen del sabor y el aroma del café 23
Acrilamida 25
Acrilamida y café 31
Acrilamida e industria del café: 32

Capítulo 1: Caracterización de la materia prima **34**
Materiales y métodos 36
Material vegetal 36
Preparación de la muestra: molienda y extracción 37
Parámetros fisicoquímicos 37
Contenido de polifenoles totales (PFT) 38
Contenido de ácidos clorogénicos (ACGS) 38
Contenido de L-α-aminoácidos 39
Contenido de azúcares reductores 41
Análisis estadístico 42
Resultados y discusión 43
Caracterización de la materia prima 43

Capítulo 2: Cuantificación de la acrilamida en el café tostado y molido: evaluación de su comportamiento **59**
Materiales y métodos 61

Tostado de la materia prima 61
Caracterización de la muestra: molienda, extracción y determinación de los parámetros fisicoquímicos 61
Perfil sensorial de las muestras 63
Contenido de polifenoles totales y ácidos clorogénicos 63
Contenido de L-α-aminoácidos residuales y azúcares reductores residuales 63
Desarrollo y validación de una nueva metodología analítica por GC/MS para la cuantificación de acrilamida 63
Preparación de la muestra: 64
Validación de la metodología analítica: 65
Concentración mínima detectable (Límite de detección). *65*
Concentración mínima cuantificable (Límite de cuantificación). *65*
Linealidad. *66*
Precisión. *66*
Exactitud. *67*
Selectividad / Especificidad. *68*
Análisis estadístico 69
Resultados y discusión 70
Cuantificación de la acrilamida en el café tostado y molido: evaluación de su comportamiento 70

Conclusiones 97

Perspectivas y recomendaciones 100

Referencias bibliográficas 101

Apéndices 113

Listado de tablas

Tabla 1. Composición química promedio del grano de café según especie (base seca). 20

Tabla 2. Codificación de la materia prima y parámetros de inspección. 37

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de L-α-aminoácidos en café por GC/MS-SIM. 40

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de azúcares reductores en café por GC/MS-SIM. 42

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de la materia prima. 44

Tabla 6. Contenido de polifenoles totales y ácidos clorogénicos en la materia prima. . 45

Tabla 7. Contenido de L-α-aminoácidos en la materia prima..... 46

Tabla 8. Contenido de azúcares reductores en la materia prima..... 47

Tabla 9. Parámetros de ANOVA para diferencias significativas en materia la prima.... 50

Tabla 10. Matriz de correlaciones para la materia prima. 54

Tabla 11. Niveles de tostado y codificación de las muestras..... 62

Tabla 12. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de acrilamida en café tostado y molido. 65

Tabla 13. Distribución de concentraciones en seis niveles de las curvas de calibración de acrilamida..... 66

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos del café tostado y molido. 72

Tabla 15. Contenido de azúcares reductores y L-α-aminoácidos en el café tostado y molido..... 74

Tabla 16. Contenido de polifenoles totales, ácidos clorogénicos y perfil sensorial (impresión global) del café tostado y molido. 76

Tabla 17. Resultados de validación para el método de acrilamida. 80

Tabla 18. Parámetros de ANOVA para diferencias significativas de efectos principales e interacciones de orden 2 en café tostado y molido. 86

Tabla 19. Matriz de correlaciones para el café tostado y molido. 89

Tabla 20. Análisis PLS para café de tostado bajo. 92

Tabla 21. Análisis PLS para café de tostado medio..... 93

Tabla 22. Análisis PLS para café de tostado alto. 95

Listado de figuras

Figura 1. Adaptación de las etapas de la reacción de Maillard por van Boekel, 2006, 231. 24

Figura 2. Adaptación de los mecanismos de la formación de acrilamida propuestos por Medeiros Vinci *et al*., 2012, 1139. 27

Figura 3. Gráfica de puntuación (PCA) en la materia prima para todos los parámetros cuantificados. 48

Figura 4. Gráfica de cargas (PCA) en la materia prima para todos los parámetros cuantificados. 49

Figura 5. Gráficas de efectos principales para los parámetros con diferencias significativas en la materia prima. 51

Figura 6. Gráfica de puntuación (PCA) para los aminoácidos y azúcares en la materia prima. 52

Figura 7. Gráfica de cargas (PCA) para los aminoácidos y azúcares en la materia prima. 52

Figura 8. Cromatograma (SCAN-SIM) acrilamida y propionamida. 68

Figura 9. Contenido de acrilamida en las muestras de café T&M. 81

Figura 10. Gráfica de puntuación (PCA) en el café tostado y molido para todos los parámetros cuantificados. 83

Figura 11. Gráfica de cargas (PCA) en el café tostado y molido para todos los parámetros cuantificados. 84

Figura 12. Gráfica de efectos principales para la acrilamida. 88

Figura 13. Gráfica de predictores para la formación de acrilamida con 1) L-glicina, 2) L-valina, 3) L-leucina, 4) L-5-oxoprolina, 5) L-metionina, 6) L-treoina, 7) L-asparagina para café de tostado bajo. 92

Figura 14. Gráfica de respuesta de los predictores para la formación de acrilamida en café de tostado bajo. 93

Figura 15. Gráfica de predictores para la formación de acrilamida con 1) L-glicina, 2) L-valina, 3) L-leucina, 4) L-5-oxoprolina, 5) L-metionina, 6) L-treoina, 7) L-asparagina para café de tostado medio. 94

Figura 16. Gráfica de respuesta de los predictores para la formación de acrilamida en café de tostado medio. 94

Figura 17. Gráfica de predictores para la formación de acrilamida con 1) L-glicina, 2) L-valina, 3) L-leucina, 4) L-5-oxoprolina, 5) L-metionina, 6) L-treoina, 7) L-asparagina para café de tostado alto. 95

Figura 18. Gráfica de respuesta de los predictores para la formación de acrilamida en café de tostado alto. 96

Apéndices

Apéndice A. Matriz de correlación para la materia prima..... 113

Apéndice B. Matriz de correlación para el café tostado y molido..... 115

Apéndice C. Calificación sensorial muestras Finca 1..... 116

Apéndice D. Calificación sensorial muestras Finca 2..... 117

Apéndice E. Calificación sensorial muestras Finca 3..... 118

Resumen

El origen geográfico del café tiene incidencia directa sobre su desarrollo y expresión metabólica, lo que a su vez afecta la calidad de la materia prima y del producto final. Sus metabolitos precursores de colores, aromas y sabores son transformados mediante reacciones químicas que ocurren principalmente en el proceso de tostado, destacándose la reacción de Maillard la cual utiliza aminoácidos y azúcares reductores como precursores de condensación para dar compuestos neoformados relacionados con el flavor y otros como la acrilamida que ha sido catalogada como “probablemente cancerígena” por la IARC. El café es un producto de consumo masivo a nivel global adaptado a la dieta humana y del cual se recibe cierta cantidad de acrilamida, lo que es de preocupación para la salud pública mundial. Por lo tanto esta investigación está enfocada en tratar de elaborar un café con bajos niveles de acrilamida para lo que fue necesario el desarrollo y validación de una nueva metodología analítica para su cuantificación mediante GC/MS. En el desarrollo de la investigación se pudieron establecer correlaciones entre el origen del café, el grado de tostado y la expresión metabólica con la producción de acrilamida. Se determinó que existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre los contenidos de L-5-oxoprolina, L-serina, L-ácido glutámico, D-(+)-ribosa y el pH entre las materias primas procedentes de las diferentes alturas, y que los niveles de los precursores influyen sobre los contenidos de acrilamida, la cual también cambia por efecto de la altura y el grado de tostado. Por último se propone un modelo preliminar con capacidad predictiva sobre la producción de acrilamida a partir de un grupo de aminoácidos en café verde.

Introducción

Las materias primas vegetales empleadas en la elaboración de alimentos difieren ampliamente en términos de especie, procedencia y calidad; como consecuencia de ello presentan una variable composición química que resulta, con la combinación de los procesos industriales, en el desarrollo de diferentes características organolépticas y nutricionales (Masson, Liberto, Brevard, Bicchi, & Rubiolo, 2014, 143).

El café no es una excepción a este suceso, pues numerosos autores han establecido que su lugar y altura de cosecha, prácticas agrícolas y pos-cosecha, influyen en la cantidad y desarrollo de matabolitos de actividad biológica, los que a su vez sufren una serie de transformaciones químicas a través de su proceso industrial, principalmente en el tostado (Avelino et al., 2005, 1869; Barbosa et al., 2012, 181; B Bertrand et al., 2012, 2575; Decazy et al., 2003, 2356; Joët et al., 2010, 2575; Oliveira, Franca, Glória, & Borges, 2005, 287).

El tostado del café es el momento en el que una cadena de reacciones químicas, principalmente la reacción de Maillard, da origen al desarrollo de los compuestos que se expresan en su agradable color, aroma y sabor, pero lastimosamente, es en este mismo proceso donde también se expresan ciertas sustancias no deseadas y catalogadas como potencialmente perjudiciales para la salud, como es el caso de la acrilamida.

La acrilamida es un compuesto con un amplio espectro de efectos tóxicos según la IARC, la cual en el año de 1994 la clasificó como 2A o “probablemente cancerígena para los humanos” (IARC, 1994, 389), pero solo hasta abril de 2002 (Claus et al., 2008,

119) científicos suecos con el apoyo de investigadores de la Universidad de Estocolmo alertaron sobre los altos niveles de acrilamida que superaban en algunos casos las 1000 ppb en productos alimenticios que sufren procesos térmicos por encima de los 100°C, como el tostado del café el cual se lleva a cabo a temperaturas entre los 150-250 °C a las que la acrilamida cuenta con las condiciones óptimas para su formación.

El café es una de las bebidas de mayor consumo a nivel mundial y el producto agrícola de mayor exportación en Colombia donde según cifras de la Federación Nacional de Cafeteros y la OIC, para el año 2014 se alcanzaron los 10.954 mil sacos de 60Kg de café exportados en todas sus presentaciones, principalmente a Estados Unidos y países europeos los cuales vienen trabajando arduamente desde el 2002 en la investigación de esta sustancia mediante constantes monitoreos por parte de la EFSA (EFSA, 2015a, 2015b; “No Title,” n.d., 1-48; States, Ferrari, Busk, & Doerge, 2010, 1-30; The, Of, & Commission, 2013, 1-2; Valsta, Pesci, Wenzl, & Doerge, 2011, 1-6), por lo que no es de extrañar que se esté planteando la posibilidad de implementar una legislación a cerca de los niveles máximos permisibles de acrilamida en café, abriendo la posibilidad a que nuestras exportaciones se vean seriamente afectadas. En Colombia, existe el documento “concepto de acrilamida en panela” (Social, 2012, 5-37) y en el año 2015 se elaboró el “Plan nacional subsectorial de vigilancia y control de acrilamida para el año 2015”, en el cual se estratifica el País por zonas de muestreo de aquellos alimentos que contienen mayores niveles de acrilamida, esperándose que cuando el estudio concluya y se tengan resultados, se emita el comunicado sobre el posible riesgo y probablemente una ley teniendo en cuenta la recomendación 2013/647/UE del 08 de noviembre de 2014 (Alimentos & El, 2015, 1-9).

Debido a lo anteriormente descrito, se hace necesaria la implementación de medidas estratégicas que nos permitan tener herramientas con las cuales podamos estar preparados para las exigencias de los mercados nacionales e internacionales, contando con un producto que siga siendo competitivo, sin que se vean afectadas sus bondades como el contenido de sustancias antioxidantes y sin olvidar que Colombia es un país cafetero desde el punto de vista económico hasta el socio-cultural.

En ese sentido, este proyecto de investigación pretende identificar si hay correlación entre los parámetros: origen y altura de cosecha, sustancias precursoras, sustancias antioxidantes y grado de tostado en la formación de acrilamida. Igualmente, se plantea llevar a cabo el estudio en café tipo excelso, el cual es nuestra variedad de mayor exportación a nivel internacional y mediante el desarrollo *in house* de una nueva metodología analítica por GC/MS.

Interés y motivación del estudio

Aunque son muchos los estudios llevados a cabo sobre acrilamida, a la fecha en Colombia no se cuenta con mayor información al respecto de esta sustancia en ninguna matriz alimenticia, incluido el café, nuestro producto insignia. Es por ello que esta investigación pretende encontrar si existe alguna correlación entre los niveles de acrilamida formados con la región y altura de cosecha de un café Colombiano tipo excelso y con los niveles de sustancias precursoras en su formación, así como con las principales sustancias antioxidantes del café. Para lograr lo anterior se hace necesario el desarrollo y la validación de una metodología analítica por GC/MS para la cuantificación de acrilamida, previa caracterización de la materia prima antes de ser sometida a tres grados diferentes de tostado. Adicionalmente, los resultados derivados de este estudio nos permitirán contar con nuevo conocimiento y con herramientas para la toma de decisiones a la hora de elaborar y exportar un producto de alta calidad, apuntando siempre a la reducción del contenido de acrilamida ya que en el País, a la fecha, no se han reportado estudios de este tipo.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el comportamiento de la acrilamida formada durante el proceso de tostado de café tipo excelso proveniente de diferentes alturas en una región del País, mediante su cuantificación por GC/MS.

Objetivos específicos

Caracterizar las muestras de café verde mediante la cuantificación de los precursores de acrilamida, y cuantificar los posibles remanentes en el café tostado.

Evaluar tres tipos de tostado (bajo, medio y alto), y establecer la posible relación con la formación y el comportamiento de la acrilamida en el café según altura y origen de cosecha.

Desarrollar y validar una nueva metodología analítica por GC/MS para la identificación y cuantificación de acrilamida formada durante el proceso de tostado del café.

Marco teórico

Café

El café es el segundo commodity más comercializado del mundo después del petróleo; es producido y exportado por más de 60 naciones siendo Brasil, Vietnam, Colombia e Indonesia sus mayores productores (Outline, 2008, 33). El café es un árbol perenne perteneciente a la familia *Rubiaceae* y cuenta con un solo tronco principal y ramas horizontales en las que se albergan flores y sus frutos comúnmente llamados “cereza”, los cuales, en condiciones tropicales aparecen en paralelo. A pesar de que existen más de 100 especies, únicamente dos de ellas, la *Coffea arabiga* conocida como café arábiga y la *Coffea canephora* conocida como café robusta se emplean en la producción de la bebida (S. Oestreich-Janzen, Gmbh, 2010, 4). La composición química promedio de ambas especies se ilustra a continuación (Tabla 1) (Farah, 2012, 28; Puerta, 2011, 3).

Tabla 1. Composición química promedio del grano de café según especie (base seca).

Componente químico	Arábiga	Robusta
	g/100g	
Carbohidratos/Fibra		
Sacarosa	6,0-9,0	0,9-4,0
Azúcares reductores	0,1	0,4
Polisacáridos	34,0-44,0	48,0-55,0
Lignina	3	3
Pectina	2	2
Compuestos nitrogenados		
Proteína/péptidos	10,0-11,0	11,0-15,0
Aminoácidos libres	0,5	0,8-1,0
Cafeína	0,9-1,3	1,5-2,5
Trigonelina	0,6-2,0	0,6-0,7
Lípidos		
Triglicéridos	15,0-17,0	7,0-10,0
Diterpenos (libres y esterificados)	0,5-1,2	0,2-0,8
Minerales	3,0-4,2	4,4-4,5
Ácidos y esteres		
Ácidos clorogénicos	4,1-7,9	6,1-11,3
Ácidos alifáticos	1	1
Ácidos quínicos	0,4	0,4
Compuestos aromáticos	trazas	trazas

Café tipo excelso

El café excelso es conocido como el de más alta calidad; el Comité Nacional de Cafeteros lo ha descrito de la siguiente manera: “compuesto de grano grande, principalmente plano, parejo, retenido por encima de malla catorce (14), con tolerancia del uno punto cinco (1,5) por ciento (%) inferior a esa malla, pero retenido por la malla doce (12), de esmerado beneficio y debidamente seleccionado. En todo caso este café debe tener por lo menos un cincuenta (50) por ciento (%) de granos retenidos sobre la malla quince (15), de acuerdo con lo previsto en las normas de la Green Coffee Association of New York City, Inc.” (Hospitalarios, 2002).

Importancia del origen del café en su expresión metabólica y calidad

El sabor y frescura de una taza de café es el resultado final de la expresión de una larga cadena que ocurre entre la semilla y la bebida final. Las semillas de café contienen todos los precursores necesarios para generar el aroma durante su proceso de tostado tales como polisacáridos, lípidos, aminoácidos, proteínas y ácidos clorogénicos, entre otros, los cuales juegan un papel crucial en su compleja química. Por ejemplo, los aminoácidos y proteínas son esenciales para la conversión de azúcares en precursores de aromas vía reacción de Maillard, los ácidos clorogénicos y la cafeína son los responsables de la acidez, etc.

Numerosos estudios han demostrado que ciertos factores como las condiciones climáticas, la composición del suelo, la temperatura media, la pluviosidad, las condiciones lumínicas, la altura de siembra, las prácticas agrícolas y pos-cosecha, influyen en la composición química de la semilla (Decazy et al., 2003, 2356; Joët et al., 2010, 2575).

Por ejemplo, la sombra y la altitud tienen influencias dramáticas en la frescura del ambiente, lo cual tiene efectos positivos para el café, pues esta condición retarda el proceso de maduración aproximadamente un mes, lo que se traduce en la acumulación de mayores precursores del aroma; también, cafés que son cultivados a mayores alturas suelen acumular un mayor contenido de ácidos clorogénicos (Avelino et al., 2005, 1869). Se ha reportado que cafés cultivados en suelos volcánicos producen bebidas de mayor acidez, las cuales son muy apetecidas en ciertos públicos; así mismo se ha reportado que la distribución de la luz solar tiene una fuerte influencia en la

floración, la expansión del grano, la madurez, el contenido de azúcares, trigonelina y ácidos clorogénicos aumentando la astringencia de la bebida, y aunque la sombra puede reducir hasta en un 20% la productividad del árbol, esta condición es positiva en la conservación y tamaño del grano (Benoit Bertrand et al., 2006, 1239-1240).

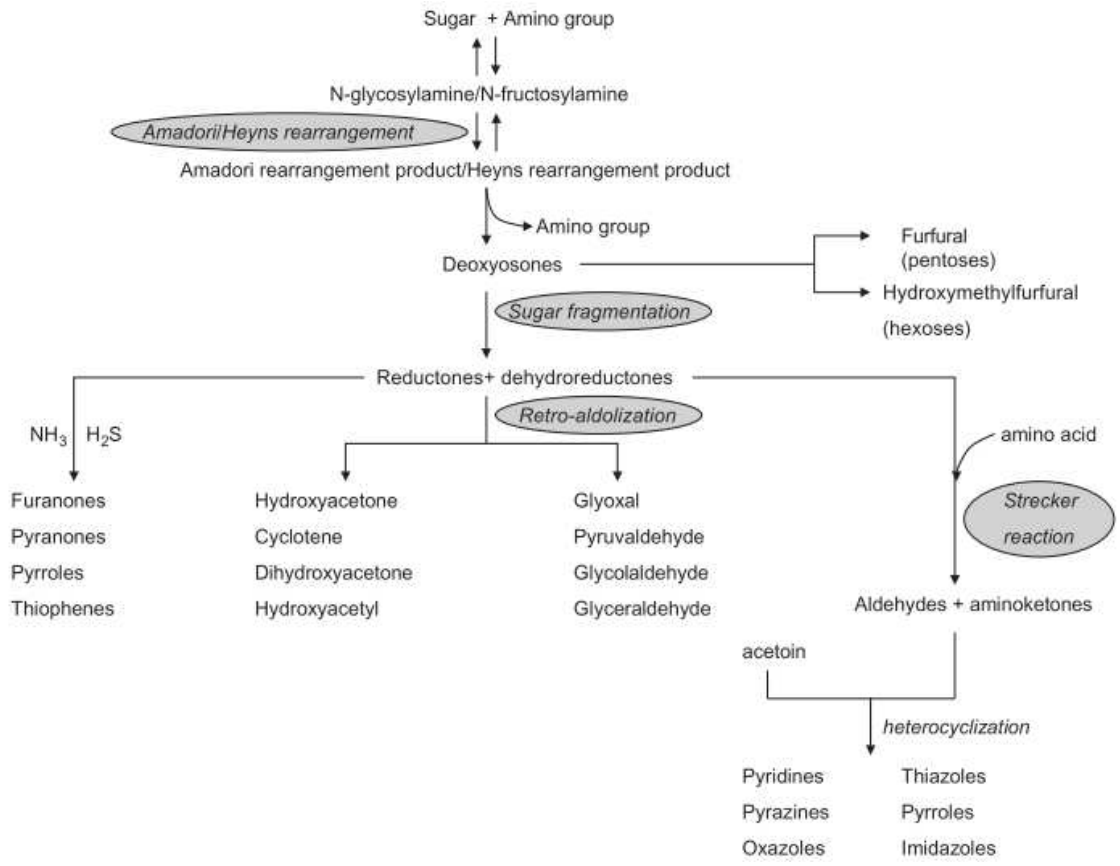
Los compuestos volátiles responsables del agradable aroma del café son metabolitos secundarios como isoprenoides, fenilpropanoides, aminoácidos y ácidos grasos; de los casi 300 que hacen parte del grano verde, cerca de 200 están presentes aún luego del proceso de tostado y hoy en día se conoce que sus proporciones varían según la altura de cosecha, por lo que investigadores han estudiado como la elevación, los gradientes de temperatura y condiciones de suelo afectan el desarrollo de estos volátiles, incidiendo de manera directa en la calidad del café (B Bertrand et al., 2012, 2575, 2576; Kwon et al., 2015, 67).

También se ha demostrado como la variedad del café influye sobre la expresión metabólica del mismo, y esta a su vez, sobre la calidad de la materia prima y el producto final. Se sabe que la variedad arábiga contiene más azúcares y trigonelina, pero menos cafeína y ácidos clorogénicos que la robusta, siendo esta última muy cultivable a bajas alturas debido a su fuerte resistencia contra enfermedades (Kwon et al., 2015, 66).

Reacción de Maillard como origen del sabor y el aroma del café

El agradable color, aroma y sabor de una bebida de café, tienen su origen en una reacción química: la reacción de Maillard, que puede considerarse como una de las más importantes durante el procesamiento de los alimentos que son sometidos a procesos térmicos como el tostado. Esta tiene una influencia directa no solo en sus propiedades organolépticas, sino también en sus propiedades nutricionales y fisicoquímicas. La reacción de Maillard (Figura 1), resume todas las reacciones químicas que ocurren entre los aminoácidos y los azúcares para formar los compuestos que dan esa tonalidad oscura y agradable aroma al café. Esta reacción se divide usualmente en las etapas de condensación entre el azúcar y el grupo amino, re-arreglo del producto de Amadori y la ciclación y polimerización, y se ve afectada por parámetros del proceso como la temperatura, el pH, la actividad acuosa, el tipo y la disponibilidad de los reactantes, entre otros (Jaeger, Janositz, & Knorr, 2010, 207; Rufián-Henares & Pastoriza, 2015, 183; van Boekel, 2006, 230).

Figura 1. Adaptación de las etapas de la reacción de Maillard por van Boekel, 2006, 231.



Lastimosamente mediante la reacción de Maillard, se da la aparición de compuestos neoformados que no son deseables en los alimentos porque son catalogados como potencialmente peligrosos para la salud como es el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos, cloropropanoles y clorésteres, aminas hereocíclicas, hidroximetil furfural, carboximetil-lisina y la acrilamida (Ciencias & Sociología, 2012, 27-31; Loaëc, Niquet-Léridon, et al., 2014, 2.-3).

Acrilamida

En las últimas décadas, el estudio de los productos alimentarios ha sufrido modificaciones importantes. En países occidentales donde las sustancias nutricionales son casi ilimitadas, se ha dado un cambio hacia la discusión sobre el análisis de los factores de riesgo desconocidos en un producto para el consumidor, cambio que se ha venido introduciendo debido a las alarmas generadas por la percepción que tienen los mismos consumidores sobre el riesgo, las tecnologías emergentes de análisis y el debate sobre los alimentos saludables y no saludables (Eriksson, 2005, 1; Loaëc, Jacolot, Helou, Niquet-Léridon, & Tessier, 2014, 1)**.**

En la industria alimentaria de todo el mundo, los conceptos de riesgo e inocuidad han generado la necesidad de implementar sistemas y organizaciones como la FDA, EFSA, BCR, entre otras, encargadas de asuntos regulatorios, de vigilancia y control, de parámetros de calidad etc., y las cuales han clasificado como factores químicos de riesgo varios tipos de toxinas, B-*N*-metilamino-L-alanina, metales pesados y muy importante, los compuestos formados durante el procesamiento de los alimentos o compuestos neo-formados como es el caso de la acrilamida (Capuano & Fogliano, 2011, 793; Eriksson, 2005, 1-4).

