



Ciencias
Químicas
FACULTAD

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica – Alimentos

**Determinación de la influencia del grado de tostado del café en la
incorporación de compuestos fenólicos en melanoidinas y su
relación con la actividad antioxidante**

Tesis para obtener el título de

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta

pQFB. Marcela González Guarneros

pQFB. María Isabel Ramos Bolaños

Director

Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio

Asesores

Dr. José L. Garate Morales

Dra. Laura Morales Lara

Noviembre 2015

ÍNDICE

	Página
I. ÍNDICE DE FIGURAS	I
II. ÍNDICE DE TABLAS	II
III. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	III
IV. RESUMEN	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Producción de café en México	4
2.2. Composición química del café.....	4
2.2.1 Compuestos fenólicos	6
2.2.2 Cafeína.....	8
2.3. Reacción de Maillard	9
2.3.1. Melanoidinas	10
2.4. Actividad antioxidante	11
2.4.1. Determinación de la actividad antioxidante	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos particulares.....	14
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1. Material	16
6.2. Sustancias químicas.....	16
6.3. Material biológico.....	16
6.4. Métodos	17
7. METODOLOGÍA.....	18

7.1.	Tratamiento de los granos de <i>Coffea arabica</i>	18
7.2.	Preparación de la bebida de café y nano partículas de interés.....	18
7.3.	Determinación de fenoles totales	18
7.4.	Determinación de sólidos solubles.....	19
7.5.	Preparación de la bebida de café clarificada.....	19
7.6.	Cuantificación de compuestos de alto peso molecular (melanoidinas) por espectrofotometría y su evaluación de actividad antioxidante por el método de captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	19
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
8.1.	Muestras de granos <i>Coffea arabica</i> y tratamiento del grano de café verde .	21
8.2.	Disminución de tamaño del grano del café	22
8.3.	Preparación de la bebida de café y partículas de interés.	23
8.4.	Determinación de fenoles totales	25
8.5.	Determinación de sólidos solubles	26
8.6.	Análisis espectrofotométrico de Melanoidinas y su evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH	27
9.	CONCLUSIONES	32
10.	RECOMENDACIONES	33
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	34
12.	ANEXOS.....	38
12.1.	Fenoles totales	38
12.2.	HMWF	39
12.3.	Actividad antioxidante	41

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título de la Figura	Página
1	Estructura química de 5-ácido cafeoilquinico (ácido clorogénico).	7
2	Estructuras de los tres ácidos hidroxicinámicos encontrados en el café de mayor concentración. Ácido caféico (CA). Ácido ferúlico (FA). Ácido p-cumarico (p-CoA).	8
3	Estructura química de cafeína.	8
4	Granos de café verde y tostado tratados a diferentes tiempos. A) Grano verde. B) Grano tostado por 5 min. C) Grano de café tostado por 6 min. D) Grano de café tostado por 7 min. E) Grano de café tostado por 8min.	21
5	Tratamiento para la disminución del tamaño de partícula. A) Granos de café tostado enteros. B) Café tostado pulverizado. C) Granos de café verde enteros. D) Grano verde pulverizado.	23
6	Procedimiento de preparación de muestras. A) Muestra de café adicionado al agua en ebullición. B) Mezcla de la bebida de café. C) Sonicator Brandon 5510. D) Bebidas de café para sonicar.	24
7	Bebidas de café llevadas a sonicación y filtración. A) Bebidas de café sonicadas y llevadas a vórtex. B) Filtración de la bebida de café.	24
8	Reacción de fenoles totales presentes en las muestras de café con los agentes oxidantes del reactivo de Follin-Ciocalteau.	25
9	Bebidas de café con las soluciones de Carrez`s I y II.	27
10	Concentración de HMWF de las bebidas de café clarificadas y no clarificadas.	29
11	Reacción del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo con la bebida de café.	29
12	Presencia de CGA`S en los diferentes tiempos de tostado.	30
13	Actividad antioxidante durante el proceso de tostado.	31

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Compuestos químicos del grano de café verde.	5
2	Composición de granos de café arabica verde y tostado.	6
3	Métodos utilizados para cada determinación.	17
4	Peso perdido durante el tostado de las muestras de <i>Coffea arabica</i> .	22
5	Absorbancias de compuestos fenólicos de las fracciones de café mediante espectrofotometría UV-VIS.	26
6	Sólidos solubles en el café.	27
7	Comparación de compuestos en las bebidas de café clarificadas.	31

III. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
DPPH	Radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo
mL	Mililitro
μ L	Micro litro
mmol	Mili moles
CGA	Ácido clorogénico
HMWF	Compuesto de alto peso molecular
Min	Minutos
G	Gramos
Nm	Nanómetros
AOAC	Asociación oficial de químicos analíticos
UV/VIS	Ultra-violeta-visible
ROS	Especies reactivas de oxígeno
LP	Peroxidación lipídica