En abril de 2002, un grupo de investigadores de la Universidad de Estocolmo en conjunto con la SNFA reportaron la presencia de acrilamida (2-propenamida) en un amplio rango de alimentos fritos, horneados, tostados, etc (Commission, 2002, 3-6; Pittet, Périsset, & Oberson, 2004, 791) y sus posibles efectos sobre la salud (Anese, Suman, & Nicoli, 2010, 123; Gökmen, Kocadağlı, Göncüoğlu, & Mogol, 2012, 168;

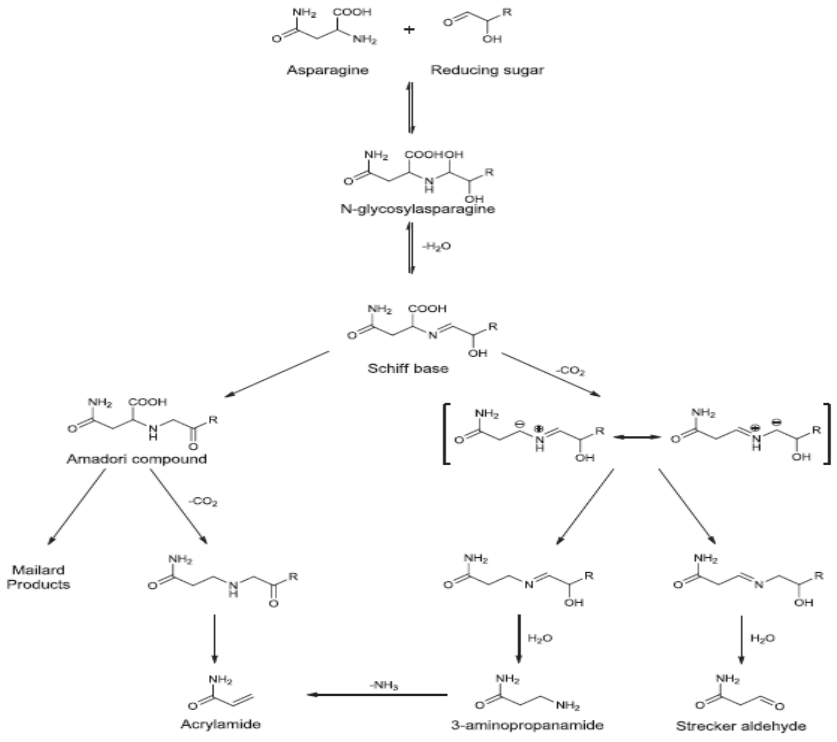
Granby & Fagt, 2004, 177-178; Guenther, Anklam, Wenzl, & Stadler, 2007, 60-61; Hoenicke & Gatermann, n.d.; L, 2011, 268; Lineback, Coughlin, & Stadler, 2012, 21-24; Loaëc et al., 2014, 2; Oracz, Nebesny, & Zyżelewicz, 2011, 23-24; Riboldi, Vinhas, & Moreira, 2014, 311; Stadler et al., 2002, 449; Taeymans et al., 2004, 324-325; Tardiff, Gargas, Kirman, Carson, & Sweeney, 2010, 658-659; Zyzak et al., 2003, 5782), los cuales son ampliamente conocidos en la actualidad debido a la gran preocupación que causó este hallazgo a nivel mundial (Headquarters, 2002, 3).

La acrilamida (CH_2=CH-CO-NH_2), es un compuesto cristalino blanco e inodoro, soluble en agua, acetona y etanol y es empleado como polímero sintetizado a partir de la hidratación del acrilonitrilo (Dybing & Sanner, 2003, 311) en varias aplicaciones industriales tales como tratamiento de aguas, manufactura de papel, cosméticos, etc., (De Vleeschouwer, Van der Plancken, Van Loey, & Hendrickx, 2007, 116). La acrilamida se forma en alimentos que sufren procesos térmicos por encima de los 100°C y fue catalogada en 1994 como “probablemente cancerígena para los humanos” ó 2A según la IARC (States, Ferrari, Busk, & Doerge, 2010, 2).

En los procesos térmicos por encima de los 100 °C a los cuales son sometidos muchos alimentos durante su manufactura, los azúcares reductores reaccionan con los aminoácidos iniciando una serie de eventos que generan un característico color pardo y ciertas notas aromáticas; este proceso es conocido como la reacción de Maillard (Zyzak et al., 2003, 4785), principal ruta de formación de la acrilamida. A la fecha, es bien sabido que esto ocurre mediante la condensación de la asparagina con azúcares reductores (Taeymans et al., 2004, 331), pero debido a la formación de especies intermediarias altamente reactivas, hoy se sabe que esta no es la única ruta de

formación. Una de las primeras ilustraciones de cómo ocurre esta reacción fue propuesta por (Zyzak et al., 2003, 4784-4785). El primer paso es la condensación de la asparagina y el carbonilo reactivo, seguido por la deshidratación a una base de Shiff como intermediario alternativo de baja energía en la formación de un producto de Amadori; la amina neutra (descaroboxilada del compuesto de Amadori) se forma por transferencia de protones, y finalmente una β-eliminación de H produce la acrilamida (Figura 2) (Lineback et al., 2012, 19-20; Medeiros Vinci, Mestdagh, & De Meulenaer, 2012, 1139). Se ha sugerido la 3-aminopropionamida como un posible intermediario en la formación de acrilamida vía reacción de Maillard, la cual puede formarse también en materias primas alimentarias por descarboxilación enzimática de la acrilamida bajo ciertas condiciones (Bagdonaite, Viklund, Skog, & Murkovic, 2006, 215, 218).

Figura 2. Adaptación de los mecanismos de la formación de acrilamida propuestos por Medeiros Vinci *et al*., 2012, 1139.



Son numerosos los estudios que tratan sobre los efectos neurotóxicos, carcinógenos y sobre la reproducción por parte de la acrilamida. Luego de su ingesta, la acrilamida es rápidamente absorbida en todo el organismo y puede ser encontrada en el timo, el hígado, el corazón, el cerebro, los riñones e incluso en la placenta. La acrilamida puede ser metabolizada por el citocromo P450 2E1 a glicinamida o conjugada a glutatión y posteriormente es convertida a ácidos mercaptúricos conjugados (Capuano & Fogliano, 2011, 797). La unión de la acrilamida a grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de las proteínas que tienen un papel importante en el proceso de fusión de la membrana, causa degeneración en las terminales nerviosas y la inhibición del transporte axonal, iniciando reacciones de estrés oxidativo y daños presinápticos. Este estrés oxidativo comienza con la oxidación de lípidos y posteriormente con la de proteínas, haciendo que el daño sea acumulativo (Erkekoglu & Baydar, 2014, 49).

Desde que la IARC catalogó la acrilamida como probablemente cancerígena, muchos estudios en modelos animales, principalmente en roedores y estudios epidemiológicos en humanos (Lineback et al., 2012, 27), han soportado esta teoría encontrado la capacidad que tiene de formar tumores en órganos como el cerebro, las mamas, la piel, los pulmones, etc. (Capuano & Fogliano, 2011, 798; Tardiff et al., 2010, 660). La investigación llevada a cabo por Tardiff y Col (2010, 658), demostró que la tolerancia a la ingesta diaria de acrilamida es de 40µg/kg día y se sabe que en países nórdicos aproximadamente un 39% de esta ingesta proviene del café (Guenther et al., 2007, 61). En cuanto a los efectos genotóxicos y reproductivos, la acrilamida reacciona lentamente con el ADN vía reacción de Michael para formar aductos, los cuales se

cree, están más relacionados con la exposición ocupacional y no con la ingesta mediante la dieta (Wilson, Mucci, Rosner, & Willett, 2010, 2513- 2514).

La investigación relacionada con los riesgos de la acrilamida para la salud ha incentivado la aplicación de metodologías analíticas que permitan su cuantificación; de acuerdo con E. Food & Authority (2012, 14), las metodologías de análisis más empleadas para la cuantificación de acrilamida entre el 2007 y el 2010 fueron: HPLC/MS (56 %), GC/MS (37 %) y el porcentaje restante se dividió entre HPLC/UV, UHPLC/MS, electroforesis capilar y bioensayos como test inmunoenzimáticos. Debido a la existencia de estas múltiples técnicas de análisis se ha demostrando que un procedimiento de extracción universal del analito no es posible pues cada matriz de es un mundo complejo y de ello dependerán los reactivos a emplear o el procedimiento de limpieza de la muestra previo al análisis por cualquiera de estas tecnologías (Oracz et al., 2011, 28). Los métodos de cromatografía líquida son los más empleados debido a su simplicidad y menor consumo de tiempo; en ellos el clean-up de la muestra dependerá del tipo de detector a emplear y de la matriz objeto de análisis como ya se mencionó (Eriksson & Karlsson, 2006, 394). La mayoría de los métodos de cromatografía líquida usan detectores MSD cuadrupolares, ESI y unos pocos emplean detectores APCI (Albishri & El-Hady, 2014, 130; Jezussek & Schieberle, 2003, 7868-7870; Kuncewicz & Michalak, 2013, 71-73; Wang et al., 2013, 7). Matrices alimentarias analizadas por GC/MS generalmente requieren derivatización del analito, lo cual suele ser interpretado como una desventaja pues este procedimiento debe llevarse a cabo bajo estrictos controles de tiempo, temperatura y cantidad del derivatizante para asegurar el éxito de la reacción, pero se ha demostrado que los porcentajes de

recuperación, desviaciones estándar y límites de cuantificación son bastante aceptables (Sun, Fang, & Xia, 2012, 222), lo que no constituye un inconveniente si el analista cuenta con el cuidado y la experticia necesaria.

A partir de la detección de la acrilamida, se ha dado lugar a intensos esfuerzos de investigación, principalmente en las metodologías analíticas de cuantificación mencionadas anteriormente, (Jin et al., 2013, 612; Medeiros Vinci, Mestdagh, & De Meulenaer, 2012, 1145-1146), mecanismos de formación y precursores (De Vleeschouwer et al., 2009, 116) y las posibles estrategias de mitigación en los alimentos que sufren procesos térmicos, las cuales se han enfocado en los últimos años en los siguientes aspectos: aplicación de aditivos como sales de calcio y magnesio, pirofosfato ácido de sodio, ácido cítrico, ácido láctico y acético (Mestdagh et al., 2008, 26), tratamientos pre y pos cosecha (De Wilde et al., 2006, 404-405), procesos térmicos llevados al vacío (Claus et al., 2008, 122), uso de metodologías de fermentación (Akıllıoglu & Gökmen, 2013, 1), uso de asparaginasa (Capuano & Fogliano, 2011; Cb, 2002, 795), modificaciones al proceso de tostado (Anese et al., 2014, p. 169; Guenther et al., 2007, 65) y extracción y remoción por medo de fluidos supercríticos (Banchero et al., 2013, 292).

Acrilamida y café

El tostado es un proceso térmico en la manufactura de café en el cual se desarrollan todas sus características fisicoquímicas y organolépticas (Akıllıoglu & Gökmen, 2013, 1). Este proceso varía entre los 150-250 °C (Summa, de la Calle, Brohee, Stadler, & Anklam, 2007, 1850), según el tipo de café que se quiera obtener, ya sea tostado y molido, soluble, en extracto, etc., o el tipo de tueste que se quiera conseguir, claro, medio u oscuro, según el perfil de taza deseado. En el café verde, la acrilamida es formada natural y rápidamente durante el inicio del tueste. Se han encontrado valores entre 200-958 µg/Kg en café tostado y molido y entre 188-1047 µg/Kg en café instantáneo (Pastoriza, Ángel, & Morales, 2012, 198). De esta manera, el grado de tostado es de considerarse como un factor clave en el contenido de acrilamida, por lo que modificaciones a este proceso, como llevarlo a cabo al vacío, han sido estudiados (Anese et al., 2014, 168).

Aunque el café ha sido catalogado dentro del grupo de los alimentos donde “la reducción de acrilamida es poco probable sin afectar su calidad”, se han llevado a cabo metodologías como adición de asparaginasa, uso de sales de calcio y magnesio y modificación en los parámetros de tueste, entre otros (Akıllıoglu & Gökmen, 2013, 1).

Si bien se conoce el esfuerzo que se ha realizado con las metodologías mencionadas anteriormente, el foco de las investigaciones sobre acrilamida en café se ha orientado en conocer sus niveles en el grano tostado; la prioridad ahora se ha tornado en cuantificar la cantidad que efectivamente ingieren los consumidores, pues la acrilamida es altamente soluble en agua, por lo que es transferida fácilmente a las

bebidas de café, especialmente a las que son preparadas a altas presiones como el café espresso (Alves, Soares, Casal, Fernandes, & Oliveira, 2010, 929). De igual manera, las materias primas son el centro de muchos estudios; para el café es de suma importancia la evaluación de cómo afectan las condiciones geográficas la producción de los precursores de la acrilamida, es decir, la asparagina y los azúcares reductores, puesto que los atributos del terreno tales como elevación, clima, periodos de lluvia, calidad y fertilización del suelo, etc., pueden influir significativamente sobre su formación (De Wilde et al., 2006, 404; Loaëc, Niquet-Léridon, et al., 2014, 2; Oberthür et al., 2011, 785).

Acrilamida e industria del café:

Como es sabido, el café es el principal producto de exportación agrícola de nuestro País; según cifras de la Federación Nacional de Cafeteros y la OIC, para el año 2014 se alcanzaron los 10.954 mil sacos de 60Kg de café exportados en todas sus presentaciones, además una de las bebidas de mayor consumo a nivel mundial especialmente en países como Finlandia, Noruega, Islandia, Dinamarca, Estados Unidos y Brasil, entre otros (Bortolomeazzi et al., 2012, 2687)**.** Se presume que la contribución del café en la ingesta diaria de acrilamida es bastante significativa en países con una alta tasa de consumo de café, por ejemplo se ha reportado que una taza de 30 mL de café espresso elaborado con variedad arábiga contiene aproximadamente 0,98 μg (Alves et al., 2010, 932). Esta situación, contrasta un poco con los beneficios derivados de sus sustancias antioxidantes como la disminución de enfermedades cardiovasculares (O'Keefe et al., 2013, 1043). disminución de procesos

neurodegenerativos (Prakash & Tan, 2011, 127), (Machado, Parise, & de Carvalho, 2014, 170), etc., motivo por el cual la industria cafetera debe destinar mayores esfuerzos en la investigación de esta sustancia, evaluar qué cantidades de acrilamida son ingeridas a partir del café, cómo mitigar los valores actuales desde los procesos industriales y como en el caso de esta investigación, determinar cómo el origen y la calidad del café pueden o no correlacionarse con su formación.

Capítulo 1: Caracterización de la materia prima

La manera cualitativa y cuantitativa como se expresan algunas sustancias de interés biológico en los alimentos está directamente relacionada con sus sustancias precursoras y estas a su vez, con el origen de las materias primas. Si bien los cambios más drásticos ocurren durante los procesos industriales, es la calidad en sí de dichas materias primas la que es determinante en el contenido final de los compuestos tanto de valor nutritivo y organoléptico como de aquellos que no son tan deseables. Es por ello que la caracterización juiciosa de las mismas, así como la clara trazabilidad en su consecución, permitirá contar con herramientas suficientes para poder concluir como su origen, su calidad y el contenido inicial de sustancias precursoras pueden o no estar relacionadas con el contenido final de acrilamida en el café objeto de investigación.

Debido al objetivo principal de este estudio, determinar la posible correlación entre la acrilamida formada con un gran número de factores, entre ellos la calidad de la materia prima y las sustancias precursoras de la misma, y debido también a que no se conocen reportes sobre la cuantificación de acrilamida mediante GC/MS en café colombiano tipo excelso, se decidió llevarlo a cabo entrelazando las necesidades comerciales de Colcafé y la máxima trazabilidad posible sobre la materia prima. Así los criterios de selección de las fincas fueron establecidos de manera tal que se tuviera conocimiento sobre todo aquello que puede afectar la materia prima, por lo que se tuvo en cuenta que las tres fincas (alturas) manejaran igual variedad de café (Colombia), calidad (excelso) el cual es el tipo de café de más alta calidad que se pueda producir y el de mayor exportación, beneficio (húmedo), secado (al sol), similares prácticas

agrícolas y que la colección se llevara a cabo en el mismo mes para tratar de que los factores climáticos fueran los mismos sobre todo el café colectado.

Luego de que el café verde llegó a la compañía, se realizó la correspondiente inspección para verificar que se trataba de café excelso, seguido se procedió con la medición de los parámetros fisicoquímicos del mismo y de la cuantificación de los metabolitos de interés biológico. No solo se llevó a cabo la cuantificación de los precursores en la formación de acrilamida, la aspargina y la glucosa y/o fructosa, sino que también se determinó un set de L-α-aminoácidos, seis azúcares reductores y el contenido de polifenoles totales y ácidos clorogénicos (3, 4 y 5 CQA), para identificar mediante estos la posible expresión de marcadores y evidenciar si se presenta o no una alta variedad en la composición química de los mismos con respecto al café entre las diferentes fincas. Conociendo las diferencias en este café, se podrá establecer en el futuro la manera en que se comporta la acrilamida, luego del proceso tostado de este.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para esta investigación se realizó un muestreo aleatorizado del café en el municipio de Andes, departamento de Antioquia (5° 39' 29'' N, 75° 52' 51'' O) ubicado a 1350 msnm, temperatura media de 22° C y precipitación anual media de 2099 mm; este se estratificó en tres alturas diferentes y de cada altura se seleccionó una finca, las que a su vez se estratificaron en tres alturas o zonas de colección para cubrir todos los lotes de producción y asegurar la aleatoriedad el muestreo. El café de traviesa como es conocida la cosecha secundaria que se da entre los meses de marzo y mayo, corresponde a la especie Arábiga, variedad Colombia, con un proceso de beneficio húmedo y secado al sol. La cantidad necesaria de café pergamino, o como se conoce al café con la cascarilla antes del proceso de trilla, fue acopiado en la misma trilladora la cual entregó la respectiva carga de café calidad excelso. Luego de recibida la materia prima, esta se codificó y se inspeccionó según los parámetros descritos en la NTC 5938 de café verde para uso industrial (ICONTEC Internacional, n.d., 4-6), mediante los que se verificó que correspondía a la calidad excelso (Tabla 2).

Tabla 2. Codificación de la materia prima y parámetros de inspección.

Altura	Zona de muestreo	Codificación	Parámetros inspeccionados según norma NTC 5938
Finca 1	Baja	F1A1CV	Grano bueno, grano negro, grano con defecto, grano vinagre, ripio, impurezas, materia extraña, grano brocado, grano foráneo, grano guayaba, densidad, sabor y humedad en balanza
	Media	F1A2CV	
	Alta	F1A3CV	
Finca 2	Baja	F2A1CV	
	Media	F2A2CV	
	Alta	F2A3CV	
Finca 3	Baja	F3A1CV	
	Media	F3A2CV	
	Alta	F3A3CV	

Preparación de la muestra: molienda y extracción

Los granos de café verde se molieron en un molino Probat Emmerich (Brabender® Germany) a tamaño de partícula según parámetros de perfiles de producto en Colcafé; luego de tener la muestra en fino polvo, 30g fueron sometidos a extracción en una cafetera doméstica marca SAMURAI Café City 12 con 500 mL de agua ultra pura durante 7 minutos; esta relación agua/café también corresponde a un parámetro de perfil de producto en Colcafé.

Parámetros fisicoquímicos

Luego de la molienda de las muestras se determinó la densidad y el porcentaje de humedad en una balanza de humedades Halogen HR83 (Mettler Toledo, Switzerland). Con la extracción del café o preparación de las bebidas según el apartado anterior se determinó su pH en un pH-metro SevenEasy 8603 (Mettler Toledo, Switerland).

Contenido de polifenoles totales (PFT)

La cuantificación de polifenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu con ligeras modificaciones (Alvarez et al., 2012). Se mezclaron 15 µL de la muestra (con un factor de dilución 20) con 128 µL de agua ultra pura, luego se adicionaron 37 µL el reactivo de Folin Ciocalteu, se dejó reposar por 1 minuto y se adicionaron 120 µL de una solución de carbonato de sodio al 9,0 % $^{p}/_{v}$. Cada mezcla se alicuotó en un pozo de 300 µL en una placa de 96 pozos marca Costar Ref. 3628. Esta placa se llevó a un espectrofluorímetro Biotek Sinergy HT (USA), en el cual se agitó automáticamente por un minuto, se incubó en oscuridad por 60 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 760 nm. El análisis cuantitativo se realizó por el método del estándar externo mediante una curva de calibración de ácido gálico (20,0-500,0 mg/L) y los resultados se expresaron en términos de miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE).

Contenido de ácidos clorogénicos (ACGS)

En un tubo cónico de 15 mL se adicionaron 6,0 mL del la bebida preparada con 3,0 mL de una mezcla 70:30 de metanol / ácido fórmico al 0,3% $^{v}/_{v}$ más 200 µL de solución de Carrez I y II (100 µL de cada una). Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente; el sobrenadante se diluyó en ácido fórmico al 0,3% $^{v}/_{v}$ a un factor de dilución 7,5 y se filtró a través de un acrodisco de nylon de 0,45 µm.

La cuantificación de los ácidos clorogénicos correspondiente a la suma de los ácidos 3CQA, 4CQA y 5CQA, se llevó a cabo mediante HPLC en un cromatógrafo de líquidos marca Agilent serie 1260 Infinity con un detector DAD VL61315D (Germany) empleando el método del estándar externo y siguiendo la metodología propuesta por Mills y Col (2013, 3357), con algunas modificaciones. Se empleó una columna Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) a flujo de 1,0 mL/min usando una mezcla de ácido fórmico al 0,3% $^{v}/_{v}$ y acetonitrilo como fase móvil; la detección se llevó a cabo a λ= 325 nm y el tiempo de corrida fue de 18 min.

Contenido de L-α-aminoácidos

A 200 mg de la muestra de café se adicionaron 1,5 mL de medio de extracción (Metano / HCl 0,1N 80:20) y se sometieron a ultrasonido por 40 min; se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, de allí se tomaron 50 µL de extracto y se evaporaron a 45 °C en horno de convexión. Al residuo seco se adicionaron 100 µL de acetonitrilo y 50 µL de derivatizante MTBSTFA (N-tert-Butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida) dejándolo actuar por 24 horas; luego del tiempo de reacción se adicionaron 100 µL de cloroformo quedando la muestra lista para la inyección en el cromatógrafo de gases.

El contenido L-α-aminoácidos en la materia prima se llevó a cabo en un cromatógrafo gaseoso Marca Agilent modelo 7098A acoplado a un detector de masas simple modelo 5975C equipado con sistema de inyección automática de líquidos, puerto de inyección capilar split/splitless, sistema de detección MSD de alta sensibilidad y especificidad operando en modo SIM. Para la cuantificación de los

analitos se empleó método del estándar interno usando norvalina, una columna Zebron ZB-5MSi Guardian 5M. (35 m x 250 µm x 0.25 µm), He como gas portador a un flujo de 1,0 mL/min y un tiempo de corrida de 38,14 min. Los iones empleados para cuantificación e identificación, así como los niveles de detección para la prueba se encuentran resumidos en la Tabla 3. Las condiciones de procesamiento de muestra y de adquisición de las señales fueron adaptadas a partir de la nota de aplicación Sigma-Aldrich (Katerine K. Stenerson, 2011, 9-11).

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de L-α-aminoácidos en café por GC/MS-SIM.

Compuesto	Tr[1]. (min)	*m/z*[2] (ion 100%)	LD[3] (µg/L)	LC[4] (µg/L)
L-alanina	13,037	158,1; 232,2; 260,1	0,20	0,4
L-glicina	13,415	147,1; 218,1; 246,2	0,20	0,4
L-valina	15,004	186,2; 260,1; 288,1	0,20	0,4
DL-norvalina	15,206	186,2; 260,1; 288,1	0,20	0,4
L-leucina	15,668	200,2; 274,1; 302,1	0,20	0,4
L-isoleucina	16,159	200,2; 274,1; 302,1	0,20	0,4
L-prolina	16,67	184,2; 258,1	0,20	0,4
L-5-oxo prolina	19,403	272,1; 300,1	0,20	0,4
L-methionina	19,644	218,1; 292,1; 320,2	0,20	0,4
L-serina	19,982	288,1; 362,3; 390,3	0,20	0,4
L-threonina	20,41	303,1; 302,1	0,20	0,4
L-fenilalanina	21,279	302,1; 234,2; 366,2	0,20	0,4
L-ácido aspártico	22,163	302,1; 418,3	0,20	0,4
L-ácido glutámico	23,63	432,3; 330,3	0,20	0,4
L-asparagina	24,006	417,3; 30,1	0,20	0,4
L-lisina	24,901	300,1; 188,2	0,22	0,4
L-histidina	27,277	196,2; 440,3; 338,3	0,23	0,4
L-tirosina	27,813	302,1; 303,1	0,25	0,5
L-triptófano	28,24	302,130,1; 375,2	0,25	0,5
L-cisteína	33,565	348,2; 188,1	0,25	0,5

[1] Tiempo de retención; [2] Relación masa/carga; [3] Límite de detección; [4] Límite de cuantificación.

Contenido de azúcares reductores

A 200 mg de la muestra de café se adicionaron 1,5 mL de medio de extracción (Metano / HCl 0,1N 80:20) y se sometieron a ultrasonido por 40 min, 37 KHz y 80% de potencia en un ultrasonido Elma - Elmasonic P (Elma Schmidbauer GmbH, Germany); se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, de allí se tomaron 20 µL de extracto, se adicionaron 20 µL de estándar interno y se secó a 45°C en un horno de convección. Al residuo seco se le adicionaron 100 µL de solución de metoxiamina dejando reaccionar por una hora a 40 °C; luego del tiempo de reacción se adicionaron 50 µL de derivatizante BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) y se dejó reaccionar por una hora a 50 °C, finalmente se adicionaron 100 µL de cloroformo quedando la muestra lista para la inyección en el cromatógrafo de gases.

El contenido de azúcares reductores en la materia prima se llevó a cabo en el mismo equipo empleado para la cuantificación de aminoácidos y con las mismas características. Se empleó el método del estándar interno usando ribitol, una columna Zebron ZB-5MSi Guardian 5M. (35 m x 250 µm x 0.25 µm), He como gas portador a un flujo de 1,0 mL/min y un tiempo de corrida de 33,08 min. Los iones empleados para cuantificación e identificación se encuentran resumidos en la Tabla 4. Las condiciones de procesamiento de muestra y de adquisición de las señales fueron adaptadas a partir de la metodología desarrollada por Desbrosses y Col (2005, 165-174).

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de azúcares reductores en café por GC/MS-SIM.

Compuesto	Tr[1]. (min)	*m/z*[2] (ion 100%)
D-(+)-xilosa 1MOX; 4 TMS bp	17,37	103, 217, 307
D-(+)-xilosa 1MOX; 4 TMS mp	17,5	103, 217, 308
D-(+)-arabinosa 1MOX; 4 TMS	17,58	103, 217, 307
D-(+)-ribosa 1MOX; 4 TMS	17,8	103, 217, 307
D-ribitol 5 TMS (ISTD)	18,48	217, 103, 205
D-(+)-fructosa 1MOX; 5 TMS mp	20,81	103, 217, 307
D-(+)-fructosa 1MOX; 5 TMS bp	21	103, 217, 307
D-(+)-glucosa 1MOX; 5 TMS mp	21,07	319, 205, 160
D-(+)-glucosa 1MOX; 5 TMS bp	21,16	319, 205, 217
D-(+)-glucosa 1MOX; 5 TMS bp	21,27	319, 205, 160
D-(+)-galactosa 1MOX; 5 TMS bp	21,49	319, 205, 103
D-(+)-manosa 1MOX; 5 TMS bp	21,54	319, 205, 103
D-manitol 6 TMS	21,76	205, 319, 217
myo-inositol 6 TMS	23,62	217, 305, 318

[1] Tiempo de retención; [2] Relación masa/carga.

Análisis estadístico

Luego de concretar los resúmenes de los resultados de todas las pruebas, se realizó un análisis multivariado PCA para evaluar la máxima varianza, un análisis ANOVA y una matriz de correlaciones para los cuales se tuvieron en cuenta tanto los parámetros fisicoquímicos como las sustancias cuantificadas. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico Minitab 16 amparado bajo licencia de Colcafé.

Resultados y discusión

Caracterización de la materia prima

La elevación o altura de siembra es el factor ambiental más frecuentemente mencionado con respecto a los efectos de origen. Estudios llevados a cabo en Centro América han concluido que los cafés que crecen a mayores alturas son aquellos que representan una mayor calidad y que mínimos cambios climáticos tienen una brusca incidencia sobre la misma (Benoit Bertrand et al., 2006, 2575-2576; Oberthür et al., 2011, 783).

El resumen estadístico de los parámetros fisicoquímicos, L-α-aminoácidos, azúcares reductores y sustancias antioxidantes se ilustran en las tablas 5-8. Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo por gramo de muestra y en base húmeda.

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos medidos a la materia prima (Tabla 5), se encuentran dentro de los valores establecidos por la NTC 5938 de café verde para uso industrial (ICONTEC Internacional, n.d., 4-6), mediante los que se pudo corroborar que correspondía a la calidad excelso. Cuando un solo parámetro de los medidos se encuentra por fuera de esta norma, de inmediato el café es objeto de rechazo para la calificación de excelso y se procede con denominación de menor calidad, disminuyendo sus probabilidades de exportación.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de la materia prima.

Muestra	Densidad (g/L)	Humedad (%)	pH
F1A1CV	543	12,08	5,74
F1A2CV	528	12,98	5,76
F1A3CV	540	12,23	5,79
F2A1CV	543	11,35	5,86
F2A2CV	534	11,68	5,84
F2A3CV	532	11,54	5,85
F3A1CV	536	12,37	5,80
F3A2CV	534	11,84	5,80
F3A3CV	527	13,14	5,81
Media	535,22	12,13	5,81
Desv.Est.	5,89	0,62	0,04
CoefVar	1,10	5,09	0,69

De los más de 40 ácidos clorogénicos del café, los tres cuantificados en este estudio aportan aproximadamente el 90% del contenido total, y aunque los valores encontrados (Tabla 6), se encuentran un poco por debajo de los reportados en la bibliografía (Puerta, 2011, 4), no se debe concluir que la materia prima es de calidad deficiente (Avelino et al., 2005, 1869). Generalmente el contenido de ácidos clorogénicos cuantificados por HPLC como la sumatoria del 3CQA, 4CQA y 5CQA en café arábiga es de 40 mg/g aprox. (Monteiro & Farah, 2012, 612).

Tabla 6. Contenido de polifenoles totales y ácidos clorogénicos en la materia prima.

Muestra	PFT (mg eq GAE/g muestra)	ACGS (mg/g muestra)
F1A1CV	34,25	34,24
F1A2CV	34,76	35,85
F1A3CV	35,85	36,27
F2A1CV	36,60	38,31
F2A2CV	38,36	41,71
F2A3CV	28,96	31,88
F3A1CV	37,27	39,99
F3A2CV	35,57	29,84
F3A3CV	35,14	37,86
Media	35,20	36,22
Desv.Est.	2,66	3,79
CoefVar	7,57	10,47

En el caso de algunos aminoácidos, se pudo evidenciar en la Tabla 7 que mediante la técnica de cuantificación empleada no fueron detectables, lo que no quiere decir que no estén presentes, pues estos son inherentes al metabolismo del café. Según estudios reportados previamente en café verde arábiga usando GC/MS para la cuantificación de estas sustancias, el valor medio de asparagina, quien es el aminoácido precursor en la formación de acrilamida es de 0,2 mg/g (Murkovic & Derler, 2006a, 29); en este estudio los contenidos globales más altos, aunque distan de este valor son los de la Finca 3, por lo que es de esperarse que la materia prima de esta procedencia contenga luego del tostado del café, los valores más altos de acrilamida. Es probable que los valores de aminoácidos que están un poco bajos con respecto a los reportados se deban a las condiciones agroclimáticas y ontogénicas de la planta.

Tabla 7. Contenido de L-α-aminoácidos en la materia prima.

Muestra	L-α-Aminoácidos (mg/g muestra)													
	Alanina	**Glicina**	**Valina**	**Leucina**	**Isoleucina**	**Prolina**	**5-oxoprolina**	**Metionina**	**Serina**	**Treonina**	**Fenilalanina**	**Ácido aspártico**	**Ácido glutámico**	**Asparagina**
F1A1CV	1,36	0,18	0,37	0,25	0,30	0,64	0,2	0,03	0,6	n.d.	0,31	0,44	1,02	**0,05**
F1A2CV	2,02	0,25	0,61	0,44	0,49	0,93	0,27	0,04	0,82	0,04	0,46	0,55	1,16	**0,04**
F1A3CV	1,92	0,25	0,52	0,36	0,43	1,06	0,3	0,02	0,99	0,04	0,39	0,77	1,16	**0,04**
F2A1CV	1,79	0,19	0,42	0,29	0,35	0,85	0,19	0,05	0,41	0,03	0,37	0,41	0,76	**0,08**
F2A2CV	1,66	0,17	0,42	0,29	0,35	0,80	0,14	0,05	0,4	0,03	0,36	0,37	0,49	**n.d.**
F2A3CV	1,69	0,18	0,41	0,27	0,34	0,78	0,13	0,04	0,39	0,03	0,37	0,32	0,14	**n.d.**
F3A1CV	1,83	0,24	0,49	0,36	0,38	0,81	0,3	0,03	0,67	0,04	0,39	0,56	1,83	**0,07**
F3A2CV	1,74	0,22	0,47	0,35	0,38	0,79	0,23	0,04	0,53	0,03	0,33	0,38	1,26	**0,03**
F3A3CV	2,51	0,25	0,55	0,4	0,43	1,06	0,31	0,04	0,78	0,04	0,39	0,61	1,96	**0,11**
Media	1,83	0,21	0,47	0,33	0,38	0,86	0,23	0,04	0,62	0,03	0,37	0,49	1,09	**0,05**
Desv.Est.	0,31	0,04	0,08	0,06	0,06	0,14	0,07	0,01	0,21	0,01	0,04	0,14	0,58	**0,04**
CoefVar	17,05	16,49	16,51	18,94	15,11	16,03	29,61	22,26	34,24	41,06	11,09	29,07	53,64	**77,19**

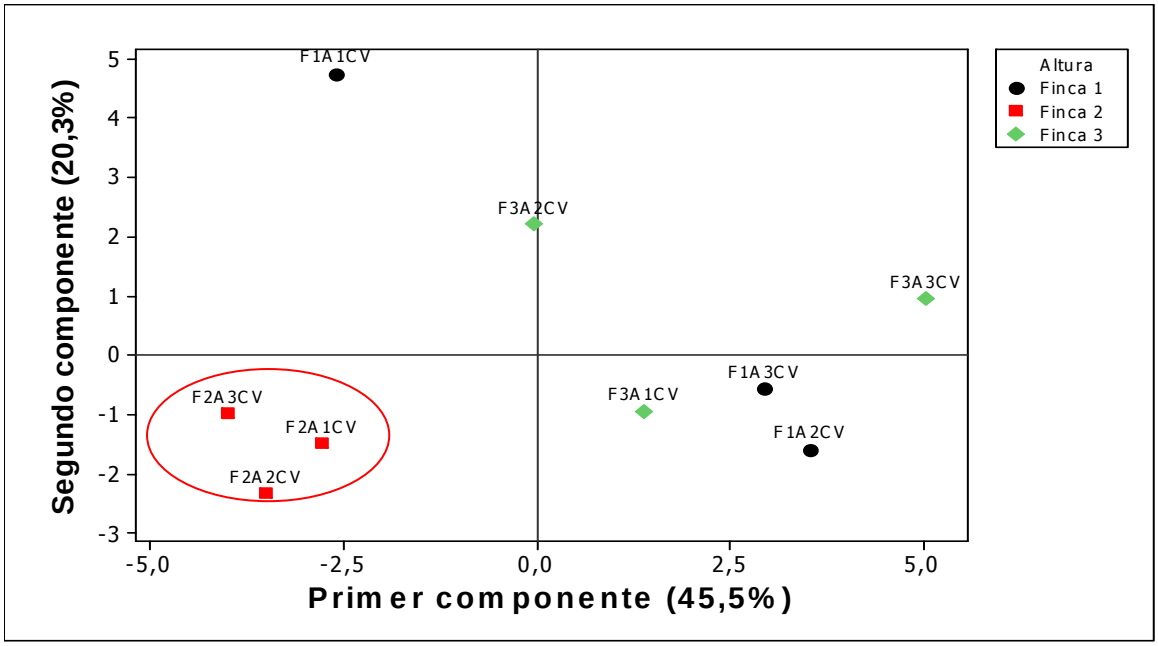
En cuanto al contenido de azúcares reductores (Tabla 8), la glucosa y la fructosa quienes son los principales azúcares involucrados en la formación de acrilamida, reportan los valores globales más altos en las fincas 1 y 3 por lo que se espera que luego del tostado de estas materias primas se produzcan también los niveles más altos de acrilamida, en especial el café proveniente de la finca 3. La literatura reporta valores medios de 2,2 mg/g de glucosa y 1,9 mg/g fructosa cuantificados por GC/MS en café arábiga (Murkovic & Derler, 2006a, 30); es probable que los valores de azúcares un poco bajos con respecto a los reportados se deban a las condiciones agroclimáticas y ontogénicas de la planta, o a que el proceso de secado al sol como parte del beneficio del café fue algo corto (Kleinwächter & Selmar, 2010, 500). Es importante anotar que la Finca 2 contiene los niveles globales más bajos de todos los azúcares y que no se detectaron niveles de D-(+)-ribosa.

Tabla 8. Contenido de azúcares reductores en la materia prima.

Muestra	Azúcares reductores (mg/100 g muestra)					
	D-(+)-ribosa	D-(+)-fructosa	D-(+)-glucosa	D-(+)-galactosa	D-manitol	myo-inositol
F1A1CV	0,47	12,45	9,15	1,13	0,89	9,57
F1A2CV	0,33	7,19	4,97	0,68	5,8	7,99
F1A3CV	0,42	8,81	4,56	0,63	4,28	5,85
F2A1CV	n.d.	2,08	1,66	0,24	0,52	7,33
F2A2CV	n.d.	1,92	1,71	0,26	12,96	7,59
F2A3CV	n.d.	1,90	1,60	0,24	0,63	7,01
F3A1CV	0,25	5,82	2,50	0,37	0,35	5,93
F3A2CV	0,33	27,55	11,08	1,39	0,53	7,07
F3A3CV	0,35	35,28	12,72	1,54	0,89	7,99
Media	0,24	11,44	5,55	0,72	2,98	7,37
Desv.Est.	0,19	12,01	4,35	0,51	4,22	1,13
CoefVar	79,23	104,98	78,32	70,96	141,43	15,36

Una vez se tuvieron todos estos resúmenes estadísticos (parámetros fisicoquímicos, L-α-aminoácidos, azúcares reductores y sustancias antioxidantes), se realizó un screening inicial mediante PCA (Figuras 3 y 4) en el que se emplearon los dos primeros componentes que explican 65,8% de la variabilidad. La gráfica de puntuación (Figura 3), mostró como la Finca 2 se agrupó de manera muy marcada en comparación con las otras dos fincas, comportamiento que se da probablemente según los bajos contenidos de azúcares reductores y aminoácidos encontrados en las muestras procedentes de esta finca; de ser así, esto debería reflejarse en la gráfica de cargas.

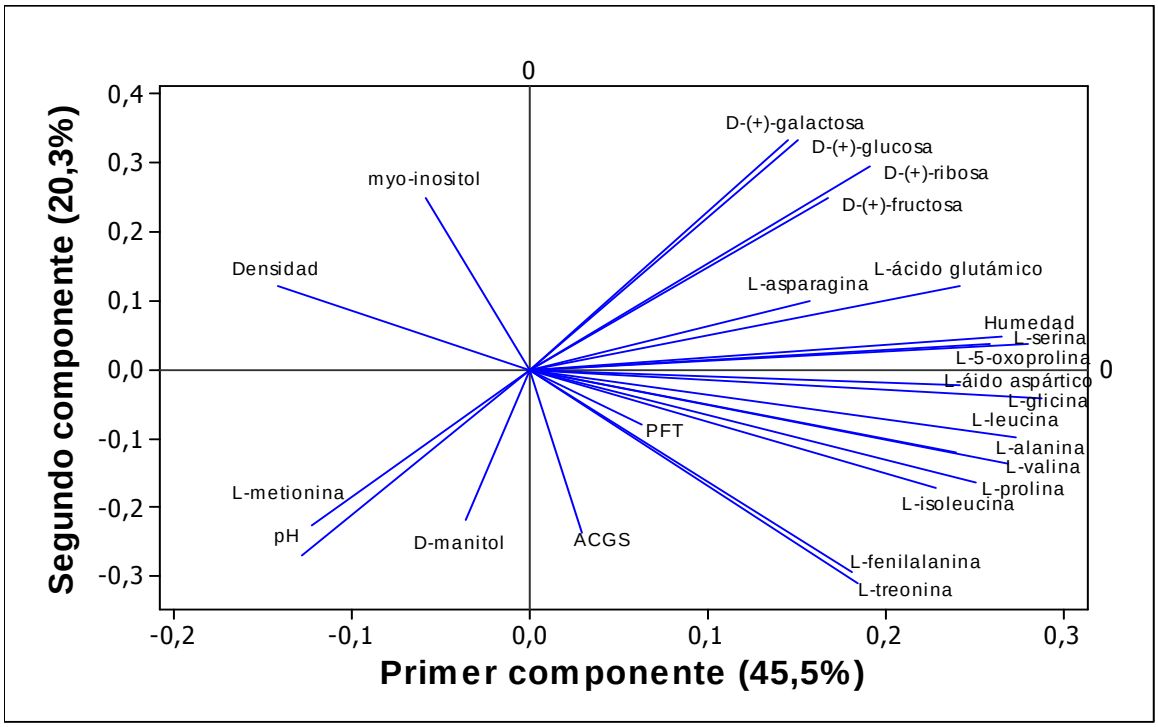
Figura 3. Gráfica de puntuación (PCA) en la materia prima para todos los parámetros cuantificados.



En la figura 4, en efecto se puede confirmar de manera visual la hipótesis de que a excepción del myo-inositol, el contenido de todos los azúcares reductores, y el contenido de algunos aminoácidos como L-metionina, L-asparagina, L-ácido glutámico,

L-serina y L-5-oxoprolina son aquellos que hacen que la Finca 2 se agrupe de manera marcada y se aleje de las otras dos fincas, pues sus vectores en la gráfica de cargas se situaron en el mismo cuadrante en el cual ella se agrupa en el gráfico de puntuación y de manera perpendicular. Este comportamiento también aplica en los valores de pH y humedad encontrados.

Figura 4. Gráfica de cargas (PCA) en la materia prima para todos los parámetros cuantificados.



Este PCA también mostró que las Fincas 1 y 3 son similares en los parámetros cuantificados, pero debido a que el análisis PCA es descriptivo, se llevó a cabo un análisis mediante una ANOVA lineal general para confirmar este modelo y evidenciar si las diferencias encontradas con la Finca 2 respecto a las otras dos fincas son significativas ($p < 0,05$) y qué parámetros hacen que se presente o no esta diferencia (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de ANOVA para diferencias significativas en materia la prima.

Variable	Valor F	Valor P	R cuadrado (%)	R cuadrado ajustado (%)
L-5-oxoprolina	6,66	0,030	68,94	58,58
L-serina	6,78	0,029	69,33	59,10
L-ácido glutámico	13,98	0,006	82,33	76,44
D-(+)-ribosa	53,69	0,000	94,71	92,94
pH	22,09	0,002	88,04	84,06

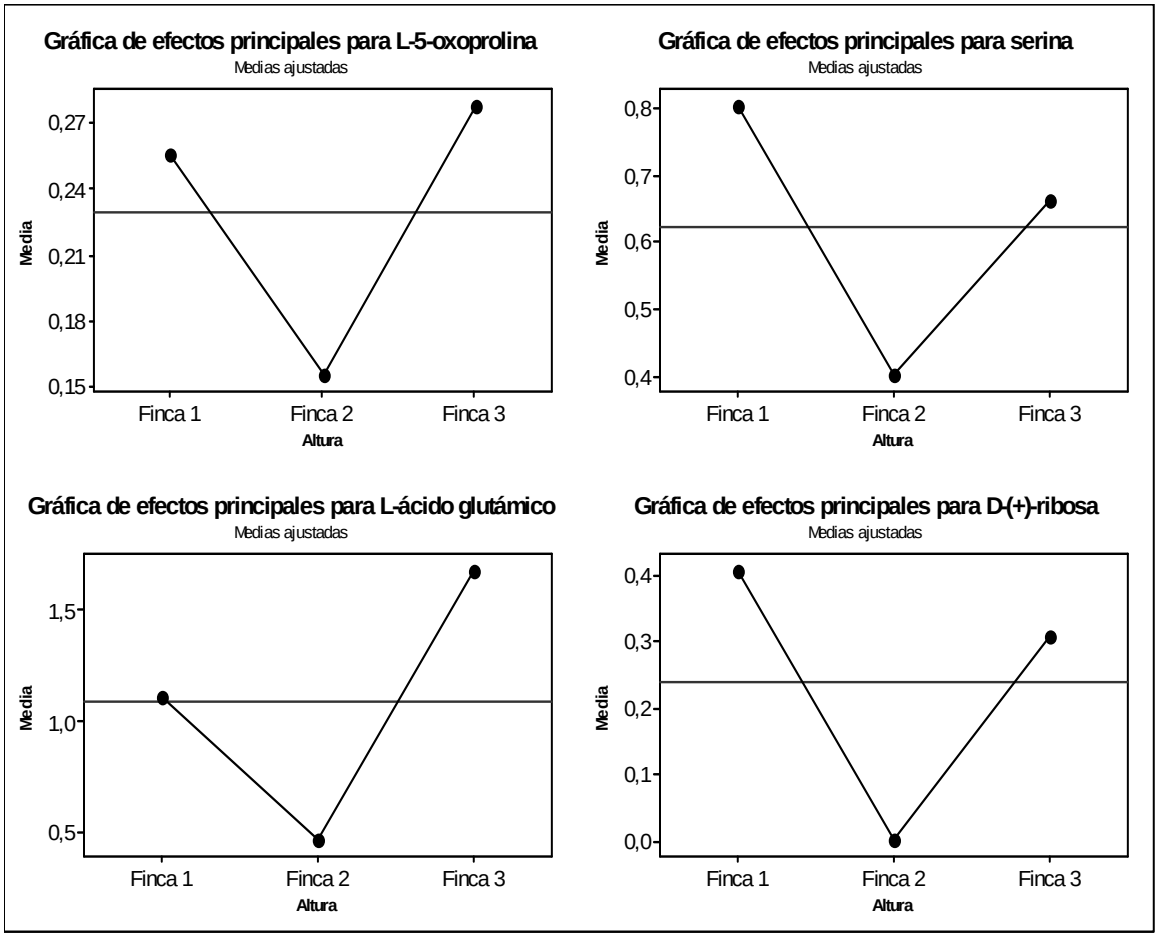
Mediante esta ANOVA lineal general se evaluaron los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad de las varianzas e independencia de las muestras sobre los residuales y se determinó que en realidad los contenidos de D-(+)-ribosa, el pH, el L-ácido glutámico, la L-serina y la L-5-oxoprolina del café perteneciente a la Finca 2 son significativamente diferentes ($p<0,05$), lo que hace que esta finca se comporte diferente.

En la Figura 5 de efectos principales se mostró como los bajos valores de L-5-oxoprolina, L-serina, L-ácido glutámico y D-(+)-ribosa son aquellos que hacen que la Finca 2 se agrupe en un extremo del PCA, pues se encuentran debajo del valor medio para cada uno de ellos.

Debido a que la formación de acrilamida ocurre por la condensación de la asparagina, de la cual no se observó diferencia significativa, con los azúcares reductores, principalmente D-(+)-glucosa y D-(+)-fructosa que tampoco mostraron esta diferencia, y aunque la D-(+)-ribosa que si mostró diferencia significativa es un azúcar reductor, no existe literatura que relacione directamente este azúcar con la formación de acrilamida de manera significativa. La diferencia significativa que se encontró para el

valor de pH, está explicada por el hecho de que posiblemente los granos no tenían el mismo grado de madurez entre las tres fincas, siendo los de la Finca 2 más inmaduros.

Figura 5. Gráficas de efectos principales para los parámetros con diferencias significativas en la materia prima.



Como el PCA inicial o de screening contenía todas las variables y sustancias medidas, se realizó un segundo PCA en el que solo se incluyeran los azúcares reductores y los aminoácidos como familias que contienen a los compuestos precursores de la acrilamida (Figuras 6 y 7).

Figura 6. Gráfica de puntuación (PCA) para los aminoácidos y azúcares en la materia prima.