IV. RESUMEN

El café es la bebida más consumida a nivel mundial, debido a su sabor y aromas particulares que son el resultado de sustancias químicas que se originan en la semilla de café durante el proceso de tostado. Es abundante en compuestos fenólicos y melanoidinas, los cuales le confieren efectos antioxidantes que son benéficos para la salud ya que evitan daños tisulares por radicales libres al reducir su formación o eliminarlos una vez originados; estos compuestos son sensibles al incremento de temperatura, es por ello que el objetivo de esta tesis fue determinar la influencia del grado de tostado del café *Coffea arabica* en la incorporación de compuestos fenólicos en melanoidinas y su relación con la actividad antioxidante. Los granos de café *Coffea arabica* verdes fueron sometidos a diferentes tratamientos de tostado a 220°C por 5, 6, 7 y 8 min, se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales por el método de Follin- Ciocalteau, los sólidos solubles de acuerdo a la AOAC, a las bebidas de café y a las bebidas de café clarificadas obtenidas bajo las condiciones de tostado señaladas previamente, también se evaluó la actividad antioxidante por el método de DPPH. Las bebidas clarificadas fueron analizadas por su actividad antioxidante en relación a su contenido de melanoidinas, así como se identificó la presencia de ácido clorogénico mediante espectrofotometría. Los resultados mostraron que las bebidas no clarificadas presentaron una mayor concentración de fenoles totales a los 5 y 6 min de tostado (52 y 46 mg de ácido clorogénico respectivamente), lo que sugiere que durante el tostado hay una disminución de ácido clorogénico componente mayoritario de los ácidos hidroxicinámicos, los cuales son más abundantes en el grano verde en donde se identificó que presentaban 61 mg de ácido clorogénico. A estas muestras también se les determinó sólidos solubles, identificándose que la mayor concentración se obtuvo a los tiempos de tostado de 6 y 7 min (0.058 g/mL de muestra), por lo que a estas condiciones es posible que se liberen favorablemente carbohidratos y proteínas solubilizadas en estas muestras, su presencia es importante pues contribuyen al aroma y la coloración, otorgándole una mejor calidad a la bebida.

Se mostró que a mayor tiempo de tostado, mayor formación de HMWF (melanoidinas), ya que se encontró que a 7 y 8 min del tostado se obtuvo 2.80 y 3.14 $Lg^{-1}cm^{-1}$, este valor fue mayor al que presentó el grano verde ($0.99 Lg^{-1} cm^{-1}$) lo que sugiere que a mayor tiempo de tostado se favorece la formación de HMWF debido a la incorporación de CGA a las melanoidinas como se demostró por su presencia mediante espectrofotometría.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el café tiene un valor económico y social de suma importancia ya que está presente en la vida diaria de millones de hombres y mujeres en el mundo. En la actualidad dos tercios de todo el café se cultivan en América Latina, siendo México uno de los 10 principales productores y exportadores a nivel mundial (Fundación Produce Chiapas A.C., 2003). El café es una mezcla química compleja que incluye en su composición hidratos de carbono, lípidos, compuestos nitrogenados, vitaminas, minerales, alcaloides y compuestos fenólicos (Spiller, 1998; Bekedam y col. 2008) de los cuales el CGA es un éster formado por ácido *trans*-cinámico y ácido quínico (Clifford M. N., 1999), del grupo de CGAs destacan: ácido caféico, ferúlico y *p*-cumárico (Farah y col. 2005). El interés en la identificación de CGAs ha surgido por estudios que demuestran sus propiedades farmacológicas, antioxidantes y su capacidad para inhibir compuestos carcinogénicos (Farah y col. 2005).

Uno de los procesos determinantes de las propiedades químicas biológicas y organolépticas del café es el tostado, en donde el grano se somete a temperatura superior a 150°C, aquí se presenta una pérdida de peso con respecto al grano de café verde de 10% a 24% m/m (NMX-F-013-SCFI-2010). Cuando el café verde es sometido al proceso de tostado da lugar a una serie de reacciones y cambios químicos, como la reducción de azúcares con grupos amino, lo que brinda su sabor y color característico. Su color café es producto de la reacción de Maillard, la cual es un tipo de reacción de oscurecimiento no enzimático que se imparte al alimento y da como producto final a las melanoidinas por sus siglas en inglés HMWF (Billaud y col., 2003). Estos compuestos de alto peso molecular son no volátiles, contienen compuestos nitrogenados y son consideradas como macromoléculas responsables del color y aroma del café tostado. A pesar de que su estructura es extremadamente compleja y desconocida en gran parte, se ha reportado que son componentes fisiológicamente activos (Gniechwitz y col., 2008; Pino-García y col., 2012). Los

responsables de que esto suceda son los CGAs presentes en los compuestos HMWF del café, haciendo una correlación con la concentración de las melanoidinas (Bekedam y col., 2008), confiriéndole así propiedades funcionales a las melanoidinas como la actividad antioxidante. Esto hace más interesante a nivel mundial el consumo de las bebidas de café no solo por su agradable sabor, también ha resultado interesante como una fuente de antioxidantes (Halvorsen y col., 2006).

2. ANTECEDENTES

El café es una de las bebidas más populares en México, siendo originario de Etiopía (antiguamente Abisinia) y de Sudán, se extendió a otras partes del mundo pasando por Arabia. El cafeto es un arbusto tropical de la familia de las Rubiáceas y género *Coffea* spp, crece en zonas de moderada humedad, entre los 600 y los 1,200 metros de altura. Las principales especies cultivadas y de importancia comercial son *C. arabica* y *C. canephora*. El cafeto produce frutos llamados cerezas de café con dos núcleos que contienen cada uno un grano o semilla de café de color verde (Belitz y Grosch, 1999).

En virtud de su diversa composición química, cuando el café verde es sometido al proceso de tostado da lugar a una serie de reacciones y cambios químicos, como la reducción de azúcares con grupos amino, lo que brinda su sabor y color característico. Su color café es producto de la reacción de Maillard, que da como producto final a las melanoidinas. Una de las propiedades funcionales de las melanoidinas es la actividad antioxidante la cual se debe en parte a la incorporación de ácidos clorogénicos (CGAs), esto ha hecho que el consumo de las bebidas de café obtenga la atención de la población a nivel mundial no solo por su agradable sabor sino también por ser fuente de antioxidantes, como lo ha reportado el American Journal of Clinical Nutrition, en el 2006, en donde se publicó que en 100 g de café se encuentran aproximadamente 1.249 mmol de antioxidante, esto es interesante debido a que el consumo de antioxidantes está relacionado con la eliminación de los radicales libres, los cuales generan daño a las células del cuerpo causando alteraciones en el organismo como el cáncer. Por lo que es importante conocer cómo se modifica o altera la actividad antioxidante durante el procesamiento del café, con el objetivo de cuidar al máximo la elaboración del producto, fuente de antioxidantes importante en la dieta de muchas personas alrededor del mundo (Halvorsen y col., 2006).