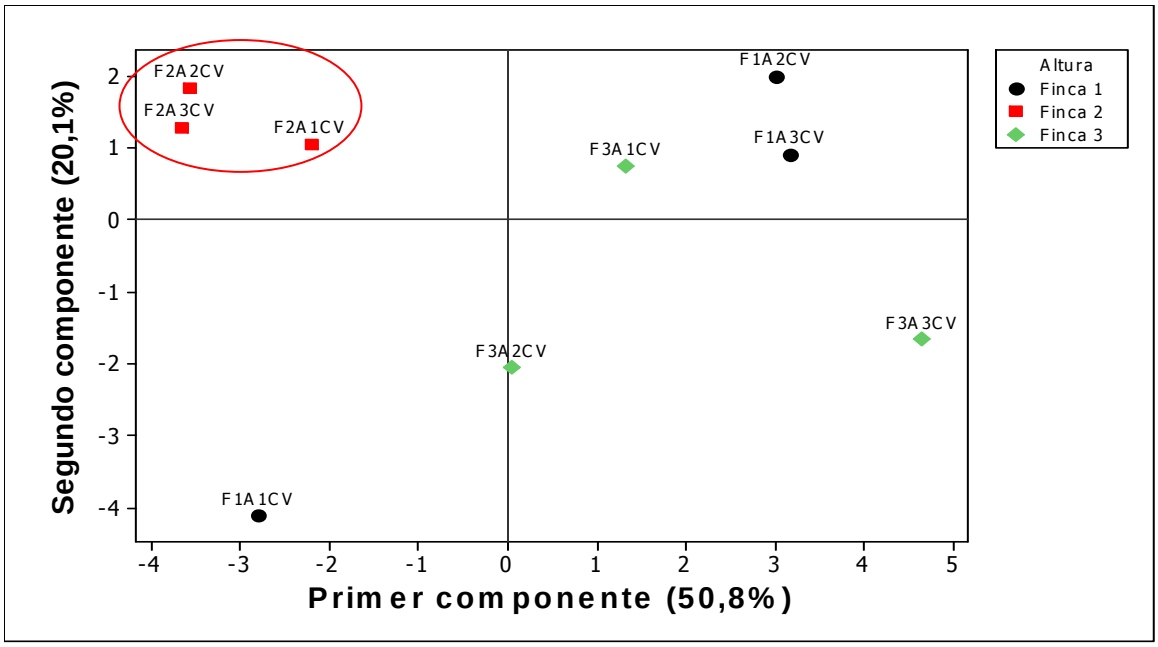
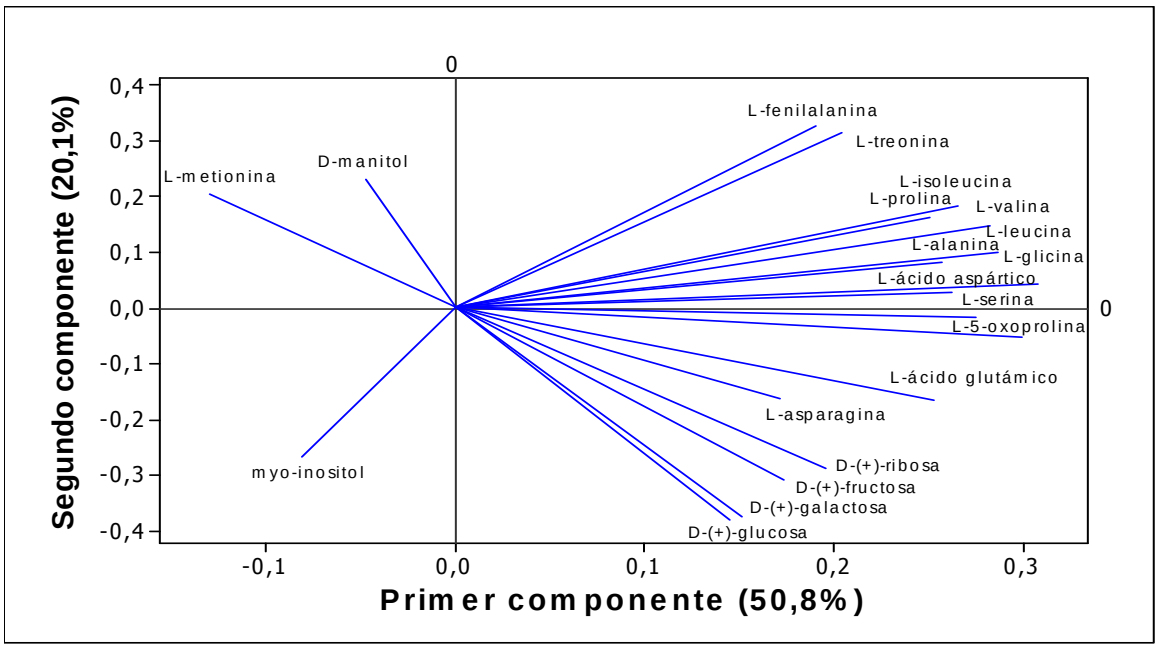


Figura 7. Gráfica de cargas (PCA) para los aminoácidos y azúcares en la materia prima.



Estos gráficos que explican el 70,9% de la variación en sus dos primeros componentes, ilustraron nuevamente lo que se observó en las Figuras 3 y 4: la Finca 2 se agrupó de manera muy marcada como se ve en la gráfica de puntuación, lo que no ocurre para las otras dos fincas, y el gráfico de vectores atribuye esta diferencia de la Finca 2 a las mismas sustancias que se evidenciaron en la figura 5, pero como ya se mencionó anteriormente, estas gráficas son descriptivas y solo la ANOVA permitió corroborar que de estas sustancias, aunque se encuentran en una menor cantidad en el café de la Finca 2, no todas hacen que la diferencia sea significativa.

Luego de que se establecieron estas diferencias significativas entre los diferentes metabolitos y parámetros fisicoquímicos de las diferentes fincas, se procedió con la elaboración de la matriz de correlaciones (Tabla 10), para establecer cuáles guardaban una correlación significativa entre ellos, teniendo en cuenta como criterio de aceptación un valor $p<0,05$ y una correlación superior al 80% (positiva o negativa).

De estas correlaciones es importante destacar que los aminoácidos guardan correlaciones entre sí al igual que los azúcares pues estos comparten la misma ruta metabólica. Esto cobra importante relevancia si se toma en cuenta el hecho de que la condensación entre los aminoácidos y los azúcares vía Maillard, es la que produce los compuestos volátiles que le confieren el agradable aroma al café y las melanoidinas que le dan el tono pardo (Ludwig, Sánchez, De Peña, & Cid, 2014, 67-68), además de constituirse en poderosas sustancias antioxidantes.

Tabla 10. Matriz de correlaciones para la materia prima.

VARIABLE	Tipo	Alanina	Glicina	Valina	Leucina	Isoleucina	5-oxoprolina	Metionina	Serina	D-(+)-ribosa	D-(+)-fructosa	D-(+)-glucosa
Valina	Corr.		0,910									
	Valor p		0,001									
Leucina	Corr.		0,922	0,981								
	Valor p		0,000	0,000								
Isoleucina	Corr.		0,862	0,982	0,943							
	Valor p		0,003	0,000	0,000							
Prolina	Corr.	0,866										
	Valor p	0,003										
5-oxoprolina	Corr.		0,953		0,820							
	Valor p		0,000		0,007							
Serina	Corr.		0,882				0,878					
	Valor p		0,002				0,002					
Fenilalanina	Corr.			0,841		0,853						
	Valor p			0,005		0,003						
Ácido aspártico	Corr.		0,839				0,870		0,949			
	Valor p		0,005				0,002		0,000			
Ácido glutámico	Corr.						0,901					
	Valor p						0,001					
D-(+)-ribosa	Corr.							-0,806				
	Valor p							0,009				
D-(+)-glucosa	Corr.										0,949	
	Valor p										0,000	
D-(+)-galactosa	Corr.										0,947	0,999
	Valor p										0,000	0,000
pH	Corr.									-0,892		
	Valor p									0,001		

La tabla completa de correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos medidos y las sustancias cuantificadas en la materia prima se encuentra en el Apéndice A.

Desde que empezaron a emerger los café tipo Gourmet, los países productores han mostrado un aumento en el interés por entender cómo los factores ambientales y las técnicas locales afectan la calidad del mismo, lo que algunos autores llaman el efecto *terroir* o efecto por el territorio (Avelino et al., 2005, 1872). Para el caso particular de esta investigación, el café estudiado se seleccionó de manera que la variedad, calidad, fecha de colección, región del País y las prácticas pre y pos cosecha fueran las mismas; en ese sentido el efecto *terroir* se dio básicamente por las diferentes alturas de siembra, con la cual los microclimas y composición de los suelos pueden ser cambiantes y como resultado se podrían presentar diferencias significativas en el contenido de los aminoácidos, azúcares reductores y sustancias antioxidantes cuantificadas, y aunque la asparagina y la glucosa como precursores mayoritarios de acrilamida son el principal interés, las otras sustancias podrían exhibir una correlación con la formación de acrilamida y más importante aún, podrían comportarse como marcadores del metabolismo del café de las diferentes fincas ayudando a entender qué tan variables son estas materias primas y como esa variación puede afectar la calidad del producto terminado y del contenido de acrilamida. Probablemente estos resultados también obedecen a que los granos no poseían el mismo grado de madurez.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, tanto la densidad como el porcentaje de humedad permanecen constantes entre las diferentes muestras. En el caso del pH, el cual está ligado directamente con la cantidad de ácidos orgánicos presentes en el

café, principalmente con los ácidos cítrico y málico (S. Oestreich-Janzen, Gmbh, 2010, 19-23), la Finca 2 mostró una diferencia significativa con respecto a las otras dos fincas, pero al no contar con una cuantificación exacta de estos ácidos orgánicos, este parámetro solo podrá ser interpretado como un marcador de calidad en la taza, es decir, en el producto final luego de tostado y molido para el descriptor “acidez”.

Aunque en una menor proporción, los ácidos clorogénicos también contribuyen con la percepción de acidez en el café, al no mostrar diferencias significativas en su contenido para las tres fincas, no se puede decir que estos son los responsables de que la Finca 2 produzca café con un pH diferente a las demás, sino que probablemente los granos provenientes de esta finca no tenían el mismo grado de madurez.

Los polifenoles se consideran uno de los grupos de metabolitos secundarios más grandes entre las materias primas de origen vegetal y su contenido varía tanto con las condiciones de crecimiento como con los estímulos ambientales. Su papel fisiológico en las plantas ha sido relacionado con la defensa y sus moléculas pueden ser simples como complejas al sufrir polimerizaciones (Gil, 2012, 18). Los polifenoles más abundantes en el café son los ya nombrados ácidos clorogénicos, una familia de más de 40 compuestos en los que los ácidos 5, 3 y 4 CQA contribuyen con más del 90% del contenido total (Li Kwok Cheong et al., 2014, 46-47; Suárez-Quiroz et al., 2014, 56-57). En el café verde, el contenido de polifenoles totales evaluado por método de Folin Ciocalteu es prácticamente el mismo que de ácidos clorogénicos, esto se da debido a que el método de Folin es una coloración en la que pueden o no reaccionar más o menos sustancias de tipo fenólico, por lo que esta medición en el café debe

considerarse como un screening inicial y el contenido exacto debe ser verificado por una metodología más exacta como HPLC.

Afortunadamente el contenido de sustancias antioxidantes consideradas como metabolitos de sumo interés en el café debido a sus numerosas propiedades beneficiosas para la salud, no presentó diferencias significativas entre las diferentes materias primas, por lo que en términos de calidad escoger una u otra materia prima no será otro factor a tener en cuenta.

Los aminoácidos y los azúcares del café verde son los principales componentes que contribuyen con la formación del aroma y color durante el tostado, así como con sustancias indeseadas como el 5-HMF o la acrilamida, por ello es de suma importancia tener el conocimiento a cerca de estos precursores que pueden ser transformados a componentes potencialmente peligrosos (Murkovic & Derler, 2006, 25-32).

En el café verde, el aminoácido que se encuentra en mayor proporción según la literatura es la alanina (Murkovic & Derler, 2006, 25), lo cual coincide con los resultados aquí obtenidos y corrobora la calidad de la materia prima, pero más importante aún es que en términos de calidad, el aminoácido más abundante no muestra diferencias significativas entre las materias primas estudiadas, lo que conduce a elucidar lo mismo que en el caso de las sustancias antioxidantes: luego de tostado el café, el contenido de aminoácidos no será un criterio de discriminación. Es importante también destacar que aunque si se presentaron diferencias significativas en el contenido de L-5-oxoprolina, L-ácido glutámico y L-serina, estos aminoácidos no son precursores de acrilamida ni tampoco son mayoritarios en el café verde, por lo que una vez

cuantificada la acrilamida es necesario establecer un modelo que identifique si estos están o no correlacionados con su formación.

Los carbohidratos son productos de la fotosíntesis de las plantas y se producen de manera simultánea tanto en el fruto del café (berry) como en las hojas. Estos se ven altamente influenciados por la manera en que es beneficiado y secado el café y suelen concentrase en materias primas más maduras (Kleinwächter & Selmar, 2010, 500); en este caso, el mismo beneficio húmedo y secado al sol del café en las tres fincas mostró como el perfil de los azúcares reductores varía un poco, lo que puede atribuirse a periodos distintos de exposición al sol o al estado de madurez de algunos granos.

De estos azúcares reductores, el único que mostró una diferencia significativa en su contenido para las tres fincas fue la D-(+)-ribosa, de la cual no se reportan datos concluyentes sobre una significativa formación de acrilamida a partir de ella, por el contrario los reportes se han basado principalmente sobre el contenido de glucosa y fructosa, y para estos, no se evidenció diferencia significativa. Así, parece que estos metabolitos al igual que los compuestos antioxidantes y aminoácidos no se traducen en un factor de exclusión de las diferentes materias primas.

Capítulo 2: Cuantificación de la acrilamida en el café tostado y molido: evaluación de su comportamiento

La calidad organoléptica y el contenido de sustancias de interés en una taza de café son el resultado final de una serie de eventos que inician con la consecución de una materia prima de alta calidad (Barbosa et al., 2012, 500-504; Oliveira et al., 2005, 287-288) y termina con el proceso industrial bajo parámetros estrictamente controlados (Oberthür et al., 2011, 783-794).

Las sustancias de interés biológico consideradas como precursoras de otras que aparecen en el proceso de tostado del café, pueden ubicarse en dos categorías: aquellas que son deseadas como por ejemplo algunos ácidos grasos e isopropanoides que le confieren sus deliciosas notas aromáticas, melanoidinas que le dan el tono pardo y sabor, o mejor aún, polifenoles que se conservan desde el café verde hasta el café tostado como los ácidos clorogénicos, a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes, y un segundo grupo de sustancias no deseadas como algunas aminas biógenas, el 5-HMF o la acrilamida (Loaëc, Jacolot, et al., 2014, 593).

Las cantidades de acrilamida formadas dependen no solo de sus precursores, sino también del proceso de tostado, pues a medida que se varían el tiempo y la temperatura algunos reactantes tienden a consumirse de manera diferente, pero estas variaciones en esta etapa del proceso productivo del café son estrictamente necesarias pues de ello depende la obtención de diferentes perfiles de taza que son solicitados por los diversos públicos consumidores de café (Costa et al., 2014, 350).

A nivel mundial, específicamente en Europa y Estados Unidos, la acrilamida ha sido objeto de estudio por más de una década, sin embrago en Colombia, solo hasta hace un par de años se ha comenzado a trabajar el tema en algunas matrices alimenticias, pero desafortunadamente no se han reportado estudios ni en café ni sobre cómo se da la posible relación entre su calidad y grado de tostado con el contenido final de acrilamida, situación que es preocupante si consideramos que el café es nuestro producto insignia y la matriz agrícola de mayor exportación de Colombia, por lo que es importante estar atentos y listos a las exigencias de los mercados nacionales e internacionales.

Por ello, teniendo en cuenta la mayor cantidad de factores posibles que puedan influenciar los contenidos finales de acrilamida en nuestro café, se diseñó un estudio en el que después de una estricta trazabilidad en la obtención de la materia prima y su caracterización, se procediera con la validación de una nueva metodología para la cuantificación de acrilamida en el café tostado a tres grados diferentes y molido.

Materiales y métodos

Tostado de la materia prima

Para el tostado de la materia prima se empleó un tostador automático piloto marca Diedrich IR (2.5 Germany) con capacidad de carga de 2,5 Kg/h. El tostador fue programado para iniciar a tostar a 180 °C y se establecieron tres temperaturas finales, alta, media y baja, dependiendo del grado de tostado deseado: alto, medio y bajo, siendo el tiempo de tostado dependiente de dicha temperatura final. La carga para el tostador fue de 500g de muestra y cada tostada se llevó a cabo por triplicado para tener una muestra representativa. Los niveles de tostado fueron establecidos según tres perfiles de taza deseados y propuestos por expertos catadores de Colcafé obedeciendo a propósitos comerciales (Tabla 11).

Caracterización de la muestra: molienda, extracción y determinación de los parámetros fisicoquímicos

Los granos de café tostado fueron molidos (780-840 micras tostado bajo, 520-580 micras tostado medio, 430-460 tostado alto) en un molino Mahloköning VTA6S3 (Germany), posteriormente 30g fueron sometidos a extracción en una cafetera doméstica marca SAMURAI Café City 12 con 500 mL de agua ultra pura durante 7 minutos; esta relación agua/café corresponde a un parámetro de perfil de producto en Colcafé.

Tabla 11. Niveles de tostado y codificación de las muestras.

Muestra	Nivel de tostado	Temperatura de carga	Codificación
F1A1CV	Bajo	180 °C	F1A1TB
	Medio		F1A1TM
	Alto		F1A1TA
F1A2CV	Bajo		F1A2TB
	Medio		F1A2TM
	Alto		F1A2TA
F1A3CV	Bajo		F1A3TB
	Medio		F1A3TM
	Alto		F1A3TA
F2A1CV	Bajo		F2A1TB
	Medio		F2A1TM
	Alto		F2A1TA
F2A2CV	Bajo		F2A2TB
	Medio		F2A2TM
	Alto		F2A2TA
F2A3CV	Bajo		F2A3TB
	Medio		F2A3TM
	Alto		F2A3TA
F3A1CV	Bajo		F3A1TB
	Medio		F3A1TM
	Alto		F3A1TA
F3A2CV	Bajo		F3A2TB
	Medio		F3A2TM
	Alto		F3A2TA
F3A3CV	Bajo		F3A3TB
	Medio		F3A3TM
	Alto		F3A3TA

Luego de la molienda de las muestras se determinó la densidad, el porcentaje de humedad en una balanza de humedades Halogen HR83 (Mettler Toledo, Switzerland) y color en un colorímetro Huter Lab D25LT (USA), y en la bebida se determinó su pH en un pH-metro SevenEasy 8603 (Mettler Toledo, Switerland).

Perfil sensorial de las muestras

Una vez tostadas y molidas las muestras, estas se perfilaron por los expertos en catación del panel sensorial de Colcafé compuesto por 61 catadores los cuales evaluaron los atributos de fragancia, aroma, acidez y cuerpo, para emitir una impresión global siguiendo la NTC 5938 para la calificación de café excelso (ICONTEC Internacional, n.d., 6).

Contenido de polifenoles totales y ácidos clorogénicos

Estas cuantificaciones se llevaron a cabo según los mismos métodos descritos en el capítulo 1.

Contenido de L-α-aminoácidos residuales y azúcares reductores residuales

Estas cuantificaciones se llevaron a cabo según los mismos métodos descritos en el capítulo 1.

Desarrollo y validación de una nueva metodología analítica por GC/MS para la cuantificación de acrilamida

Como se mencionó en el marco teórico, la cromatografía gaseosa es la segunda metodología más empleada en la cuantificación de acrilamida, pero no todos los laboratorios la desarrollan exactamente igual. En Colombia, esta es la primera vez que se reporta el desarrollo y validación de esta metodología para la cuantificación de acrilamida en café por GC/MS.

Para el desarrollo y validación de la metodología se empleó un cromatógrafo gaseoso marca Agilent modelo 7098A acoplado a un detector de masas simple modelo 5975C equipado con sistema de inyección automática de líquidos, puerto de inyección capilar split/splitless, sistema de detección MSD de alta sensibilidad y especificidad operando en modo SIM. El instrumento se sintonizó en modo automático (Atune) al inicio y durante el desarrollo de los análisis.

En la presente validación se evaluaron los parámetros de límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión, exactitud y selectividad/especificidad en una matriz de café molido en agua acidulada.

Preparación de la muestra:

1,0g de café tostado y molido se extrajo con 10 mL de ácido fórmico al 0,1% $^{v}/_{v,}$ se agitó en vortex por 1 min, se llevó a ultrasonido por 20 min, 37 KHz y 80% de potencia en un ultrasonido Elma - Elmasonic P (Elma Schmidbauer GmbH, Germany); posteriormente se centrifugó por 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante se filtró en acrodiscos de nylon de 0,45µm y 2,0mL se pasaron a presión atmosférica a través de un cartucho de SPE de carbón grafitado (Carboprep™ 200, 6 mL, 500 mg) previamente acondicionado. Se aplicó vacío durante 10 min para eliminar el exceso de agua y por último se eluyó el cartucho con 3,0 mL de acetona quedando la muestra lista para inyección en el GC/MS. La cuantificación se llevó a cabo por medio del método de estándar interno usando propionamida, una columna J&W 122-7032: 2877.29946 DB-WAX 250 °C (30 m x 250 µm x 0.25 µm), He como gas portador a un flujo de 1,0

mL/min y un tiempo de corrida de 21,727 min. Las condiciones cromatográficas se ilustran en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de acrilamida en café tostado y molido.

Compuesto	Tr[1]. (min)	*m/z*[2]
Acrilamida	14,5	55, 71, 20
Propionamida	13,3	57, 72, 73

[1] Tiempo de retención; [2] Relación masa/carga

Validación de la metodología analítica:

Concentración mínima detectable (Límite de detección).

Es la cantidad de concentración de un analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco (y_{SB}) más tres veces la desviación estándar del blanco SB (Food and Drug Administration, 2001, 4-8; Ortega, García, & Junca, 2011, 209-249). En esta validación se inyectaron diferentes niveles de concentración (6 veces cada inyección), hasta que se llegó a uno de ellos que proporcionaba una RSD<10,0%.

Concentración mínima cuantificable (Límite de cuantificación).

Concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud (Food and Drug Administration, 2001, 4-8; Ortega, García, & Junca, 2011, 209-249). Para metodologías bioanalíticas el límite de cuantificación debe cumplir los siguientes requisitos:

- La respuesta de la señal del analito debe ser mínimo tres veces el ruido.

- Reproducible con coeficiente de variación menor del 20% y exactitud de 80 a 120%.

En la metodología empleada se realizaron diluciones de acrilamida en el nivel 1 de la curva de calibración, cada dilución con cinco replicas hasta llegar al nivel que cumpliera los criterios establecidos

Linealidad.

Cuando se varía la concentración de un analito debe haber un cambio significativo en la respuesta del instrumento de manera proporcional en el rango de concentraciones estudiadas (Food and Drug Administration, 2001, 4-8; Ortega, García, & Junca, 2011, 209-249). En esta validación se consideraron seis concentraciones distribuidas (Tabla 13); se tomaron dos calibraciones, una para cada analito, en un rango que cubre la respuesta del detector para las muestras de un estudio piloto. Para esta prueba de linealidad se evaluó la homocedasticidad o prueba para demostrar que la varianza de los errores es constante, es decir, la homogeneidad de la varianza.

Tabla 13. Distribución de concentraciones en seis niveles de las curvas de calibración de acrilamida.

Sustancias	Concentración (ng/mL)					
	N6	**N5**	**N4**	**N3**	**N2**	**N1**
Acrilamida	600	400	200	100	50	25
ISTD	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Precisión.

Es la concordancia mutua entre datos que se han obtenido de la misma forma e indica la medida del error aleatorio de un análisis (Food and Drug Administration, 2001,

4-8; Ortega, García, & Junca, 2011, 209-249) y es valorada mediante la repetibilidad y la reproducibilidad, las cuales se refieren a la concordancia de los resultados recolectados por el mismo investigador, los mismos reactivos, laboratorio e instrumento en un corto periodo de tiempo evaluadas determinando el coeficiente de variación

$$\%CV = (s/x) * 100$$

S: desviación estándar

X: media aritmética.

1. Repetibilidad instrumental

Se preparó una solución stock del estándar interno y acrilamida y se evaluó posterior a ser preparada, en cada evaluación cromatográfica de las dos sustancias se inyectó un número superior a 6 veces y se colectaron datos de 4 días diferentes.

2. Reproducibilidad del método

La muestra fue preparada 6 veces independientes en diferentes fechas y cada muestra fue inyectada por triplicado.

Exactitud.

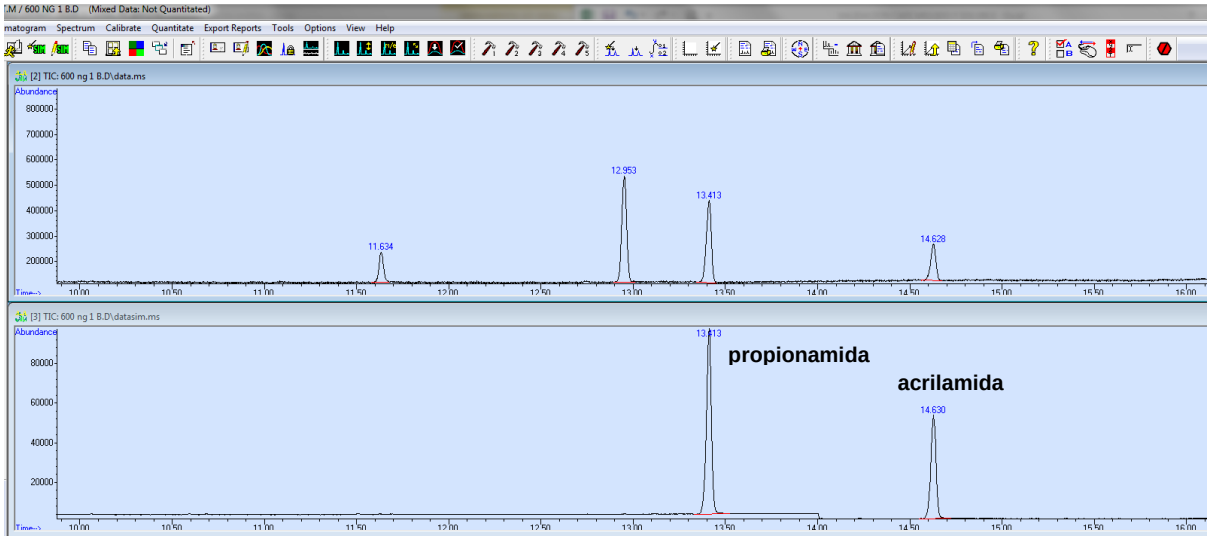
Se refiere a la concordancia entre el valor verdadero y el valor experimental; para tal efecto la recuperación del analito en un ensayo es índice de la exactitud de una medida. La exactitud medida como el porcentaje de recuperación se calcula comparando su coeficiente de variación mediante comparación del valor G experimental de las varianzas (Test de Cochran) (Food and Drug Administration, 2001, 4-8; Ortega, García, & Junca, 2011, 209-249). En esta validación, la matriz de café fue enriquecida (dopada) a tres niveles diferentes de concentración del analito (acrilamida)

y fue sometida al proceso de extracción para posteriormente evaluar qué porcentaje del analito adicionado es recuperado; la prueba se realizó por triplicado y en fechas diferentes.

Selectividad / Especificidad.

Se considera selectividad como la habilidad de un método para diferenciar y cuantificar uno o varios analitos en presencia de otros componentes que se sospecha puedan estar presentes en la muestra (Food and Drug Administration, 2001, 4-8; Ortega, García, & Junca, 2011, 209-249). Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz vegetal incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de degradación, impurezas, etc. La selectividad se evaluó inyectando varias muestras de la matriz vegetal (extractos de café) con el fin de detectar el efecto de la matriz sobre la pureza espectral. El método se considera selectivo si ninguno de los blancos u otras sustancias analizadas presenta el mismo tiempo de retención de los analitos de interés (Figura 8).

Figura 8. Cromatograma (SCAN-SIM) acrilamida y propionamida.



Análisis estadístico

Luego de concretar los resúmenes de los resultados de todas las pruebas, se realizó un análisis multivariado PCA para evaluar la máxima varianza, un análisis ANOVA y una matriz de correlaciones para los cuales se tuvieron en cuenta tanto los parámetros fisicoquímicos como las sustancias cuantificadas También se realizó un análisis PLS el cual se elaboró por grado de tostado. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico Minitab 16 amparado bajo licencia de Colcafé

Resultados y discusión

Cuantificación de la acrilamida en el café tostado y molido: evaluación de su comportamiento

El tostado del café se puede llevar a cabo a temperaturas entre los 150-300 °C para convertir ese “green baggy” del café verde en placenteras notas ahumadas. Sustancias específicas son las encargadas de estos cambios que ocurren durante la reacción de Maillard, degradación de Streker y pirolisis entre aminoácidos y azúcares, formando una gran variedad de compuestos monoméricos y poliméricos que influencian las características organolépticas o que son convertidos en “tóxicos neoformados” como la acrilamida (Bagdonaite, Derler, & Murkovic, 2008, 6081). En el presente estudio, los tres niveles de tostado (bajo, medio y alto) corresponden a perfiles de interés comercial para la Compañía.

Son muchos los factores de los cuales depende la formación de acrilamida en el café: la cantidad y disponibilidad de sus sustancias precursoras, las cuales a su vez dependen de múltiples factores descritos en el capítulo 1, el grado y forma de tostado, la especie de café, la metodología de preparación de la taza, entre otras (Taeymans et al., 2004, 323-347).

En ese orden de ideas, y tomando desde la literatura que ciertos parámetros fisicoquímicos pueden estar relacionados con la formación y las cantidades de acrilamida, la primera medición que se llevó a cabo fue la de estos parámetros en el café tostado y molido. Esto cobra vital importancia si se tiene en cuenta que muchos estudios han relacionado el color con el contenido de acrilamida (Alves et al., 2010,

929-931; Gökmen & Şenyuva, 2006, 238); la intrínseca relación entre el color del café tostado y la acrilamida es evidente pues el color aumenta con el tiempo y temperatura de tostado, y esto a su vez interviene en la formación de más o menos acrilamida, además, estudios han determinado que a menor contenido de agua, la acrilamida se forma de manera más sustancial (De Vleeschouwer et al., 2007, 722), hecho que guarda relación con los valores de merma obtenidos en este estudio, donde a mayor valor de la merma, menor contenido de agua y mayor contenido de acrilamida, entendiéndose la merma del café como el peso perdido por eliminación de agua luego del tostado.

La densidad está relacionada con la humedad inicial de la materia prima, donde valores superiores a 14% de humedad en el grano verde son un parámetro de rechazo, puesto que cuando el café sufre el proceso de tostado se producirá bastante irregularidad en los granos alterando la densidad y el proceso de molienda y extracción, lo que se constituye en una alteración en las cualidades organolépticas.

Se observó como los niveles de pH permanecen constantes con respecto al comportamiento que se mostró de las materias primas en el capítulo 1, lo cual es positivo tomando en cuenta que las características organolépticas se deben conservar. El resumen estadístico de las mediciones fisicoquímicas se puede observar en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos del café tostado y molido.

Muestra	Color (L)	Densidad (g/L)	Humedad (%)	pH	Merma (%)
F1A1TB	23,7	333,7	1,7	4,7	15,5
F1A1TM	15,6	287,3	1,3	5,0	19,4
F1A1TA	11,6	248,0	0,9	5,4	25,9
F1A2TB	23,5	343,0	1,6	4,7	15,3
F1A2TM	15,7	289,2	1,2	5,1	19,4
F1A2TA	11,4	248,3	0,7	5,6	24,4
F1A3TB	23,6	339,1	1,5	4,8	15,3
F1A3TM	16,2	284,0	1,2	5,1	18,9
F1A3TA	11,3	244,1	0,9	5,6	24,9
F2A1TB	25,4	330,7	1,7	4,9	13,5
F2A1TM	18,0	293,7	1,4	5,2	16,5
F2A1TA	12,6	247,9	1,1	5,8	21,8
F2A2TB	26,9	337,8	1,8	4,9	13,7
F2A2TM	18,5	296,6	1,3	5,2	16,7
F2A2TA	12,9	251,1	1,1	5,9	21,8
F2A3TB	26,3	336,0	1,8	4,9	13,8
F2A3TM	17,8	301,1	1,2	5,2	17,0
F2A3TA	12,5	242,8	0,9	5,8	22,1
F3A1TB	26,1	353,0	2,4	4,7	14,2
F3A1TM	16,2	280,9	1,3	5,1	19,0
F3A1TA	12,0	247,1	1,2	5,8	24,3
F3A2TB	23,4	337,1	2,0	4,8	15,3
F3A2TM	16,2	278,0	1,4	5,1	18,6
F3A2TA	11,3	254,7	1,0	5,8	24,4
F3A3TB	23,6	351,2	2,1	4,8	15,2
F3A3TM	15,9	290,2	1,4	5,1	19,0
F3A3TA	11,6	259,5	0,9	5,7	24,7
Media	17,78	292,82	1,38	5,21	18,91
Desv.Est.	5,50	38,47	0,42	0,40	4,01
CoefVar	30,94	13,14	30,25	7,69	21,22

Posterior a la medición de los parámetros fisicoquímicos y con el fin de evaluar si después del tostado del café persistían algunas cantidades de aminoácidos y azúcares, se llevó a cabo la cuantificación de estas sustancias (Tabla 15). El único aminoácido remanente fue la L-5-oxoprolina o ácido piroglutámico, del cual se evidenció una mayor concentración a medida que se aumenta el grado de tostado; siendo un compuesto producto de la oxidación de la L-prolina, es de esperarse que a mayor tostado, mayor proceso de oxidación y formación de L-5-oxoprolina. Maeso y Col (2006, 1095) llevaron a cabo un estudio que refuerza esta teoría y en el que indicaron que efectivamente este aminoácido es producto de una conversión térmica y que es sumamente importante al encontrarse relacionado con procesos cognitivos y de la memoria, reforzando las bondades del café.

Para el caso de los azúcares, solo se observaron remanentes de D-(+)-fructosa y de D-(+)-galactosa a tostados bajos, los cuales fueron los azúcares mayoritarios junto con la D-(+)-glucosa en el café verde, de la cual se observó que definitivamente es el principal azúcar involucrado en la formación de acrilamida al no encontrarse remanentes de él luego del tostado. En cuanto al myo-inositol y D-manitol, que son azúcares alcoholes con intervención nula en la reacción de Maillard y que no sufren pérdidas por volatilización, también se observó un aumento o concentración a medida que aumenta el nivel de tostado y disminuye la humedad.

Tabla 15. Contenido de azúcares reductores y L-α-aminoácidos en el café tostado y molido.

Muestra	Remanentes de Azúcares reductores (mg/100 g muestra) y Aminoácidos (mg/g muestra)				
	D-(+)-fructosa	D-(+)-galactosa	D-manitol	Myo-inositol	5-oxoprolina
F1A1TB	0,0595	0,0068	0,0027	0,1244	26,81
F1A1TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,1515	31,75
F1A1TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1772	139,95
F1A2TB	0,0406	0,0033	n.d.	0,1417	26,04
F1A2TM	n.d.	n.d.	0,0034	0,1622	35,80
F1A2TA	n.d.	n.d.	0,0057	0,1707	147,10
F1A3TB	0,0422	0,0051	0,0022	0,1246	24,99
F1A3TM	n.d.	n.d.	0,0032	0,1624	38,30
F1A3TA	n.d.	n.d.	0,0282	0,1776	169,78
F2A1TB	n.d.	n.d.	n.d.	0,1275	10,26
F2A1TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,1572	21,48
F2A1TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1569	67,88
F2A2TB	n.d.	n.d.	n.d.	0,1232	11,10
F2A2TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,1547	22,14
F2A2TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1567	68,95
F2A3TB	n.d.	n.d.	n.d.	0,1340	9,40
F2A3TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,1469	25,26
F2A3TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1632	68,55
F3A1TB	n.d.	n.d.	0,0024	0,1227	15,43
F3A1TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,1761	39,63
F3A1TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1610	147,22
F3A2TB	0,0580	0,0049	n.d.	0,1670	18,84
F3A2TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,1691	32,18
F3A2TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1808	134,05
F3A3TB	0,0515	0,0044	n.d.	0,1393	17,95
F3A3TM	n.d.	n.d.	n.d.	0,2199	34,10
F3A3TA	n.d.	n.d.	n.d.	0,1995	145,67
Media	0,0093	0,0009	0,0018	0,1573	56,7000
Desv.Est.	0,0202	0,0020	0,0055	0,0237	52,1000
CoefVar	216,89	220,74	309,95	15,04	91,9

Entre los cientos de estudios que giran alrededor de la acrilamida, específicamente en el café, las sustancias de naturaleza antioxidante han sido correlacionadas con las tasas de formación/eliminación de la misma (Bassama, Brat, Bohuon, Boulanger, & Günata, 2010; Jin et al., 2013, 558). Así, estas constituyen no solo un marcador de calidad en la materia prima y la bebida final por sus propiedades benéficas para la salud, sino que también podrían vincularse con los contenidos de acrilamida en el café objeto de estudio. Debido a las fuertes transformaciones químicas que sufren todas las sustancias del café verde cuando pasan por el proceso industrial, la prueba para el contenido de polifenoles totales permite tener una mayor visualización de cómo a medida que se aumenta el grado de tostado los polifenoles van disminuyendo, y siendo los ácidos clorogénicos los polifenoles más importantes y abundantes del café, en ellos se observó esta misma tendencia (Tabla 16). Cuando se compararon los niveles de polifenoles totales y ácidos clorogénicos en el café tostado con los niveles en el café verde, se observó más claramente este comportamiento.

Una vez medidos los parámetros fisicoquímicos y cuantificados los remanentes de sustancias precursoras y antioxidantes, las muestras de café tostado fueron calificadas por expertos del panel de catación de Colcafé los cuales evaluaron los atributos de fragancia, aroma, acidez y cuerpo, para emitir una impresión global, la cual, cuando se trata de café excelso no debe ser inferior a 8,0 según la NTC 5938 (Tabla 16) (Apéndices D, E, F).

Tabla 16. Contenido de polifenoles totales, ácidos clorogénicos y perfil sensorial (impresión global) del café tostado y molido.

Muestra	PFT (mg eq GAE/g muestra)	Ácidos Clorogénicos (mg/g muestra)	Impresión Global Sensorial
F1A1TB	28,13	16,12	8,3
F1A1TM	27,24	6,47	8,5
F1A1TA	24,26	1,27	8,5
F1A2TB	34,17	17,33	8,6
F1A2TM	30,74	7,09	8,6
F1A2TA	24,90	1,57	8,6
F1A3TB	33,73	19,38	8,5
F1A3TM	29,27	7,33	8,5
F1A3TA	24,64	1,51	8,5
F2A1TB	34,79	19,86	8,6
F2A1TM	29,34	7,94	8,6
F2A1TA	27,51	1,81	8,6
F2A2TB	35,83	21,56	8,3
F2A2TM	31,41	9,02	8,4
F2A2TA	27,35	1,91	8,4
F2A3TB	35,28	20,11	8,4
F2A3TM	31,92	8,09	8,5
F2A3TA	26,04	1,73	8,6
F3A1TB	35,9	18,66	8,3
F3A1TM	30,76	6,56	8,5
F3A1TA	28,39	1,51	8,5
F3A2TB	39,85	18,34	8,4
F3A2TM	33,26	7,33	8,4
F3A2TA	31,41	1,43	8,4
F3A3TB	35,08	15,43	8,4
F3A3TM	28,08	5,77	8,5
F3A3TA	20,7	1,07	8,4
Media	30,37	9,12	n.a.
Desv.Est.	4,432	7,3	n.a.
CoefVar	14,59	80,02	n.a.

Como se puede observar en la tabla anterior, el contenido de polifenoles y de ácidos clorogénicos disminuye de forma muy marcada, lo cual obedece a pérdidas o transformaciones químicas sufridas por el proceso de tostado como ya se ha mencionado. En cuanto al perfil sensorial, los valores superiores a 8,0 en la calificación del panel ratifican la buena calidad de este café excelso.

Hasta la fecha, numerosas metodologías analíticas para la cuantificación de acrilamida en matrices vegetales han sido desarrolladas obedeciendo a la alta complejidad que estas representan en los procedimientos de extracción y aislamiento de la sustancia. El café no es una excepción a este suceso, pues su compleja química hace que en el proceso de extracción de la acrilamida siempre se requiera de un clean-up exhaustivo de la muestra previa inyección en el equipo de análisis (Bortolomeazzi et al., 2012, 2688; Delatour, Périsset, Goldmann, Riediker, & Stadler, 2004, 4626; Eriksson & Karlsson, 2006, 393-394; Go, 2005, 215-216). Para lograr lo anterior, es recurrente el uso de cartuchos de SPE los cuales están elaborados con un relleno de carbono grafitado y un gel cargado con distintos grados de polaridad, acidez o basicidad según la molécula a retener/purificar y según la naturaleza de la matriz, ya sea liposoluble o hidrosoluble, con alta carga de carbohidratos, ácidos orgánicos, etc, como en el caso del café.

En la mayoría de los estudios de acrilamida, la metodología analítica de cuantificación reportada es HPLC/MS/MS gracias a los cortos tiempos de análisis, la sensibilidad del método y bajo consumo de solventes, sin embargo, la cromatografía gaseosa es la segunda técnica más empleada debido a que los porcentajes de

recuperación, las desviaciones estándar y los límites de detección son bastante aceptables (Sun, Fang, & Xia, 2012, 221).

En el presente trabajo se desarrolló una nueva metodología para la cuantificación de acrilamida en café tostado y molido mediante GC/MS. En este tipo de análisis el paso más crítico y temido por los investigadores es la derivatización del analito, debido al estricto control en tiempo, temperatura y volumen de derivatizante con que debe llevarse a cabo, pues de lo contrario la reacción puede ser incompleta y no se formará la molécula equivalente a cuantificar o puede formarse también una “falsa molécula”. En esta investigación, mediante diversos ensayos y luego de un arduo trabajo en el clean-up de la muestra en los cartuchos de SPE estrictamente seleccionados se logró obviar este paso; con un proceso selectivo de extracción de la matriz y con un adecuado acondicionamiento y elución de los cartuchos, la molécula es purificada en el solvente seleccionado, así, no se tiene que emplear tanto tiempo en la derivatización y no se incurre con la posibilidad de que la molécula no se forme, o que se cuantifique la molécula equivocada.

Al validar esta metodología analítica por GC/MS, se tuvo en cuenta que para el desarrollo experimental debe existir una planeación, que permita seguir de manera sistemática cada paso de la investigación y con ello lograr obtener resultados confiables y reproducibles. La validación comprende la determinación de una serie de parámetros que demuestren que los resultados del método son confiables y reproducibles. La cuantificación de la acrilamida se llevó a cabo por medio del método del estándar externo y normalización de las áreas empleando propionamida por su similitud molecular y facilidad de trabajo.

La acrilamida ha mostrado decaer a lo largo del periodo de almacenamiento (Hoenicke & Gatermann, n.d., 296), por esta razón, una vez fueron tostadas las muestras, estas se almacenaron por días en bolsas metalizadas translúcidas con barrera de oxígeno, selladas al vacío y almacenadas en cava a -8,0 °C con la finalidad de retrasar reacciones de deterioro inherentes a la inestabilidad de las materias primas de origen natural y minimizar la variación durante la etapa de validación y cuantificación en las muestras procedentes de las diferentes alturas (fincas).

Los parámetros evaluados en esta validación fueron: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión, exactitud y selectividad/especificidad en una matriz de café tostado y molido en agua acidulada con solución estándar, obteniéndose muestras enriquecidas. El resumen de los resultados obtenidos en la validación se ilustra en la Tabla 17.

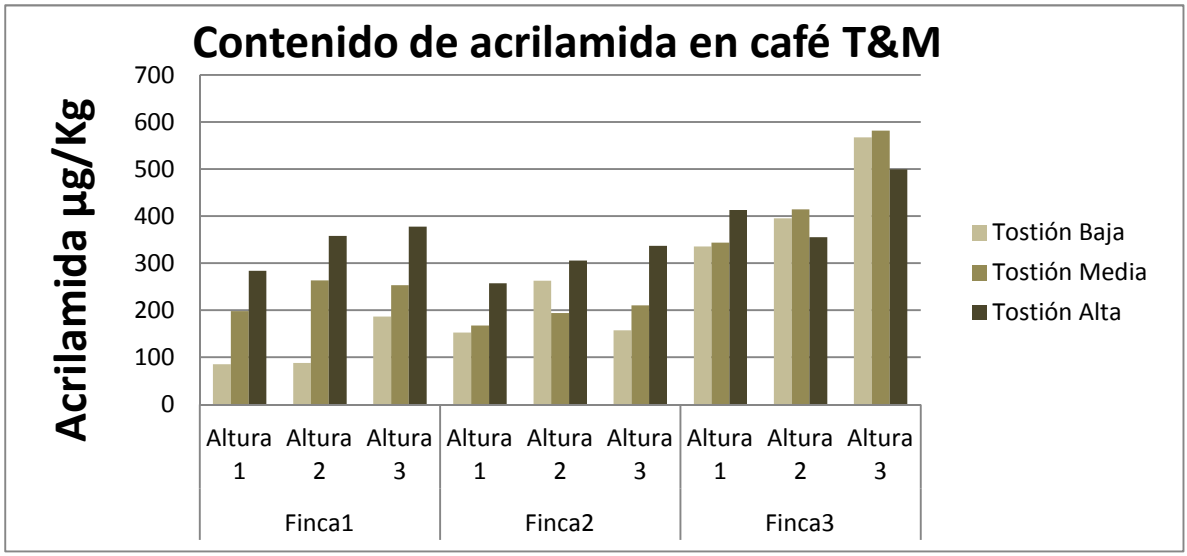
Tabla 17. Resultados de validación para el método de acrilamida.

Parámetros		Resultados	Criterio de aceptación
Linealidad			
Ecuación de la recta		Y= 0.001*X*-0.0004	n.a
Coeficiente de determinación		r^2= 0.9991	r^2= 0.99
Correlación (Pearson)		r= 1	r= 0.999
Homogeneidad de varianza		G exp.= 0.035	G tablas (a= 0,05, K= 6, n =3) = 0,616
Precisión		**Resultados**	**Criterio de aceptación**
Repetibilidad			
R. Instrumental	Coef. de variación	RSD rep inst= 2.4%	RSD rep inst= 3,0
R. Método	Coef. de variación	RS Drep met= 1.81%	RSD rep met= 4,0
Exactitud		**Resultados**	**Criterio de aceptación**
Porcentaje de recuperación		%R= 99.66±2.33	%R= 100±5
Test de Cochran		G exp= 0.23	G tablas (a=0,05, K=3, n=3)= 0,871
Límite de detección		**Resultados**	**Criterio de aceptación**
Concentración		10 ng/mL con S/R= 6:1	n.a
RSD%		1.97%	< 20%
Límite de cuantificación		**Resultados**	**Criterio de aceptación**
Concentración		25 ng/mL	n.a
RSD%		7.64%	<10%
Interferencias		**Resultados**	**Criterio de aceptación**
Selectividad/Especificidad: sustancias relacionadas		No afectan	n.a
Idoneidad del sistema cromatográfico (System suitability)			
		Resultados	**Criterio de aceptación**
Tiempo de retención		14.5 min	n.a
Factor de capacidad k'		3.271	k´> 2
Platos teóricos		1167101.33	N > 1000
Asimetría		1.010	As= 0,8 - 2,5
Resolución		Rs > 3.283	Rs > 1,5

Según los parámetros validados y sus valores obtenidos se pudo establecer que el método es lineal, preciso, reproducible y selectivo.

Una vez se desarrolló y validó la metodología analítica, se procedió con la cuantificación de los niveles de acrilamida formados en el café tostado y molido. En la Figura 9 se puede observar la clara diferencia que existe en los niveles formados de acrilamida dependientes del grado de tostado.

Figura 9. Contenido de acrilamida en las muestras de café T&M.



Según la literatura, a menor grado de tostado, mayor nivel de acrilamida formada (Alves et al., 2010, 929; Bagdonaite et al., 2008, 6083); este fenómeno obedece a que al inicio del tostado las sustancias precursoras están disponibles y comienzan a condensarse rápida y espontáneamente y al final del proceso, muchas pérdidas químicas y físicas tienen lugar. Las curvas de tostado, se comportan de manera tal que al principio cuando se inicia la pérdida de agua se da un decaimiento de la temperatura y luego aumenta de manera exponencial hasta que llegan a un punto en la que se estabiliza; la acrilamida en cambio, sufre un efecto de campana, es decir, aumenta exponencialmente hasta que en un punto del proceso de tostado comienza a decaer.

De manera general y si se remite de nuevo a la Figura 6 se puede observar una tendencia y es que las muestras de tostado bajo contienen los niveles más bajos de acrilamida y los tostados altos contienen los niveles más altos; esto contrasta un poco con la literatura pero su explicación es simple y clara: la acrilamida en el café comenzó a formarse de manera exponencial y seguramente unos instantes luego del último punto del proceso de tostado es donde esta comienza a decaer, es decir, a un color de tostado más oscuro que el de estas muestras de tostado alto se daría este proceso. Esto puede ser visible si los experimentos combinan diferentes tiempos de tostado para obtener diferentes colores y curvas, pero como se mencionó inicialmente, los perfiles aquí desarrollados fueron escogidos por expertos en catación y obedecen a intereses comerciales de la Compañía luego de numerosas pruebas realizadas.

Si se remite al capítulo 1, se puede observar que las muestras de la Finca 2 contienen los niveles más bajos de los precursores de la acrilamida, la asparagina y los azúcares reductores, especialmente la D-(+)-fructosa y la D-(+)-glucosa, lo que guarda completa relación con los niveles encontrados de acrilamida, los cuales son también los más bajos en las muestras de esta finca independientemente del grado de tostado. Aquí es importante recordar que las diferencias significativas entre las materias primas fueron atribuidas a los bajos niveles en algunas de las cuantificaciones que se realizaron a las materias primas de la Finca 2 en el capítulo anterior.

Una vez se contó con los resultados de todas las mediciones y cuantificaciones realizadas y con sus respectivos resúmenes estadísticos, se procedió con el análisis de la estadística descriptiva e inferencial para poder observar cómo se comporta la

acrilamida formada en relación a la materia prima y a todos los parámetros descritos que pueden o no afectarla.