2.1. Producción de café en México

Aproximadamente dos tercios de todo el café se cultivan en América Latina, actualmente nuestro país es uno de los 10 principales productores y exportadores a nivel mundial con un promedio de 4 millones de sacos de café verde. Los estados productores en México son: Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla con el 84%, Guerrero, San Luis Potosí, Nayarit e Hidalgo con el 15% y Jalisco, Querétaro, Colima y Tabasco con el 1% (www.sagarpa.gob.mx). El café que se produce en México es de la especie *Coffea arabica*, que constituye el 97% de la producción nacional, representada por las variedades: Typica (criollo, nacional o arábica), Bourbon, Caturra, Mundo Novo, Garnica, Catuaí, Pluma Hidalgo y Maragogype y el 3% de la producción corresponde a la especie *Coffea canephora*, conocida como robusta (Produce Fundación Chiapas A.C., 2003).

Las condiciones ambientales que predominan en la mayor parte de las zonas cafetaleras en México permiten considerar alrededor de 530 mil ha con características óptimas, esto aunado al cultivo bajo sombra, confirma el potencial enorme para producir cafés de excelente calidad (www.sagarpa.gob.mx; Produce Fundación Chiapas A.C., 2003).

2.2. Composición química del café

Como se ha señalado previamente, la composición y concentración de los componentes del café es muy diversa, y se ha visto que está influenciada por la variedad de especie y el grado de tostado al que es sometido el grano.

Los compuestos más abundantes en los granos de café arábica y también robusta verdes son carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos clorogénicos entre otros (Bekedam y col. 2008), dichos compuestos se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Compuestos químicos del grano de Café verde.

Aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas (ac. glutámico, prolina, alanina, asparagina, ácido aspártico)
Polisacáridos
Azúcares
Triglicéridos
Diterpenos (cafestol y kahweol)
Ácidos volátiles (fórmico y acético)
Carbohidratos (sucrosa, arabinogalactanosa, galactomanosa y celulosa)
No volátiles (láctico, tartárico, pirúvico, cítrico)
Compuestos fenólicos (ácido clorogénico)
Sustancias volátiles (más de 800 identificadas, de las cuales 60-80 contribuyen al aroma del café)
Vitaminas y Minerales
Metilxantinas (La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), la teofilina y la teobromina)
Ácido caféico, quínico y cumárico

Gotteland., De Pablo, 2008.

Uno de los procesos determinantes de las propiedades químicas biológicas y organolépticas del café es el tostado, en donde el grano se somete a temperatura superior a 150°C, se presenta una pérdida de peso respecto al grano de café verde de 10% a 24% m/m (NMX-F-013-SCFI-2010). Es un paso esencial ya que en él se producen una serie de reacciones químicas en las cuales intervienen compuestos fenólicos, polisacáridos, aminoácidos y proteínas que dan lugar a la formación de las características del café como sabor, olor y color. El tostado modifica las concentraciones de sus componentes químicos observándose aumento o decremento de ácido clorogénico y sus derivados, carbohidratos y proteínas los cuales, se han relacionado en la formación de melanoidinas, un resumen de los compuestos identificados en el café verde y tostado se aprecia en la Tabla 2, en donde se identifican los componentes de *Coffea arabica*, siendo las melanoidinas las que representan un aumento total debido a la reacción de Maillard, ocasionando un

decremento en ácidos clorogénicos y aminoácidos al incorporarse en la formación de melanoidinas (Clifford, 2008).

Tabla 2. Composición de granos de café arabica verde y tostado.

Compuestos	Granos verdes %	Granos tostados %
Minerales	3.0-4.2	3.5-4.5
Cafeína	0.9-1.2	~1.0
Trigonelina	1.0-1.2	0.5-1.0
Lípidos	12.0-18.0	14.5-20.0
Ácidos Clorogénicos	5.5-8.0	1.2-2.3
Oligosacáridos	6.0-8.0	0.0-3.5
Polisacáridos	50.0-55.0	24.0-39.0
Aminoácidos	2.0	-
Proteínas	11.0-13.0	13.0-15.0
Melanoidinas	-	16.0-17.0

Valenzuela, 2010; CENICAFE, 1999

Durante el tostado, el peso del grano disminuye debido a dos estados de transformación, el primero es la evaporación que se da del 10-13% de agua libre, en un 80% del tiempo de tostado y el segundo es la pirólisis que da lugar a la formación de gases como dióxido de carbono y otros gases volátiles aumentando el tamaño y oscurecimiento del grano, seguido por la emisión de humo de aceites y sonidos crepitantes (Bekedam y col., 2008).

2.2.1 Compuestos fenólicos

El café es una fuente importante de compuestos fenólicos, los principales son los ácidos clorogénicos. Los ácidos clorogénicos (CGA) son una familia de esteres formados por ácido *trans*-cinámico y ácido quínico (Clifford M. N., 1999), en este grupo destacan los CGAs: caféico, ferúlico y *p*-cumárico (Farah y col. 2005). La cantidad de ácidos clorogénicos (figura 1) varían con el grado de maduración (Aerts y Bauman, 1994), la especie y otros factores asociados a la calidad del café, tal como

la altura y la presencia o ausencia de sombra (Humphrey y Macrae, 1987). Los granos verdes de café contienen ácido clorogénico alrededor de 5-7.5% (Clifford, 1985).

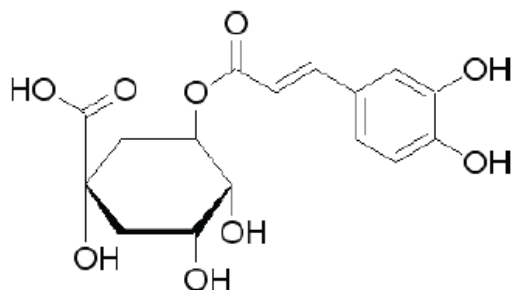


Figura 1. Estructura química de 5-ácido cafeoilquinico (ácido clorogénico).

Normalmente se denomina ácido clorogénico al que está presente en mayor cantidad (5-O-cafeoilquinico). Los ácidos feruloilquinicos, caféico y ferúlico son una importante fuente de fenoles dietarios (Gotteland y Santurino, 2007). Los granos de café verde contienen alrededor del 6 al 12% de CGA's, estos están presentes en una cantidad mucho mayor que en los granos de café tostado en los que encontramos a los ácidos hidroxicinámicos siendo los de mayor concentración: ácido caféico (CA), ácido ferúlico (FA), ácido p-cumarico (p-CoA) (figura 2) (Perrone y col. 2008). El interés en la identificación de CGA ha surgido por estudios que demuestran sus propiedades farmacológicas, antioxidantes y su capacidad para inhibir compuestos carcinogénicos (Farah y col. 2005).

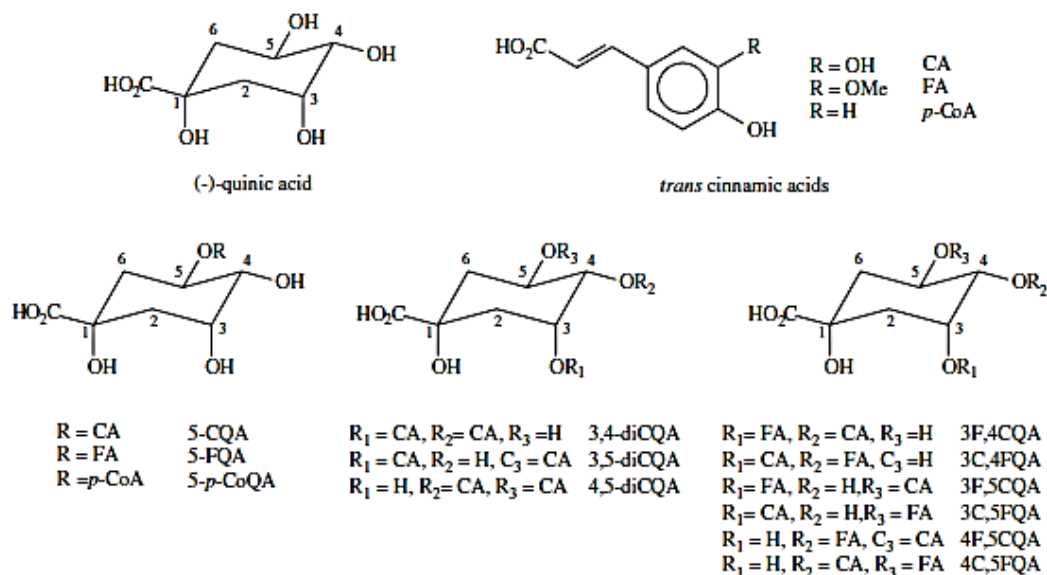


Figura 2. Estructuras de los tres ácidos hidroxicinámicos encontrados en el café de mayor concentración. Ácido caféico (CA). Ácido ferúlico (FA). Ácido *p*-cumarico (*p*-CoA).

2.2.2 Cafeína

La cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) (figura 3) es un alcaloide de purina que se encuentra naturalmente en los granos de café. Se ha visto que su concentración varía en extractos de café arábica, los cuales presentan una menor concentración de cafeína en comparación con café robusta (Budryn y col., 2009). El 75% del consumo de cafeína mundial es aportado por el café, la cual tiene poder antioxidante; ya que inhibe la lipoperoxidación inducida por radicales hidroxilos (-OH), peróxidos (ROO) y oxígeno, por lo cual es un antioxidante comparable al glutatión y superior al ácido ascórbico (Donangelo, 2011).

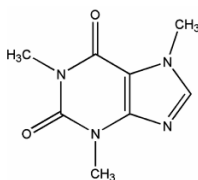


Figura 3. Estructura química de cafeína.

2.3. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es una reacción de oscurecimiento no enzimático (Billaud y col., 2003). Esta reacción cambia tanto las propiedades químicas como fisiológicas de las proteínas, siendo la principal responsable de la transformación de pigmentos de color marrón los cuales indican la reacción producida en alimentos que contienen compuestos carbonilo y aminos, tales como azúcares reductores y aminoácidos (Chichester y col., 1967).

La reacción de Maillard se origina a través de la condensación entre un grupo carbonilo de un azúcar reductor y un grupo amino de un aminoácido básico (fundamentalmente lisina), tras este proceso y en función del pH de la reacción, comienza a generarse una serie de productos intermedios, para finalmente a través de una polimerización entre ellos y con proteínas dan lugar a la formación de melanoidinas (Montero, 2003).