Lo primero que se hizo al igual que en el capítulo 1, fue un screening inicial mediante un PCA para evaluar la máxima varianza y en el cual se tuvieron en cuenta tanto los parámetros fisicoquímicos como las sustancias cuantificadas. Este primer PCA (Figuras 10 y 11) en el que se emplearon los dos primeros componentes que explican el 75,5% de la variabilidad, se muestra mediante la gráfica de puntuación como las muestras tienden a agruparse por grado de tostado y no por altura de cosecha.

Figura 10. Gráfica de puntuación (PCA) en el café tostado y molido para todos los parámetros cuantificados.

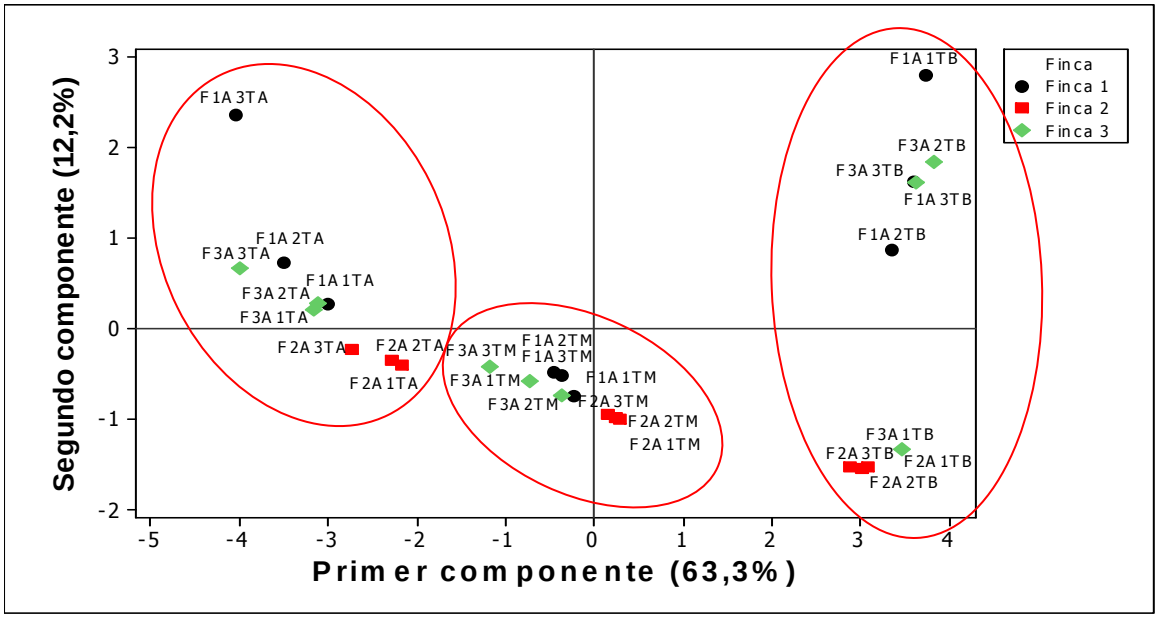
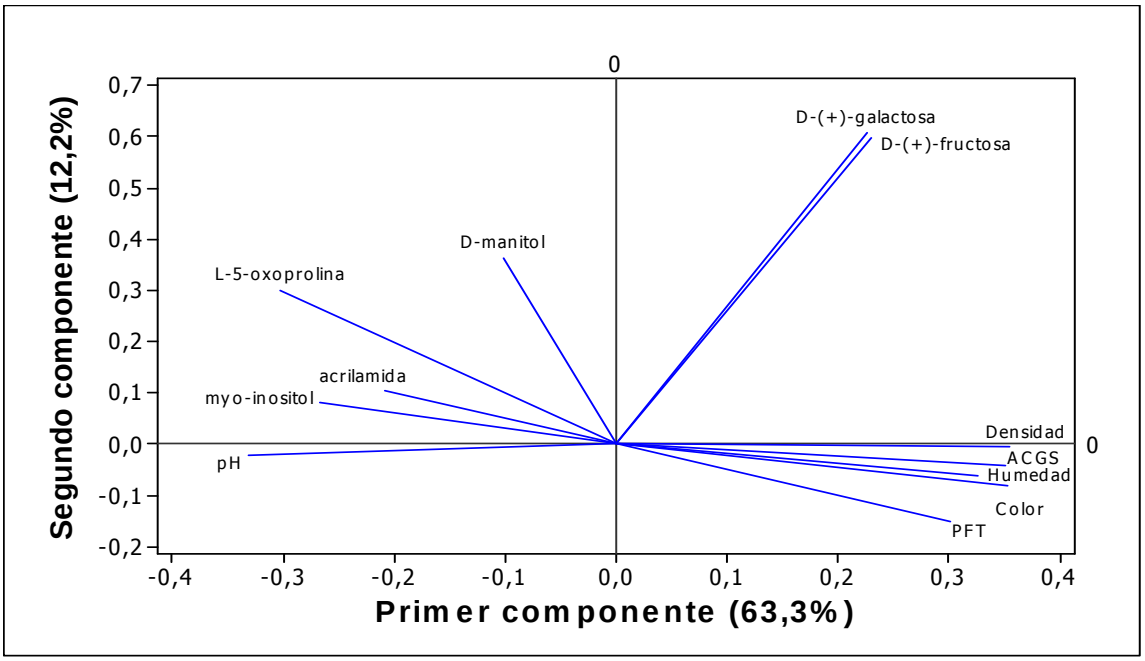


Figura 11. Gráfica de cargas (PCA) en el café tostado y molido para todos los parámetros cuantificados.



Lo más importante a destacar en la gráfica de cargas (Figura 11) y se remite a la Tabla 15, es que los valores remanentes de myo-inositol, D-manitol y L-5-oxoprolina tienden a aumentar cuando el nivel de tostado es más alto, y estas sustancias ubican sus vectores en el mismo cuadrante donde se agrupan la mayoría de las muestras de tostado alto. Además, el vector de la acrilamida se sitúa en el mismo lugar donde se pueden ver las muestras de tostado alto de la Finca 3 en la gráfica de puntuación, para la que hay una tendencia de valores más altos de acrilamida en los tres niveles de tostado. También es importante resaltar que las muestras que se ubican en el cuadrante superior derecho de la gráfica de puntuación corresponden a la mayoría de tostado bajo para las cuales se conservaron algunos remanentes de azúcares, los que se puede visualizar en el mismo cuadrante de la gráfica de cargas.

Debido a que el análisis PCA es descriptivo, se llevó a cabo un análisis mediante una ANOVA lineal general para confirmar este modelo y evidenciar si las diferencias encontradas para los efectos principales y para las interacciones de orden 2 son significativas ($p < 0,05$) y qué parámetros hacen que se presente o no esta diferencia (Tabla 18).

Mediante esta ANOVA lineal general fueron evaluados los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad de las varianzas e independencia de las muestras sobre los residuales.

Tabla 18. Parámetros de ANOVA para diferencias significativas de efectos principales e interacciones de orden 2 en café tostado y molido.

Variable	Efecto p.pal/Interacción	Valor F	Valor P	R cuadrado (%)	R cuadrado ajustado (%)
5-oxoprolina	Altura	109,47	0,000	99,44	98,79
	Grado de tostado	863,01	0,000		
	Altura*grado de tostado	46,20	0,000		
D-(+)-fructosa	Altura	4,96	0,027	85,97	69,59
	Grado de tostado	18,88	0,000		
	Altura*grado de tostado	4,96	0,014		
D-(+)-galactosa	Altura	5,71	0,018	86,82	71,44
	Grado de tostado	19,40	0,000		
	Altura*grado de tostado	5,71	0,008		
Myo-Inositol	Grado de tostado	23,05	0,000	86,48	70,71
Acrilamida	**Altura**	**83,83**	**0,000**	**95,96**	**91,25**
	Grado de tostado	**47,35**	**0,000**		
ACGS	Altura	16,06	0,000	99,55	99,02
	Grado de tostado	1290,86	0,000		
	Altura*grado de tostado	3,62	0,037		
PFT	Altura	8,95	0,004	94,11	87,23
	Grado de tostado	66,64	0,000		
Color	Altura	38,34	0,000	99,59	99,12
	Grado de tostado	1421,50	0,000		
Densidad	Grado de tostado	936,39	0,000	99,38	98,65
	Altura*grado de tostado	7,23	0,003		
Humedad	Altura	21,35	0,000	97,32	94,18
	Grado de tostado	180,92	0,000		
	Altura*grado de tostado	5,05	0,013		
pH	Altura	119,67	0,000	99,77	99,5
	Grado de tostado	2431,13	0,000		
	Altura*grado de tostado	9,12	0,001		

El PCA indicó que el agrupamiento de las muestras ocurre principalmente por el grado de tostado, pero también que algunas de las sustancias cuantificadas guardan relación con ciertos agrupamientos, caso de la D-(+)-galactosa, D-(+)-fructosa, D-manitol, L-5-oxoprolina y la acrilamida; la ANOVA permitió corroborar esta información mostrando que todas ellas presentan diferencias significativas ($p<0,05$) a excepción del D-manitol. La ANOVA también mostró que la D-(+)-galactosa, D-(+)-fructosa, y la L-5-oxoprolina tienen diferencias significativas tanto para los efectos principales como para la interacción de orden 2 “altura*grado de tostado”. La acrilamida por su parte, mostró diferencia significativa por altura y por grado de tostado como efectos principales individuales.

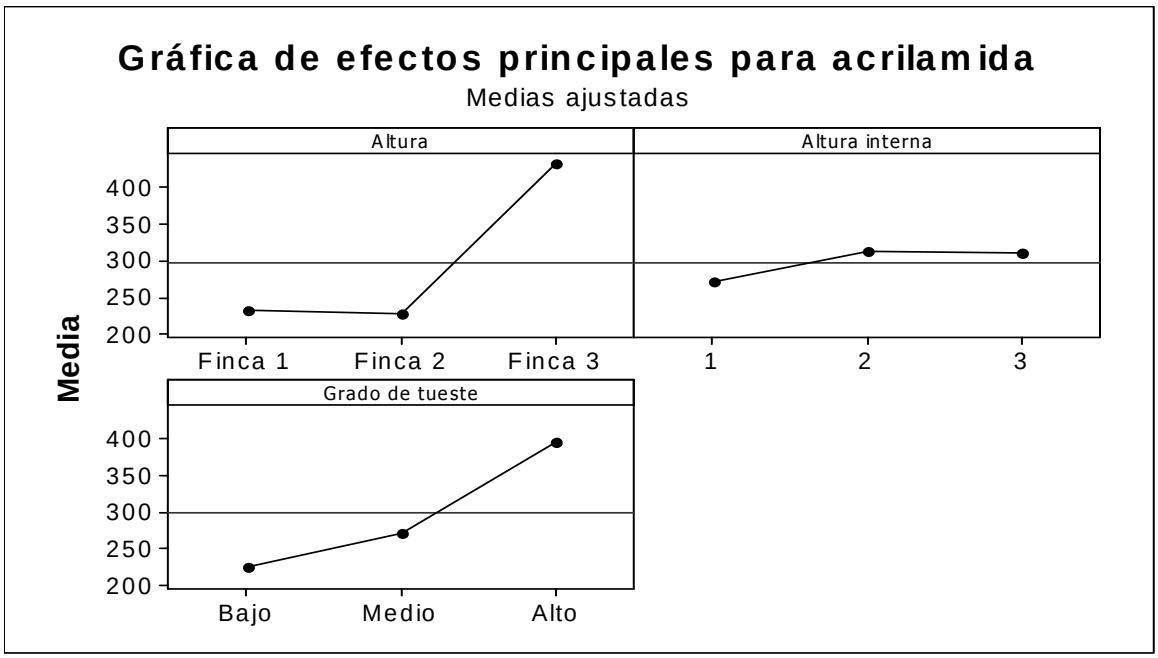
Para el resto de sustancias o parámetros fisicoquímicos que mostraron una diferencia significativa existe un factor común: el grado de tostado, hecho que concuerda con toda la teoría que se ha relacionado a lo largo de este manuscrito.

El contenido de sustancias antioxidantes del café disminuye a medida que aumenta el grado de tostado debido a la degradación progresiva que sufren como consecuencia de la reacción de Maillard, para dar paso a la formación de melanoidinas y productos de degradación (MRPs) (Ludwig, Bravo, De Peña, & Cid, 2013, 553). Los parámetros fisicoquímicos cambian en relación a la pérdida de agua por aumento progresivo de la temperatura a medida que avanza la curva de tostado, por lo que es de esperarse que cambien en virtud de este proceso, además el color aumenta proporcionalmente con tiempos prolongados de tostado gracias a un mayor tiempo de reacción de precursores para la formación de estas melanoidinas y productos de

caramelización. Los aminoácidos, como ya se observó, son el reactivo límite y se condensan con los azúcares para dar paso a esos productos de la reacción de Maillard; así los aminoácidos incluso a tostados bajos no sobreviven y los azúcares reductores, que se encuentran en cantidades superiores a los aminoácidos, solo permanecieron remanentes a tostados bajos.

En la Figura 12 se ilustra el comportamiento de la acrilamida con respecto a la atura de siembra y el grado de tostado, la altura interna o zona de colección se anexa al gráfico para ilustrar que no existe una tendencia marcada intra finca (estratificación por lotes de producción).

Figura 12. Gráfica de efectos principales para la acrilamida.



Luego de que se establecieron estas diferencias significativas entre los diferentes metabolitos y parámetros fisicoquímicos de las diferentes muestras por efecto de altura y grado de tostado, y por la interacción de orden 2 “altura*grado de tostado”, se procedió con la elaboración de la matriz de correlaciones (Tabla 19), para establecer cuáles guardaban una correlación significativa entre ellos, teniendo en cuenta como criterio de aceptación un valor p<0,05 y una correlación superior al 80% (positiva o negativa). La tabla completa de correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos medidos y las sustancias cuantificadas en el café tostado y molido se encuentra en el Apéndice B.

Tabla 19. Matriz de correlaciones para el café tostado y molido.

VARIABLES	TIPO	D-(+)-fructosa	ACGS	PFT	Color
D-(+)-galactosa	Corr.	0,984			
	Valor p	0,000			
PFT	Corr.		0,823		
	Valor p		0,000		
Color	Corr.		0,991	0,813	
	Valor p		0,000	0,000	
Densidad	Corr.		0,962	0,800	0,971
	Valor p		0,000	0,000	0,000

De estas correlaciones es importante destacar: los azúcares remanentes guardan correlaciones entre sí pues estos comparten la misma ruta metabólica además sufren el mismo cambio por efecto del tostado del café; la densidad guarda correlación con el contenido de sustancias antioxidantes pues a mayor uniformidad de la partícula de café, mayor grado de extracción y expresión de los compuestos antioxidantes, lo que también ocurre para el color, es decir, a mayor uniformidad de la partícula de café, mayor uniformidad en el color a partir de su medición. Al sufrir el mismo efecto de

degradación por efecto del proceso de tostado, los valores de sustancias antioxidantes deben estar correlacionados entre sí y estos a su vez con el color, el cual aumenta con el grado de tostado, por lo que cafés de diferentes colores varían en su composición de sustancias antioxidantes.

En la tabla completa de correlaciones (Apéndice B) se pudo observar otro tipo de correlaciones que aunque se presentan, no cumplen con el criterio de inclusión aquí propuesto ($p<0,05$ y una correlación superior al 80% positiva o negativa). Estas correlaciones que aunque no son muy significativas es importante mencionarlas: correlaciones de la acrilamida con el contenido de ácidos clorogénicos, el color y el pH.

En un apartado anterior se mencionó como según autores a mayor grado de tostado, mayor color y menor contenido de acrilamida (Bagdonaite et al., 2008, 6085; Gökmen & Şenyuva, 2006, 242), y se explicó que posiblemente ese efecto no se observó en este estudio por parar la cinética de tostado justo antes de que esto ocurriera, pero sin importar el resultado, es clara la intrínseca relación que existe entre los niveles de acrilamida formados y los colores alcanzados, que la variación de uno está directamente relacionado con la variación del otro (Summa et al., 2007, 1849).

En el caso de los ácidos clorogénicos como mayores responsables de la actividad antioxidante del café, estos han mostrado tener efecto en el aumento de la formación de la acrilamida por tres mecanismos principales: incremento de la formación de 5-HMF el cual es un potente precursor en la formación de acrilamida; segundo, disminuye la energía de activación de la 3-APA para su conversión en acrilamida y por último, mantienen un alto potencial redox durante la reacción de Maillard evitando el

ataque por radicales libres a la acrilamida formada (Cai et al., 2014, 1; Jin et al., 2013, 611; Liu et al., 2015, 46; Zhang & Zhang, 2008, 105). Si se remite al capítulo 1, el contenido de polifenoles totales y de ácidos clorogénicos no presentó diferencia estadísticamente significativa, por lo que en este estudio no se debe relacionar los altos o bajos contenidos de acrilamida formados como dependientes de los niveles de estas sustancias, además, otros autores mencionan que la acrilamida también puede verse disminuida por efecto de las sustancias antioxidantes las cuales podrían inhibir su formación mediante el atrapamiento de compuestos carbonílicos (Liu et al., 2015, 46).

Por último, investigaciones han propuesto como valores bajos de pH podrían bloquear la adición nucleofílica de la asparagina con el compuesto carbonílico, previniendo la formación de la respectiva base de Shiff, el intermediario clave en la formación de acrilamida (Mestdagh et al., 2008, 26), lo que podría estar relacionado con los bajos niveles de acrilamida formados en el café proveniente de la Finca 2 la cual también mostró diferencia significativa en los valor de pH en el café verde.

Hasta este punto se estableció que existen diferencias en la composición química de la materia prima proveniente de diferentes locaciones de cosecha y que esto tiene un efecto en la formación de acrilamida, así como también se estableció que los aminoácidos son el reactivo limite en la formación de acrilamida y que esta mostró diferencias significativas por el efecto de la materia prima y el grado de tostado. Con todo esto se tuvo plena identificación del comportamiento de la acrilamida en relación a todos los parámetros y sustancias cuantificados.

Por ello, lo último que se realizó en este estudio con el objetivo de establecer la correlación directa de aquellas sustancias precursoras con capacidad predictiva sobre la producción de acrilamida, fue un análisis PLS, el cual se elaboró por grado de tostado con la finalidad de establecer si independientemente de este, las sustancias relacionadas con el comportamiento de la acrilamida seguían siendo las mismas al aumentar o disminuir el grado de tostado (Tablas 20-22) (Figuras 13-18).

Tabla 20. Análisis PLS para café de tostado bajo.

Componente	Varianza X	Error	R cuadrado	Precisión	R cuadrado (predicho)
1	0,430905	71167,2	0,367087	195789	0
2		22285,9	0,801804	430785	0
3		12848,7	0,885732	502959	0
4		5883,2	0,947679	541403	0
5		150,2	0,986640	612925	0
6		17,4	0,999846	637876	0
7		4,1	0,999963	639872	0

Figura 13. Gráfica de predictores para la formación de acrilamida con 1) L-glicina, 2) L-valina, 3) L-leucina, 4) L-5-oxoprolina, 5) L-metionina, 6) L-treoina, 7) L-asparagina para café de tostado bajo.

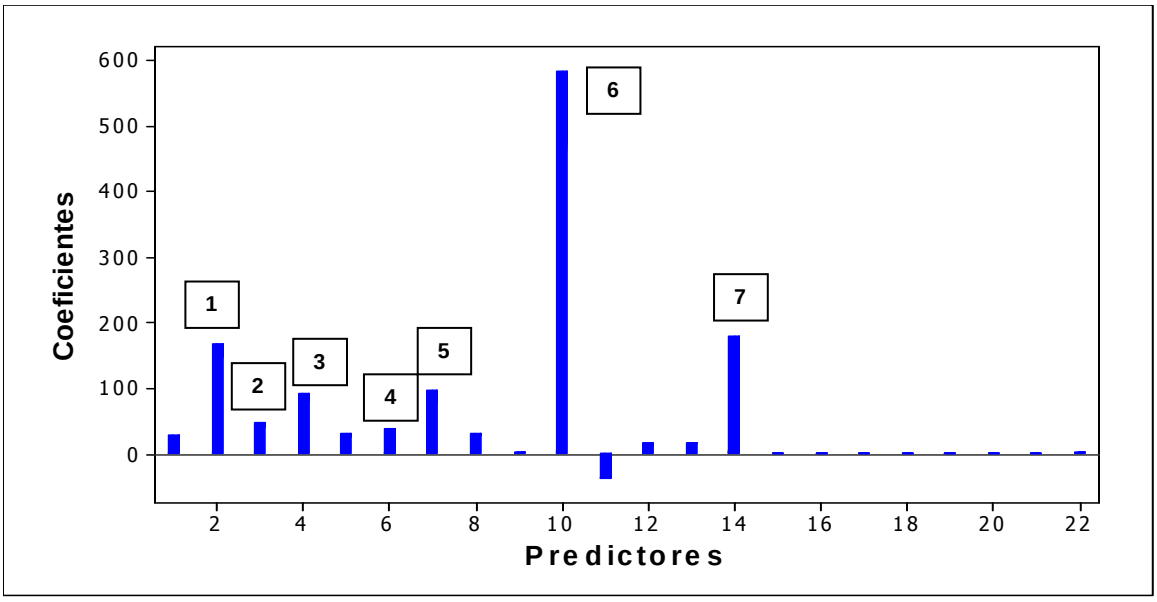


Figura 14. Gráfica de respuesta de los predictores para la formación de acrilamida en café de tostado bajo.

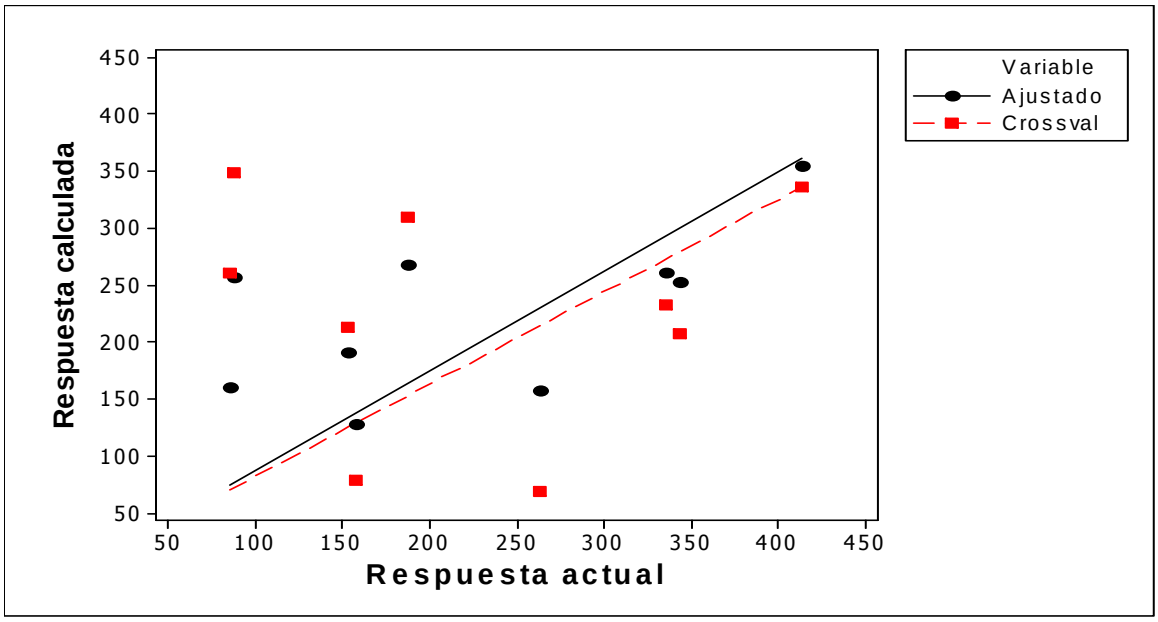


Tabla 21. Análisis PLS para café de tostado medio.

Componente	Varianza X	Error	R cuadrado	Precisión	R cuadrado (predicho)
1	0,448622	34557,9	0,00430	69944	0
2		17078,7	0,75311	124710	0
3		5119,1	0,92600	144625	0
4		2329,8	0,96632	139367	0
5		834,5	0,98794	152349	0
6		93,8	0,99864	163202	0
7		0,0	1,00000	168486	0

Figura 15. Gráfica de predictores para la formación de acrilamida con 1) L-glicina, 2) L-valina, 3) L-leucina, 4) L-5-oxoprolina, 5) L-metionina, 6) L-treoina, 7) L-asparagina para café de tostado medio.