La reacción de Maillard se desarrolla en las siguientes condiciones (Barreiro y col., 2006):

- a. Temperatura: A medida que esta aumenta, la tasa de reacción aumenta.
- b. pH: La reacción ocurre en medio ácido o alcalino, siendo más favorecida por las reacciones alcalinas hasta llegar a un pH 10.
- c. Actividad de agua: Se ha encontrado que la reacción se favorece para contenidos intermedios de humedad, correspondientes a actividades de agua entre 0.60 y 0.70.
- d. Presencia de azúcares: Los azúcares reductores son esenciales para que la reacción pueda tener lugar, ya que ellos proveen los grupos carbonilo que inician la reacción siendo las pentosas y hexosas las que la favorecen.

2.3.1. Melanoidinas

Las melanoidinas son pigmentos de color marrón solubles en agua formados durante el proceso de torrefacción o tostado del café por diferentes mecanismos. Estos compuestos de alto peso molecular no volátiles contienen compuestos nitrogenados y son consideradas como macromoléculas responsables del color y aroma del café tostado. Se ha reportado que son componentes fisiológicamente activos, su estructura es extremadamente compleja y desconocida con exactitud, aunque se vincula su capacidad antioxidante a las premelanoidinas que son compuestos de bajo peso molecular unidos no covalentemente a ellas (Gniechwitz y col., 2008; Pino-García y col., 2012). Las proteínas, el arabinogalactano, y los CGAs están presentes en los HMWF del café, y existe una correlación con la concentración melanoidinas (Bekedam y col., 2008).

La concentración de melanoidinas se puede determinar mediante su absorción a longitudes de onda entre 405 nm - 420 nm. En estas longitudes de onda no hay otros componentes de los alimentos de origen natural conocidos para absorber la luz, y es por lo tanto que las melanoidinas se miden exclusivamente en estas longitudes de onda. Como resultado, la determinación de la absorción a 405 nm es básicamente un parámetro que describe la coloración café de un producto, aunque más conocimiento sobre la estructura de melanoidinas se ha revelado en los últimos años.

Durante el pardeamiento no enzimático se desarrollan factores adversos como la formación de uniones covalentes inter o intramoleculares en las melanoidinas disminuyendo la digestibilidad de las proteínas y las premelanoidinas al ser ingeridas tienen propiedades antinutricionales, inhibiendo enzimas digestivas, produciendo efectos adversos en hígado, riñón y otros órganos, teniendo también efectos adversos en el metabolismo. Posen efectos benéficos para la salud como evitar cáncer, hipertensión arterial enfermedades cardiovasculares entre otras debido a su

actividad antioxidante, también actúan como antimicrobianos contra microorganismos patógenos del colon (Lupano 2013).

2.4. Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (Radical libre) en un nivel energético superior.

Las ROS producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular. Actúan sobre los lípidos poli-insaturados de las membranas celulares, produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL); sobre los glúcidos, alterando las funciones celulares tales como las asociadas con la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores; sobre las proteínas provocando su inactivación y desnaturalización; sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis (Gonzales, 2001).

Por tal motivo el aporte de antioxidantes en la dieta diaria es importante en productos de origen vegetal, ya que han demostrado tener un efecto protector frente a gran número de enfermedades en las que está implicado el estrés oxidativo y el daño por radicales libres (Capel y col., 2010).

2.4.1. Determinación de la actividad antioxidante

La presencia de ácidos clorogénicos, cafeína y algunos productos de la reacción de Maillard, le confieren al café tostado, gran actividad antioxidante (Budryn y col., 2009). A pesar del beneficio de la presencia de estos compuestos, el proceso de tostado afecta marcadamente la composición de los granos de café lo que puede reducir la actividad antioxidante, debido a la degradación de los ácidos clorogénicos

y otros compuestos fenólicos; pero se ha encontrado que la actividad antioxidante del café tostado se puede mantener debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard, siendo directamente proporcional a la formación de melanoidinas, que compensan la disminución de los ácidos clorogénicos durante este proceso.

Los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad, muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador, tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno y fuentes de radicales libres (Antolovich y col, 2002; Li y col., 2003; Mosquera y col., 2015). La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico (ABTS), TEAC adaptación del radical ABTS $\cdot+$ producido por la reacción de ABTS y persulfato de potasio, el método por FRAP se lleva a cabo por una reducción del complejo TPTZ $-Fe_3+$ a un pH alcalino se monitorea midiendo el cambio de absorbancia a 593 nm en presencia de un agente reductor, el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se reduce en presencia de antioxidantes manifestándose un cambio de color en la solución (Molina, 2010; Pino, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, debido a sus propiedades organolépticas y a su capacidad de mantener a los individuos en estado de alerta. Una de las mayores aportaciones es su capacidad antioxidante la cual se atribuye a los compuestos fenólicos y a las melanoidinas. Las melanoidinas son producidas debido a los cambios que se inducen en el proceso de tostado del café, destaca el decremento de compuestos fenólicos, carbohidratos, proteínas y otros ácidos que participan en la formación de melanoidinas. Es por ello importante explorar los mecanismos que podrían dar cuenta de estas observaciones ya que no son completamente comprendidos pero se podrían relacionar con el perfil específico de antioxidantes del café y con su alta concentración en el grano verde, en particular de ácido clorogénico.

4. OBJETIVOS

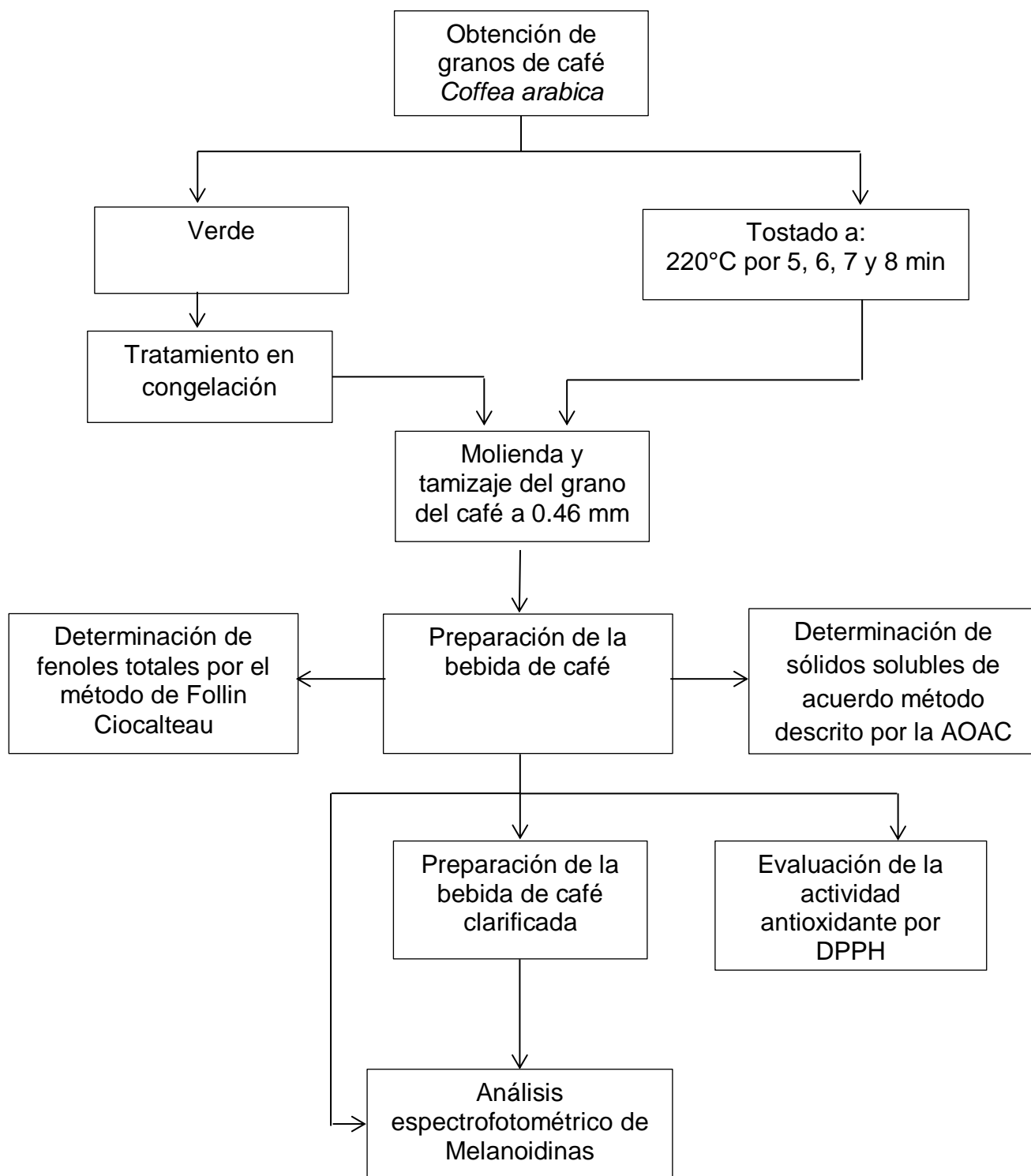
4.1. Objetivo general

Determinar la influencia del grado de tostado del café *Coffea arabica* en la incorporación de compuestos fenólicos en melanoidinas y su relación con la actividad antioxidante.

4.2. Objetivos particulares

- Obtener granos de café *Coffea arabica* con un tamaño de partícula de 0.46 mm, a partir de granos verdes y tostados a 220°C por 5, 6, 7 y 8 min.
- Cuantificar compuestos fenólicos por el método de Follin-Ciocalteau y sólidos solubles por el método de la AOAC Internacional en las bebidas de café.
- Clarificar y determinar la fracción de alto peso molecular (melanoidinas) de las bebidas de café por espectrofotometría.
- Evaluar de la actividad antioxidante de las bebidas de café por el método de captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material

Material de vidrio y reactivos de grado analítico necesarios para cada determinación. Los ensayos se realizaron en los laboratorios de Bromatología y Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

6.2. Sustancias químicas

Los reactivos utilizados fueron en grado analítico, estándares de: Na_2CO_3 , metanol, etanol, ácido clorogénico (Sigma-Aldrich), solución de Carrez's ($\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0.3 M) y $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (1.0 M)) (Sigma-Aldrich), radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich), ácido 6-hydroxy-2,5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich), reactivo de Follin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich). Sin ninguna purificación anterior.

6.3. Material biológico

Los granos de café verde y tostado a 220°C por 5, 6, 7 y 8 min de la variedad *Coffea arabica* fueron proporcionados por la Hacienda cafetalera de la Reserva Azul de Cuetzalan en Puebla, Pue.

6.4. Métodos

Los métodos se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados para cada determinación.