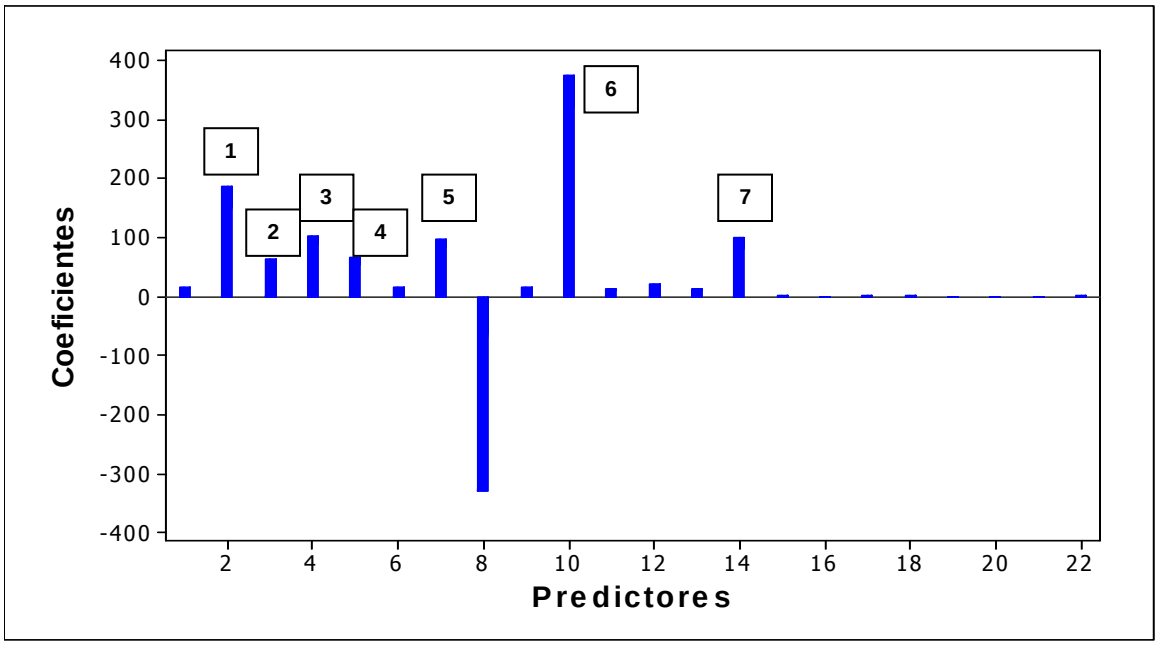


Figura 16. Gráfica de respuesta de los predictores para la formación de acrilamida en café de tostado medio.

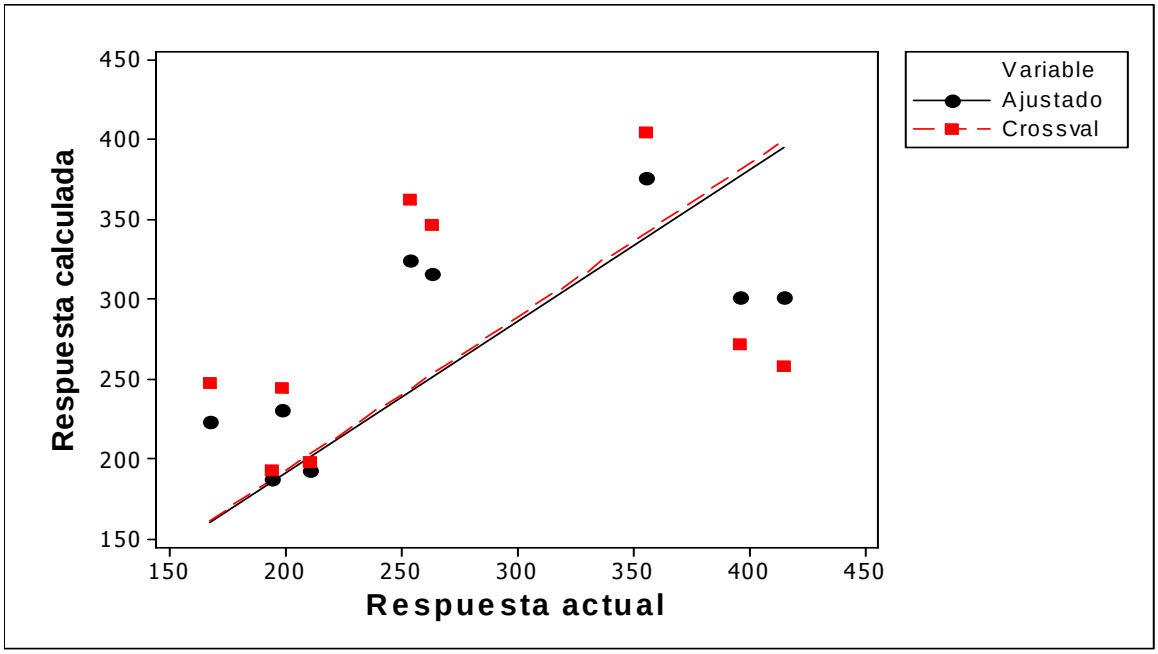


Tabla 22. Análisis PLS para café de tostado alto.

Componente	Varianza X	Error	R cuadrado	Precisión	R cuadrado (predicho)
1	0,448164	66674,6	0,44383	137033	0
2		29821,3	0,75124	280837	0
3		10591	0,91165	303223	0
4		4945,3	0,95875	310127	0
5		1741,7	0,98547	344356	0
6		154,7	0,99871	370076	0
7		0,0	1,00000	380118	0

Figura 17. Gráfica de predictores para la formación de acrilamida con 1) L-glicina, 2) L-valina, 3) L-leucina, 4) L-5-oxoprolina, 5) L-metionina, 6) L-treoina, 7) L-asparagina para café de tostado alto.

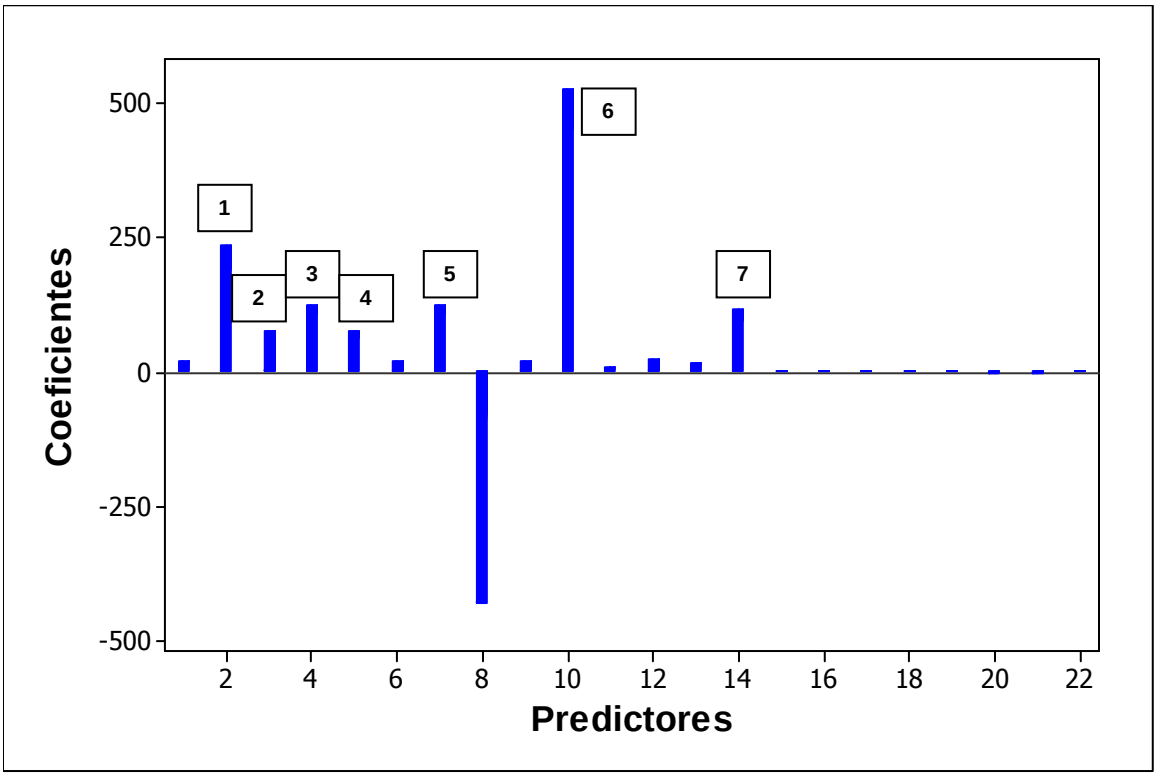
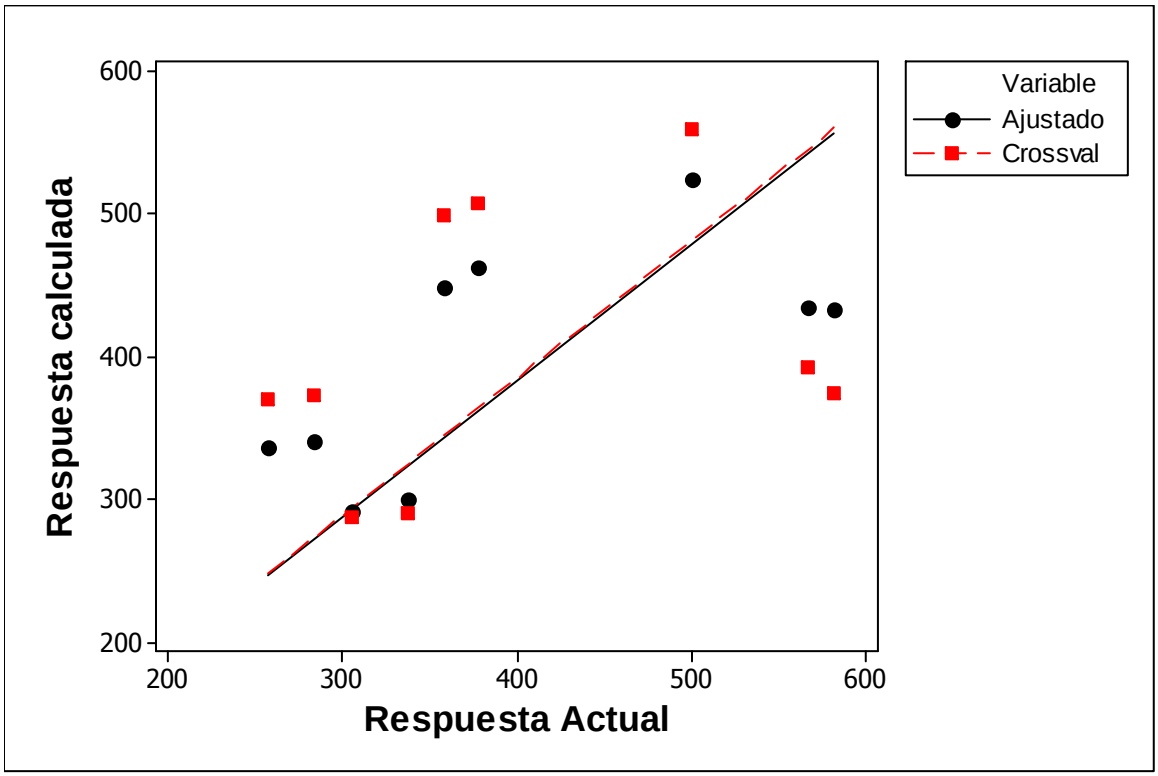


Figura 18. Gráfica de respuesta de los predictores para la formación de acrilamida en café de tostado alto.



Con este análisis PLS se identificó que es posible predecir el comportamiento de la acrilamida independientemente del grado de tostado con el mismo set de aminoácidos (L-glicina, L-valina, L-leucina, L-5-oxoprolina, L-metionina, L-treoina, 7, L-ssparagina), con coeficientes de correlación de 0,999963; 1,000 y 1,000 y con errores cercanos a 4,1; 0,0 y 0,0 para las materias primas tostadas a niveles bajo, medio y alto respectivamente, donde estos coeficientes de correlación y errores corresponden al séptimo predictor, es decir, la asparagina.

Conclusiones

El café muestreado proveniente del municipio de Andes, Antioquia, en tres alturas diferentes de cosecha, mostró diferencias en su composición química y fisicoquímica.

El hecho de que las diferentes alturas de siembra produzcan café diferente, pudo ser atribuido hipotéticamente a los microclimas de cada zona de colección y su composición en el suelo, ya que el beneficio y procesamiento para todas fue el mismo.

Los bajos contenidos de L-5-oxoprolina, L-serina, L-ácido glutámico y D-(+)-ribosa hacen que el café proveniente de la Finca 2 (la cual se agrupa en el PCA), sea significativamente diferente ($p<0,05$) al de las otras dos fincas (alturas) de cosecha.

El contenido de sustancias antioxidantes fue similar en las tres materias primas provenientes de las tres fincas, lo que hace que esta característica sea positiva y no un criterio de exclusión a la hora de la selección de cualquiera de las mismas.

Se validó una nueva metodología por GC/MS para la cuantificación de acrilamida en café tipo excelso proveniente de una misma región del País y diferentes alturas de cosecha. Posterior a esta etapa de validación se pudo establecer que la metodología fue lineal, precisa, reproducible y selectiva y se implementó como una nueva metodología de cuantificación y verificación de calidad ya que en Colombia no se contaba con metodologías por GC/MS para la cuantificación de acrilamida en café; además esta técnica es novedosa al obviar el paso de derivatización del analito, lo cual es recurrente en análisis por GC/MS.

Luego de la cuantificación de aminoácidos y azúcares remanentes se evidenció que los aminoácidos son el reactivo límite en la reacción de Maillard y en la formación de acrilamida.

Al no encontrar niveles de D-(+)-glucosa remanentes pero si de D-(+)-fructosa, se concluyó que el azúcar reductor más involucrado en la formación de acrilamida es la D-(+)-glucosa.

Aunque los contenidos de L-asparagina y glucosa no son significativamente diferentes en las materias primas, se evidenció que sus ligeros bajos niveles si influyen en la formación de acrilamida, pues la Finca 2 que obtuvo los menores valores de estos precursores, también obtuvo los valores más bajos de acrilamida.

Luego del análisis PCA en café tostado y molido se estableció que las fincas se agrupan no por altura sino por nivel de tostado, y que esto guarda relación con los niveles de sustancias encontrados, por ejemplo, las muestras de tostado alto se ubican en el mismo cuadrante donde se ubica la acrilamida, la cual presenta mayores niveles en estas muestras.

En relación con la merma por el efecto de tostado se evidenció un incremento progresivo o concentración de sustancias como la L-5-oxoprolina, producto de la oxidación de la prolina y de los azúcares alcoholes que no participan en la reacción de Maillard.

El grado de tostado es el efecto principal común que influye directamente y de manera significativa ($p<0,05$) tanto en la composición de los precursores como en el

contenido de sustancias antioxidantes, los cuales están relacionados con el contenido de acrilamida. Los valores de acrilamida son significativamente diferentes ($p<0,05$) según el grado de tostado y según la altura de cosecha del café como efectos principales, variación que está ligada hipotéticamente a la composición del suelo y a los microclimas.

Mediante un modelo PLS crosvalidado se estableció que los aminoácidos L-glicina, L-valina, L-leucina, L-5-oxoprolina, L-metionina, L-treoina, L-asparagina, se pueden postular como predictores para la formación de acrilamida, teniendo la asparagina coeficientes de correlación de 0,999963; 1,000 y 1,000 y errores cercanos a 4,1; 0,0 y 0,0 para las materias primas tostadas a niveles bajo, medio y alto respectivamente.

Se evidenció que es posible sumar a los cafés producidos con bajos niveles de acrilamida altos niveles de L-5-oxoprolina la cual está relacionada con efectos positivos sobre la cognición humana.

Los tres grados de tostado seleccionados para obtener perfiles de bebida de interés comercial, pudieron ser empleados para identificar que el café de mayor tostado contiene los máximos niveles de acrilamida y perfil sensorial adecuado.

Según la alta calidad en taza y el contenido de sustancias antioxidantes, es posible elaborar un café con excelentes características organolépticas, y con bajos niveles de acrilamida, una vez se evidenció que existen alturas que producen materias primas con baja expresión de precursores.

Perspectivas y recomendaciones

Debido a que los niveles de tostado del café de este estudio obedecen a intereses comerciales, se recomienda evaluar a profundidad diferentes curvas de tostado y empleando los mismos principios y/o objetivos aquí descritos.

Se recomienda también hacer en la medida de lo posible un mapeo de mayor cobertura sobre la geografía nacional, que permita alimentar a profundidad un modelo de regresión (PLS) para la predicción del comportamiento de la acrilamida.

Por último, se recomienda realizar estudios de microambiente y de composición del suelo que permitan comprender las relaciones entre el genotipo y estos ambientes, para posteriormente correlacionarlos con los niveles de acrilamida formados.

Referencias bibliográficas

Akıllıoglu, H. G., & Gökmen, V. (2013). Mitigation of acrylamide and hydroxymethyl furfural in instant coffee by yeast fermentation. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2013.07.057

Albishri, H. M., & El-Hady, D. A. (2014). Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. *Talanta*, *118*(April 2002), 129–36. doi:10.1016/j.talanta.2013.10.015

Alimentos, E. N., & El, P. (2015). No Title.

Alvarez, R., Carvalho, C. P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londono-Londono, J. (2012). Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *J Agric Food Chem*, *60*(3), 774–781. doi:10.1021/jf203353h

Alves, R. C., Soares, C., Casal, S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*, *119*(3), 929–934. doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.051

Anese, M., Nicoli, M. C., Verardo, G., Munari, M., Mirolo, G., & Bortolomeazzi, R. (2014). Effect of vacuum roasting on acrylamide formation and reduction in coffee beans. *Food Chemistry*, *145*, 168–172. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.047

Anese, M., Suman, M., & Nicoli, M. C. (2010). Acrylamide removal from heated foods. *Food Chemistry*, *119*(2), 791–794. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.043

Avelino, J., Barboza, B., Araya, J. C., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., & Cilas, C. (2005a). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Mar??a de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(11), 1869–1876. doi:10.1002/jsfa.2188

Avelino, J., Barboza, B., Araya, J. C., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., & Cilas, C. (2005b). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitudeterroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, *85*(11), 1869–1876. doi:10.1002/jsfa.2188

Bagdonaite, K., Derler, K., & Murkovic, M. (2008). Determination of acrylamide during roasting of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6081–6. doi:10.1021/jf073051p

Bagdonaite, K., Viklund, G., Skog, K., & Murkovic, M. (2006). Analysis of 3-aminopropionamide: a potential precursor of acrylamide. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *69*(1-2), 215–21. doi:10.1016/j.jbbm.2006.05.008

Banchero, M., Pellegrino, G., & Manna, L. (2013). Supercritical fluid extraction as a potential mitigation strategy for the reduction of acrylamide level in coffee. *Journal of Food Engineering*, *115*(3), 292–297. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.10.045

Barbosa, J. N., Borem, F. M., Cirillo, M. A., Malta, M. R., Alvarenga, A. A., & Alves, H. M. R. (2012). Coffee Quality and Its Interactions with Environmental Factors in Minas Gerais, Brazil. *Journal of Agricultural Science*, *4*(5), 181–190. doi:10.5539/jas.v4n5p181

Bassama, J., Brat, P., Bohuon, P., Boulanger, R., & Günata, Z. (2010). Study of acrylamide mitigation in model system: Effect of pure phenolic compounds. *Food Chemistry*, *123*(2), 558–562. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.071

Bertrand, B., Boulanger, R., Dussert, S., Ribeyre, F., Berthiot, L., Descroix, F., & Joët, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*, *135*(4), 2575–83. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.060

Bertrand, B., Vaast, P., Alpizar, E., Etienne, H., Davrieux, F., & Charmetant, P. (2006). Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. *Tree Physiology*, *26*(9), 1239–1248. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33745426636&partnerID=tZOtx3y1

Bortolomeazzi, R., Munari, M., Anese, M., & Verardo, G. (2012). Rapid mixed mode solid phase extraction method for the determination of acrylamide in roasted coffee by HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, *135*(4), 2687–93.

doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.057

Cai, Y., Zhang, Z., Jiang, S., Yu, M., Huang, C., Qiu, R., … Li, Y. (2014). Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination. *Journal of Hazardous Materials*, *268*, 1–5. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.12.067

Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(4), 793–810. doi:10.1016/j.lwt.2010.11.002

Cb, A. (2002). Health & Nutrition Acrylamide mitigation in coffee using Novozymes Acrylaway ® CB L, (April), 1–3.

Ciencias, F. D. E., & Sociología, P. Y. (2012). Universidad complutense de madrid.

Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, *47*(2), 118–133. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.016

Commission, E. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food, (July).

Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, *53*, 350–357. doi:10.1016/j.indcrop.2014.01.006

De Vleeschouwer, K., Plancken, I. Van der, Loey, A. Van, & Hendrickx, M. E. (2009). Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach – Part I: Effect of the type of sugar. *Food Chemistry*, *114*(1), 116–126. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.024

De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2007). Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology Progress*, *23*(3), 722–8. doi:10.1021/bp060389f

De Wilde, T., De Meulenaer, B., Mestdagh, F., Govaert, Y., Vandeburie, S., Ooghe, W., … Verhé, R. (2006). Influence of fertilization on acrylamide formation during frying

of potatoes harvested in 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 404–8. doi:10.1021/jf0521810

Decazy, F., Avelino, J., Guyot, B., Perriot, J. J., Pineda, C., & Cilas, C. (2003). Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. *Journal of Food Science*, *68*(7), 2356–2361. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0141702218&partnerID=tZOtx3y1

Delatour, T., Périsset, A., Goldmann, T., Riediker, S., & Stadler, R. H. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(15), 4625–31. doi:10.1021/jf0498362

Desbrosses, G., & Steinhauser, D. (2005). Metabolome analysis using GC-MS. *Lotus Japonicus Handbook*, *4*(6), 165–174. doi:10.1007/1-4020-3735-X_17

Dybing, E., & Sanner, T. (2003). Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *75*(1), 7–15. doi:10.1093/toxsci/kfg165

EFSA. (2015a). EFSA Press Release_ Acrylamide in food is a public health concern.

EFSA. (2015b). Scientific Opinion on Acrylamide in food. *EFSA Journal*, *13*(6), 4104. doi:10.2903/j.efsa.2015.4104.

Eriksson, S. (2005). *Acrylamide in food products : Identification , formation and analytical methodology*.

Eriksson, S., & Karlsson, P. (2006). Alternative extraction techniques for analysis of acrylamide in food: Influence of pH and digestive enzymes. *LWT - Food Science and Technology*, *39*(4), 393–399. doi:10.1016/j.lwt.2005.03.002

Erkekoglu, P., & Baydar, T. (2014). Acrylamide neurotoxicity. *Nutritional Neuroscience*, *17*(2), 49–57. Retrieved from 10.1179/1476830513Y.0000000065

Farah, A. (2012). Coffee Constituents. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, 21–58. doi:10.1002/9781119949893.ch2

Food and Drug Administration. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. *U.S. Department of Health and Human Services*, (May), 4–10. doi:http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf

Food, E., & Authority, S. (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010 1, *10*(10), 1–38. doi:10.2903/j.efsa.2012.2938.Available

Gil, A. (2012). Estabilidad y Actividad Antioxidante de Catequinas Presentes en Cacaos Colombianos durante los Procesos de Pre e Industrilización., *16*, 119. doi:10.5334/ai.1615

Go, V. (2005). Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method : Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting, *22*(March), 214–220. doi:10.1080/02652030500109834

Gökmen, V., Kocadağlı, T., Göncüoğlu, N., & Mogol, B. A. (2012). Model studies on the role of 5-hydroxymethyl-2-furfural in acrylamide formation from asparagine. *Food Chemistry*, *132*(1), 168–174. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.048

Gökmen, V., & Şenyuva, H. Z. (2006). Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chemistry*, *99*(2), 238–243. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.054

Granby, K., & Fagt, S. (2004). Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee. *Analytica Chimica Acta*, *520*(1-2), 177–182. doi:10.1016/j.aca.2004.05.064

Guenther, H., Anklam, E., Wenzl, T., & Stadler, R. H. (2007). Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Additives and Contaminants*, *24 Suppl 1*, 60–70. doi:10.1080/02652030701243119

Headquarters, W. H. O. (2002). Report of a Joint FAO / WHO Consultation, (June).

Hoenicke, K., & Gatermann, R. (n.d.). Studies on the stability of acrylamide in food during storage. *Journal of AOAC International*. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15759751

Hospitalarios, Y. D. L. R. (2002). Resolucion Numero 01164 De 2002. *Alianzaconsultoria.Com*, *2002*(02), 1–7. Retrieved from http://www.alianzaconsultoria.com/PDF/Resolucion 1164 gestion residuos.pdf

IARC. (1994). Acrylamide. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 60 Some Industrial Chemicals*, 389–433.

ICONTEC Internacional. (n.d.). Norma Tecnica Colombiana NTC 5938-CAFE VERDE USO INDUSTRIAL.