Determinación	Método	Referencia
Extracción de compuestos	Infusión	Farah y col., 2005 Perrone y col., 2012
Extracción de compuestos	Sonificación	Pérez y col., 2012
Fenoles totales Follin Ciocalteau	Espectrofotometría	Bekedam, 2008
Sólidos solubles	Gravimetría	Perrone y col., 2012 AOAC, 2005
Exclusión de compuestos de alto peso molecular	Clarificación	Perrone y col., 2012
Cuantificación de compuestos de alto peso molecular	Espectrofotometría	Perrone y col., 2012
Actividad antioxidante por DPPH	Espectrofotometría	Pérez y col., 2012 Monreal y col., 2012

7. METODOLOGÍA

7.1. Tratamiento de los granos de *Coffea arabica*

Obtener granos verdes y tostados a 220°C por 5, 6, 7 y 8 min. Calcular el peso perdido con la ecuación 1:

Ecuación 1.

$$\%WL = \frac{WBr - WAR}{WBr} \times 100$$

Dónde:

%WL.- porcentaje de peso perdido

WBr.- peso antes del tostado

WAR.- peso después del tostado

Se someten a molienda los granos verdes y tostados para obtener un tamaño de partícula de 0.46 mm; se realiza un tamizaje mediante un tamiz de prueba estándar para verificar la uniformidad del tamaño de la muestra (Perrone, 2008).

7.2. Preparación de la bebida de café y nano partículas de interés

Las bebidas de café se preparan al 10%, disolviendo 2 g de muestra en 20 ml de agua en ebullición por 2 min (Perrone, 2012). Posteriormente, se someten a sonicación por 30 min a temperatura ambiente (Pérez-Hernández, 2012). Se lleva a agitación en un vórtex durante 15 segundos. Finalmente se realiza una filtración con un tamaño de poro de 0.45 µm. La muestra se mantiene a 4 °C hasta su análisis.

7.3. Determinación de fenoles totales

A 1000 µL de cada una de las bebidas de café, se adicionan 500 µL del reactivo de Follin-Ciocalteau (homogenizar), se administra posteriormente 1000 µL

de solución saturada Na_2CO_3 y se realiza una filtración con agua desmineralizada aforando a 10 mL para después homogenizar y dejar reaccionar por 1 hora (Bekedam, 2008). A esta solución se determina la cantidad de fenoles totales. Se utiliza ácido clorogénico como estándar y el contenido de fenoles totales se expresa en mg de ácido clorogénico/g de peso de la muestra.

7.4. Determinación de sólidos solubles

El porcentaje de sólidos solubles se determina con la relación peso/volumen por gravimetría, tomando una alícuota de 2 mL de cada una de las bebidas de café las cuales se someten a un secado al horno a 105°C de acuerdo con la AOAC Internacional.

7.5. Preparación de la bebida de café clarificada

A 1 mL de cada una de las bebidas de café se les adiciona 50 ml de agua y 1 ml de las soluciones de Carrez's I y II ($\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.3 M y $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ 1.0 M), en seguida se homogeniza y afora a 100 ml hasta obtener una suspensión coloidal. Después de 15 min la suspensión coloidal se filtra con un tamaño de poro de 0.45 μm , para conseguir la fracción clarificada de la bebida de café (Perrone y col., 2012).

7.6. Cuantificación de compuestos de alto peso molecular (melanoidinas) por espectrofotometría y su evaluación de actividad antioxidante por el método de captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

El espectro de absorción de las soluciones se determina en un rango de 200-800 nm en celdas de cuarzo en un espectrofotómetro realizando el análisis espectroscópico de las bebidas de café al 10% y de la bebida clarificada con HMWF (melanoidinas). Cada solución se prepara justo antes de ser medida donde a 1 mg de muestra se disuelve en 10 mL de agua desmineralizada. Los rangos de absorción

de HMWF son a 280, 325 y 405 nm para asegurar linealidad. El coeficiente de extinción específica (K_{mix}) se calculó utilizando la ley de Lambert-Beer mediante la ecuación 2:

Ecuación 2.

$$A = \epsilon dc$$

Donde

A= Absorbancia

ϵ =Coeficiente molar de extinción

d= Distancia en cm.

c= Concentración molar

El uso del coeficiente de extinción específica (K) se prefiere en lugar del coeficiente de extinción molar debido a que el peso molecular de las melanoidinas es desconocido y variable probablemente. Aplicando K, el parámetro de concentración utilizado es expresado en la ley de Lambert-Beer como $L g^{-1} cm^{-1}$, el cual se adapta a las bebidas de café (Perrone y col., 2012; Bekedam, 2006).

En cuanto a la capacidad antioxidante para su evaluación se mezcla un volumen de 3.9 mL del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (0.025 mg/mL metanol) con 0.1 mL de cada una de las bebidas de café y de las soluciones clarificadas. La lectura se realiza después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, todas las muestras se mantienen en condiciones de oscuridad y agitación. La primera lectura ($Abs_{t=0}$) es a tiempo cero, midiéndose de nuevo a los 30 min ($Abs_{t=60}$) a 275 nm (Monreal y col., 2012) en celdas de cuarzo con un espectrofotómetro UV-VIS. El porcentaje de inhibición se expresa en función de la concentración de Trolox (Pérez y col., 2012) mediante la ecuación 3:

Ecuación 3:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(Abs_{t=0 \text{ min}} - Abs_{t=30 \text{ min}})}{(Abs_{t=0 \text{ min}} \times 100)}$$

Los resultados se expresan en μmol de Trolox/g de peso de muestra.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Muestras de granos *Coffea arabica* y tratamiento del grano de café verde

Los granos verdes y tostados a 220°C por 5, 6, 7 y 8 min como se muestra en la figura 4, fueron proporcionados por la Hacienda cafetalera de la Reserva Azul de Cuetzalan en Puebla, Pue.