Jaeger, H., Janositz, A., & Knorr, D. (2010). The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathologie-Biologie*, *58*(3), 207–13. doi:10.1016/j.patbio.2009.09.016

Jezussek, M., & Schieberle, P. (2003). A new LC/MS-method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(27), 7866–71. doi:10.1021/jf0349228

Jin, C., Wu, X., & Zhang, Y. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation : A review. *FRIN*, *51*(2), 611–620. doi:10.1016/j.foodres.2012.12.047

Joët, T., Laffargue, A., Descroix, F., Doulbeau, S., Bertrand, B., kochko, A. de, & Dussert, S. (2010). Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry*, *118*(3), 693–701. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.048

Katerine K. Stenerson. (2011). The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GC-. *Sigma-Aldrich*, *25*(2), 9–11. Retrieved from http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/reporter-us/pdf/the-derivatization.pdf

Kleinwächter, M., & Selmar, D. (2010). Influence of drying on the content of sugars in

wet processed green Arabica coffees. *Food Chemistry*, *119*(2), 500–504. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.048

Kuncewicz, A., & Michalak, J. (2013). Journal of Food Composition and Analysis RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods, *32*(23701), 68–73. doi:10.1016/j.jfca.2013.08.006

Kwon, D.-J., Jeong, H.-J., Moon, H., Kim, H.-N., Cho, J.-H., Lee, J.-E., … Hong, Y.-S. (2015). Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a 1H NMR-based metabolomics approach. *Food Research International*, *67*, 175–182. doi:10.1016/j.foodres.2014.11.010

L, A. C. B. (2011). Acrylamide , a contaminant naturally formed in many food products.

Li Kwok Cheong, J. D., Croft, K. D., Henry, P. D., Matthews, V., Hodgson, J. M., & Ward, N. C. (2014). Green coffee polyphenols do not attenuate features of the metabolic syndrome and improve endothelial function in mice fed a high fat diet. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *559*, 46–52. doi:10.1016/j.abb.2014.02.005

Lineback, D. R., Coughlin, J. R., & Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*, 15–35. doi:10.1146/annurev-food-022811-101114

Liu, Y., Wang, P., Chen, F., Yuan, Y., Zhu, Y., Yan, H., & Hu, X. (2015). Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chemistry*, *186*, 46–53. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.122

Loaëc, G., Jacolot, P., Helou, C., Niquet-Léridon, C., & Tessier, F. J. (2014). Acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and N(ε)-carboxymethyl-lysine in coffee substitutes and instant coffees. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, *31*(4), 593–604. doi:10.1080/19440049.2014.885661

Loaëc, G., Niquet-Léridon, C., Henry, N., Jacolot, P., Volpoet, G., Goudemand, E., … Tessier, F. J. (2014). Effects of variety, agronomic factors, and drying on the amount of free asparagine and crude protein in chicory. Correlation with the acrylamide formation during roasting. *Food Research International*.

doi:10.1016/j.foodres.2014.03.010

Ludwig, I. A., Bravo, J., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(2), 553–559. doi:10.1016/j.lwt.2012.12.010

Ludwig, I. A., Sánchez, L., De Peña, M. P., & Cid, C. (2014). Contribution of volatile compounds to the antioxidant capacity of coffee. *Food Research International*, *61*, 67–74. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.045

Machado, S. R., Parise, E. R., & de Carvalho, L. (2014). Coffee has hepatoprotective benefits in Brazilian patients with chronic hepatitis C even in lower daily consumption than in American and European populations. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *18*(2), 170–6. doi:10.1016/j.bjid.2013.09.001

Maeso, N., del Castillo, C., Cornejo, L., García-Acicollar, M., Alguacil, L. F., & Barbas, C. (2006). Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(4), 1095–1100. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.062

Masson, J., Liberto, E., Brevard, H., Bicchi, C., & Rubiolo, P. (2014). A metabolomic approach to quality determination and authentication of raw plant material in the fragrance field. Iris rhizomes: a case study. *Journal of Chromatography. A*, *1368*, 143–54. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.076

Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F., & De Meulenaer, B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products – Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, *133*(4), 1138–1154. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.001

Mestdagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, K., Van Peteghem, C., & De Meulenaer, B. (2008). Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chemistry*, *107*(1), 26–31. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.013

Mills, C. E., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. E. (2013). The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, *141*(4), 3335–40.

doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.014

Monteiro, M. C., & Farah, A. (2012). Chlorogenic acids in Brazilian Coffea arabica cultivars from various consecutive crops. *Food Chemistry*, *134*(1), 611–614. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.118

Murkovic, M., & Derler, K. (2006a). Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *69*(1-2), 25–32. doi:10.1016/j.jbbm.2006.02.001

Murkovic, M., & Derler, K. (2006b). Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *69*(1-2), 25–32. doi:10.1016/j.jbbm.2006.02.001

No Title. (n.d.).

O'Keefe, J. H., Bhatti, S. K., Patil, H. R., DiNicolantonio, J. J., Lucan, S. C., & Lavie, C. J. (2013). Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*, *62*(12), 1043–51. doi:10.1016/j.jacc.2013.06.035

Oberthür, T., Läderach, P., Posada, H., Fisher, M. J., Samper, L. F., Illera, J., … Jarvis, A. (2011). Regional relationships between inherent coffee quality and growing environment for denomination of origin labels in Nariño and Cauca, Colombia. *Food Policy*, *36*(6), 783–794. doi:10.1016/j.foodpol.2011.07.005

Oliveira, S. D., Franca, A. S., Glória, M. B. A., & Borges, M. L. A. (2005). The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. *Food Chemistry*, *90*(1-2), 287–291. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.056

Oracz, J., Nebesny, E., & Zyżelewicz, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, *86*, 23–34. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.066

Ortega, L. A., García, F. J. G., & Junca, T. G. (2011). Validacion de metodos analiticos (AEFI).pdf.

Outline, C. (2008). Chapter 3. *Blood*, (2007), 33–49.

Pastoriza, S., Ángel, J., & Morales, F. J. (2012). LWT - Food Science and Technology Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems, *45*, 198–203. doi:10.1016/j.lwt.2011.08.004

Pittet, A., Périsset, A., & Oberson, J.-M. (2004). Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1035*(1), 123–130. doi:10.1016/j.chroma.2004.02.037

Prakash, K. M., & Tan, E.-K. (2011). Clinical evidence linking coffee and tea intake with Parkinson's disease. *Basal Ganglia*, *1*(3), 127–130. doi:10.1016/j.baga.2011.07.001

Puerta, G. (2011). Composición química de una taza de café. *Avances En Química*, (414), 1–12. Retrieved from http://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/avances_tecnicos/publicaciones_avt0414composicion_quimica_de_una_taza_de_cafe

Riboldi, B. P., Vinhas, Á. M., & Moreira, J. D. (2014). Risks of dietary acrylamide exposure: A systematic review. *Food Chemistry*, *157*, 310–322. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.046

Rufián-Henares, J. a., & Pastoriza, S. (2015). *Melanoidins in Coffee*. *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00020-6

S. Oestreich-Janzen, Gmbh, C. (2010). *Chemistry of Coffee*. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. Elsevier Inc. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00708-5

Social, M. D. S. Y. P. (2012). Concepto cientifico acrilamida en panela, 38.

Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. a, … Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, *419*(6906), 449–50. doi:10.1038/419449ª

States, M., Ferrari, P., Busk, L., & Doerge, D. (2010). SCIENTIFIC REPORT OF EFSA, *8*(5). doi:10.2903/j.efsa.2010.1599.

Suárez-Quiroz, M. L., Alonso Campos, A., Valerio Alfaro, G., González-Ríos, O., Villeneuve, P., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2014). Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon. *Journal of Food Composition and Analysis*, *33*(1), 55–58. doi:10.1016/j.jfca.2013.10.005

Summa, C. a., de la Calle, B., Brohee, M., Stadler, R. H., & Anklam, E. (2007). Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(10), 1849–1854. doi:10.1016/j.lwt.2006.11.016

Sun, S., Fang, Y., & Xia, Y. (2012). A facile detection of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC strategy. *Food Control*, *26*(2), 220–222. doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.028

Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., … Whitmore, T. (2004). A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(5), 323–47. doi:10.1080/10408690490478082

Tardiff, R. G., Gargas, M. L., Kirman, C. R., Carson, M. L., & Sweeney, L. M. (2010). Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *48*(2), 658–67. doi:10.1016/j.fct.2009.11.048

The, R., Of, V., & Commission, T. H. E. (2013). AND OF THE EXPERT COMMITTEE " AGRICULTURAL. doi:10.2903/j.efsa.2012.2938.

Valsta, L., Pesci, M., Wenzl, T., & Doerge, D. (2011). SCIENTIFIC REPORT OF EFSA, *9*(4), 1–48. doi:10.2903/j.efsa.2011.2133.Available

van Boekel, M. A. J. S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, *24*(2), 230–3. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.11.004

Wang, H., Feng, F., Guo, Y., Shuang, S., & Choi, M. M. F. (2013). HPLC-UV

quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *31*(1), 7–11. doi:10.1016/j.jfca.2013.02.006

Wilson, K. M., Mucci, L. a, Rosner, B. a, & Willett, W. C. (2010). A prospective study on dietary acrylamide intake and the risk for breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *19*(10), 2503–15. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0391

Zhang, Y., & Zhang, Y. (2008). Effect of natural antioxidants on kinetic behavior of acrylamide formation and elimination in low-moisture asparagine–glucose model system. *Journal of Food Engineering*, *85*(1), 105–115. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.07.013

Zyzak, D. V, Sanders, R. a, Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., … Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(16), 4782–7. doi:10.1021/jf034180i

Apéndices

Apéndice A. Matriz de correlación para la materia prima.

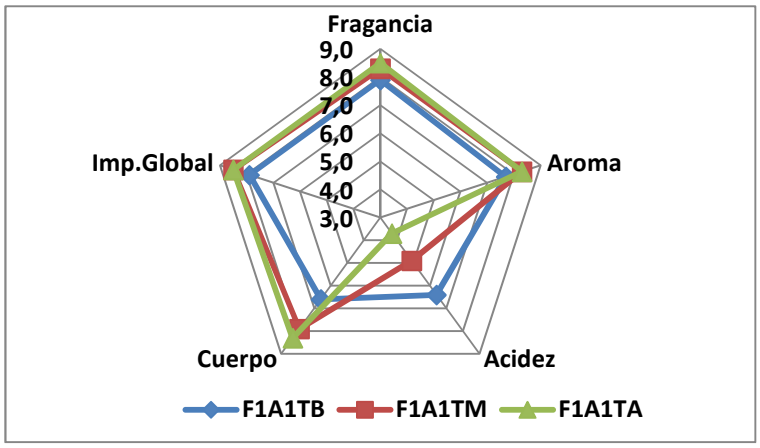
VARIABLE	Tipo	Alanina	Glicina	Valina	Leucina	Isoleucina	Prolina	5-oxoprolina	Metionina	Serina	Treonina	Ácido glutámico	D-(+) Ribosa	D-(+) Fructosa	D-(+) Glucosa	ACGS
Glicina	Corr.	0,751														
	Valor p	0,020														
Valina	Corr.	0,792	***0,910***													
	Valor p	0,011	***0,001***													
Leucina	Corr.	0,779	***0,922***	***0,981***												
	Valor p	0,013	***0,000***	***0,000***												
Isoleucina	Corr.	0,733	***0,862***	***0,982***	***0,943***											
	Valor p	0,025	***0,003***	***0,000***	***0,000***											
Prolina	Corr.	***0,866***	0,766	0,760	0,695	0,772										
	Valor p	***0,003***	0,016	0,017	0,038	0,015										
5-oxoprolina	Corr.	0,680	***0,953***	0,779	***0,820***	0,698	0,665									
	Valor p	0,044	***0,000***	0,013	***0,007***	0,036	0,051									
Serina	Corr.	0,523	***0,882***	0,745	0,717	0,729	0,688	***0,878***	-0,716							
	Valor p	0,149	***0,002***	0,021	0,030	0,026	0,040	***0,002***	0,030							
Treonina	Corr.	0,745	0,704	0,794	0,767	0,790	0,758	0,523	0,157	0,404						
	Valor p	0,021	0,034	0,011	0,016	0,011	0,018	0,149	0,687	0,280						
Fenilalanina	Corr.	0,632	0,640	***0,841***	0,751	***0,853***	0,654	0,478	0,119	0,518	0,776					
	Valor p	0,068	0,063	***0,005***	0,020	***0,003***	0,056	0,193	0,760	0,153	0,014					
Ácido aspártico	Corr.	0,552	***0,839***	0,657	0,626	0,634	0,758	***0,870***	-0,674	***0,949***	0,448					
	Valor p	0,124	***0,005***	0,054	0,072	0,067	0,018	***0,002***	0,047	***0,000***	0,227					
Ácido glutámico	Corr.	0,601	0,776	0,582	0,689	0,449	0,415	***0,901***	-0,408	0,632	0,333					
	Valor p	0,087	0,014	0,100	0,040	0,225	0,267	***0,001***	0,275	0,068	0,381					

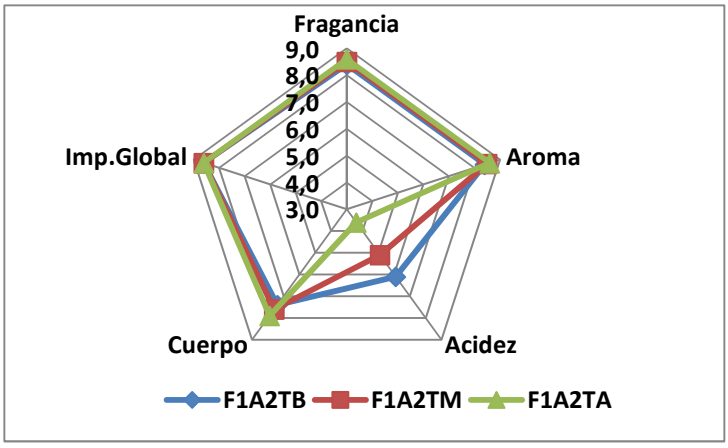
Asparagina	Corr.	0,572	0,466	0,304	0,370	0,192	0,372	0,639	-0,081	0,327	0,143	***0,758***				
	Valor p	0,108	0,206	0,426	0,327	0,621	0,324	0,064	0,836	0,390	0,713	***0,018***				
D-(+) Ribosa	Corr.	0,165	0,597	0,391	0,442	0,347	0,198	0,695	***-0,806***	0,774	-0,125	0,646				
	Valor p	0,672	0,089	0,298	0,234	0,361	0,610	0,038	***0,009***	0,014	0,749	0,060				
D-(+) Glucosa	Corr.	0,353	0,352	0,231	0,326	0,161	0,149	0,435	-0,355	0,337	-0,160	0,586	0,708	***0,949***		
	Valor p	0,352	0,352	0,549	0,391	0,679	0,703	0,242	0,349	0,375	0,681	0,097	0,033	***0,000***		
D-(+) Galactosa	Corr.	0,351	0,376	0,253	0,349	0,185	0,155	0,454	-0,372	0,361	-0,145	0,596	0,727	***0,947***	***0,999***	
	Valor p	0,354	0,319	0,511	0,358	0,634	0,690	0,220	0,325	0,340	0,711	0,090	0,026	***0,000***	***0,000***	
Myo-Inositol	Corr.	-0,209	-0,388	-0,258	-0,249	-0,265	-0,406	-0,289	0,117	-0,209	-0,689	-0,111	0,209	0,214	0,431	
	Valor p	0,589	0,302	0,503	0,518	0,490	0,278	0,451	0,764	0,590	0,040	0,776	0,590	0,580	0,247	
PFT	Corr.	0,096	0,204	0,144	0,236	0,131	0,159	0,311	0,074	0,146	0,163	0,415	0,075	0,033	-0,015	0,678
	Valor p	0,806	0,598	0,712	0,541	0,737	0,683	0,416	0,851	0,708	0,676	0,267	0,848	0,934	0,969	0,045

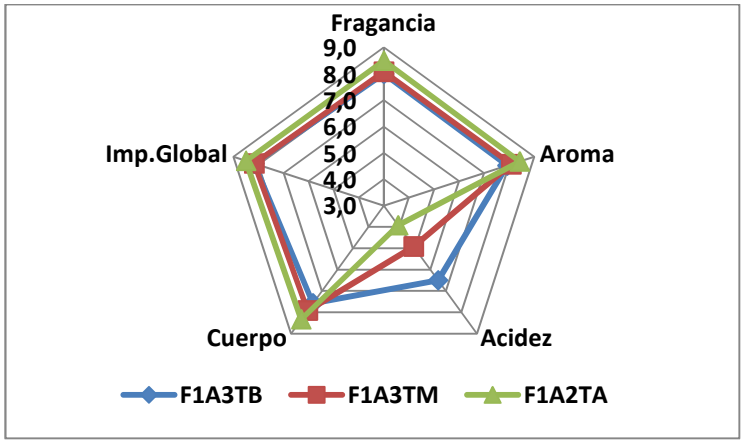
Apéndice B. Matriz de correlación para el café tostado y molido.

VARIABLES	TIPO	5-oxoprolina	D-(+) Fructosa	D-(+) Galactosa	Myo-Inositol	Acrilamida	ACGS	PFT	Color	Densidad
D-(+) Fructosa	Corr.	-0,312								
	Valor p	0,113								
D-(+) Galactosa	Corr.	-0,303	***0,984***							
	Valor p	0,125	***0,000***							
D-Manitol	Corr.	0,447	-0,067	-0,048						
	Valor p	0,019	0,742	0,812						
Myo-Inositol	Corr.	0,554	-0,349	-0,385						
	Valor p	0,003	0,074	0,048						
Acrilamida	Corr.	0,625	-0,252	-0,292	0,579					
	Valor p	0,000	0,204	0,140	0,002					
ACGS	Corr.	-0,752	0,532	0,527	-0,738	-0,534				
	Valor p	0,000	0,004	0,005	0,000	0,004				
PFT	Corr.	-0,720	0,410	0,354	-0,565	-0,234	***0,823***			
	Valor p	0,000	0,034	0,070	0,002	0,240	***0,000***			
Color	Corr.	-0,789	0,506	0,499	-0,746	-0,545	***0,991***	***0,813***		
	Valor p	0,000	0,007	0,008	0,000	0,003	***0,000***	***0,000***		
Densidad	Corr.	-0,784	0,593	0,575	-0,671	-0,506	***0,962***	***0,800***	***0,971***	
	Valor p	0,000	0,001	0,002	0,000	0,007	***0,000***	***0,000***	***0,000***	
pH	Corr.	0,773	-0,558	-0,550	0,536	0,545	***-0,879***	0,709	***-0,876***	***-0,926***
	Valor p	0,000	0,002	0,003	0,004	0,003	***0,000***	0,000	***0,000***	***0,000***

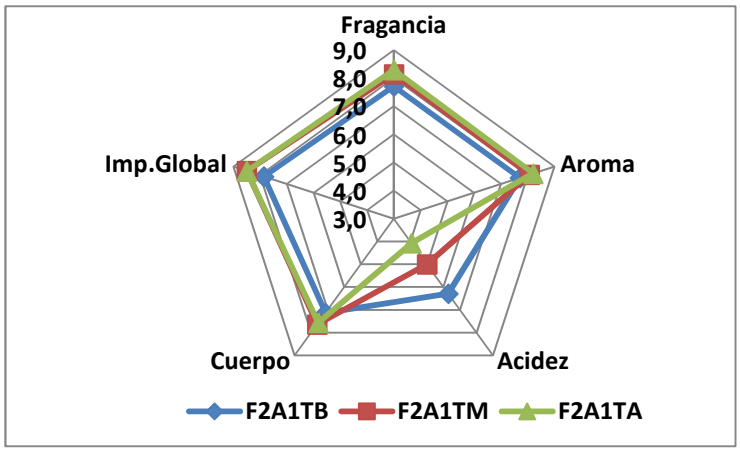
Apéndice C. Calificación sensorial muestras Finca 1.

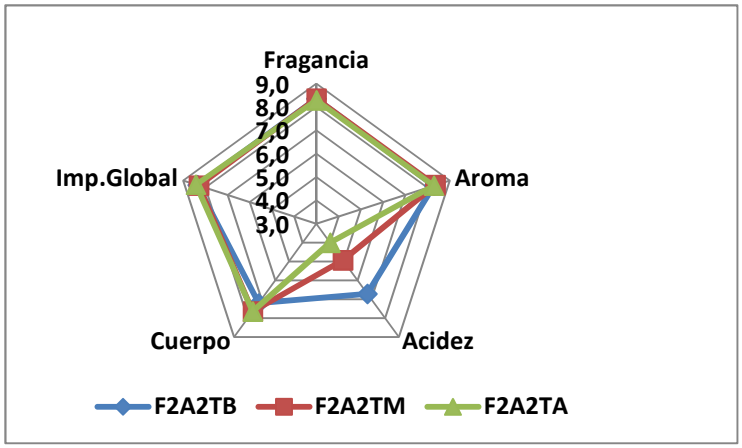


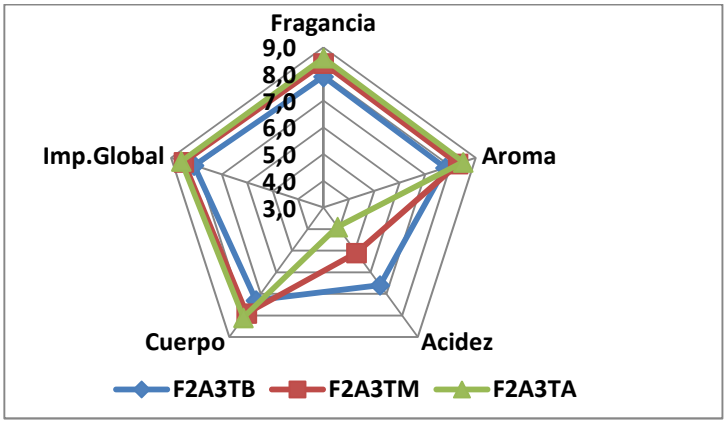
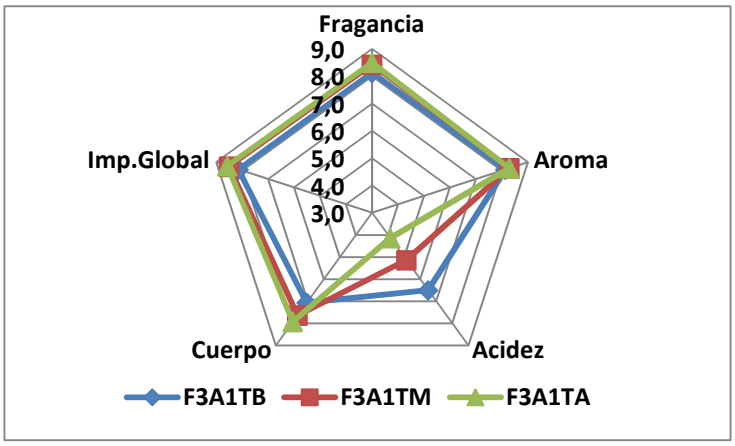
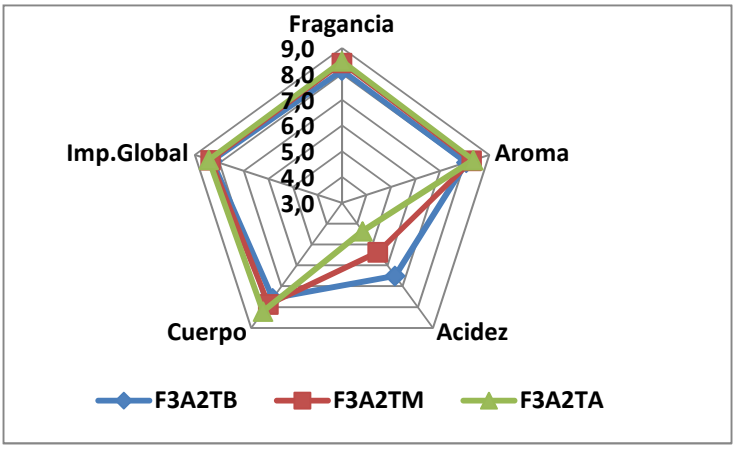
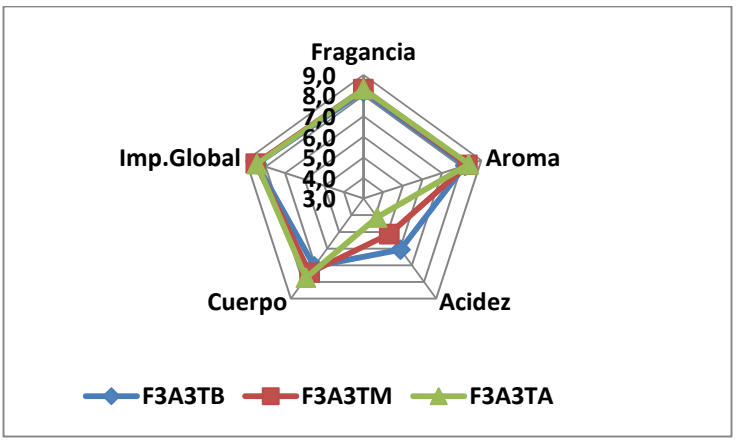




Apéndice D. Calificación sensorial muestras Finca 2.







Apéndice E. Calificación sensorial muestras Finca 3.