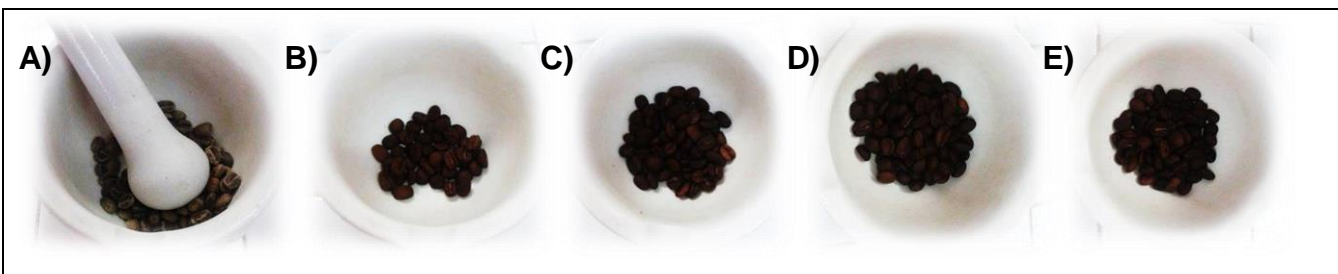


Figura 4. Granos de café verde y tostados tratados a diferentes tiempos. A) Grano verde., B) Grano tostado por 5 min. C) Grano de café tostado por 6 min. D) Grano de café tostado por 7 min. E) Grano de café tostado por 8 min.

El peso perdido durante el tostado de las muestras de *Coffea arabica* se determinó por la pérdida de humedad de los granos tostados a 220°C , los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 4, en donde se aprecia que a mayor tiempo de tostado, mayor pérdida de peso, de este modo, a los 5 min de tostado, se presentó una disminución de 10.34% con respecto al grano verde, esto se debe a la primera etapa de pirólisis, en la cual Bekedam (2008) reporta una evaporación del 10-13% de agua libre. En cambio, a los 8 min, la pérdida de peso es considerable (58.62% de peso perdido), esto se atribuye principalmente a la segunda etapa de pirólisis que se

desarrolla, en donde se presenta la formación de gases tales como dióxido de carbono y otros compuestos volátiles, hinchazón de los granos, un oscurecimiento rápido, seguido por la emisión de humo aceitoso y sonidos crepitantes (Budryn y col., 2009).

Tabla 4. Peso perdido durante el tostado de las muestras de *Coffea arabica*

Grados de tostado del granos de café (min)	Peso antes del tostado (grano verde) (g)	Peso después del tostado(g)	% de peso perdido
5	0.29	0.26	10.34
6	0.29	0.24	17.24
7	0.29	0.20	31.03
8	0.29	0.12	58.62

8.2. Disminución de tamaño del grano del café

El grano de café verde y tostado se sometieron a molienda mediante un mortero de porcelana, hasta obtener un tamaño de partícula de 0.46 mm. La disminución del tamaño de partícula del café es necesaria para una mejor obtención de los compuestos a estudiar para la evaluación antioxidante como: compuestos fenólicos (ácido clorogénico) y HMWF (melanoidinas).

En la molienda del café verde encontramos la dificultad de disminuir su tamaño de partícula por la dureza que presento, a pesar de haberlo llevado a congelación, a diferencia con el grano tostado ya que su porosidad hizo posible la fácil reducción de tamaño de partícula a 0.46 mm en el mortero de porcelana, debido a la pérdida de humedad. Ver figura 5.

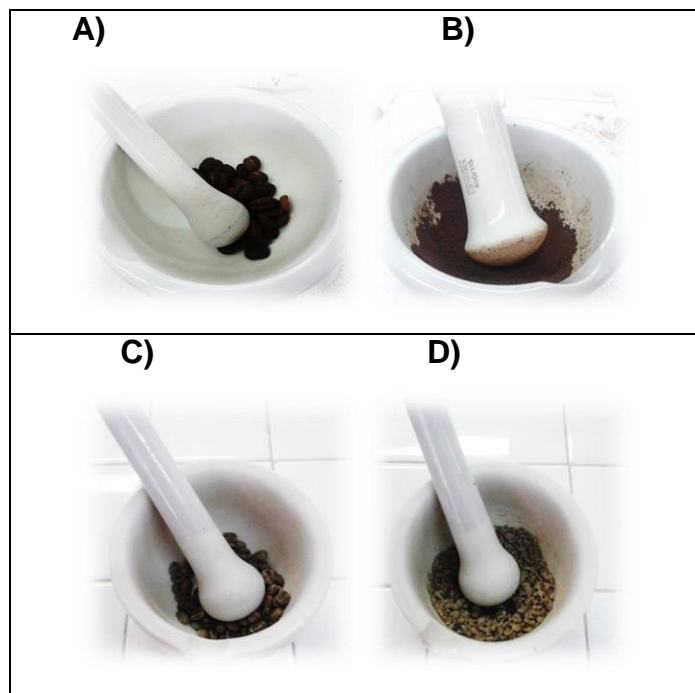


Figura 5. Tratamiento de disminución del tamaño de partícula realizado a las muestras. A) Granos de café tostado enteros. B) Café tostado pulverizado. C) Granos de café verde enteros. D) Grano verde pulverizado.

8.3. Preparación de la bebida de café y partículas de interés.

Tras obtener las partículas de tamaño deseado, se preparó la bebida de café, incorporando las muestras de café al agua en ebullición, en donde se notó la presencia de sólidos. Durante la preparación de la bebida sonicada (Sonicador, Branson 5510) se logró una mayor concentración y dispersión uniforme de compuestos, en comparación con las muestras no sonicadas, como se identificó en los espectros de absorción, ver figura 6. Adicionalmente, esta preparación fue de utilidad para realizar curvas de calibración, empleadas como referencia para la determinación de compuestos HMWF presentes en las preparaciones sometidas a los diferentes tiempos de tostado (Anexo 11.2.). Finalmente se llevó a agitación en un vórtex (Thermolyne Type 16700 Mixer) durante 15 seg y se filtró (tamaño de poro de 0.45 μm , Minisart), ver figura 7.

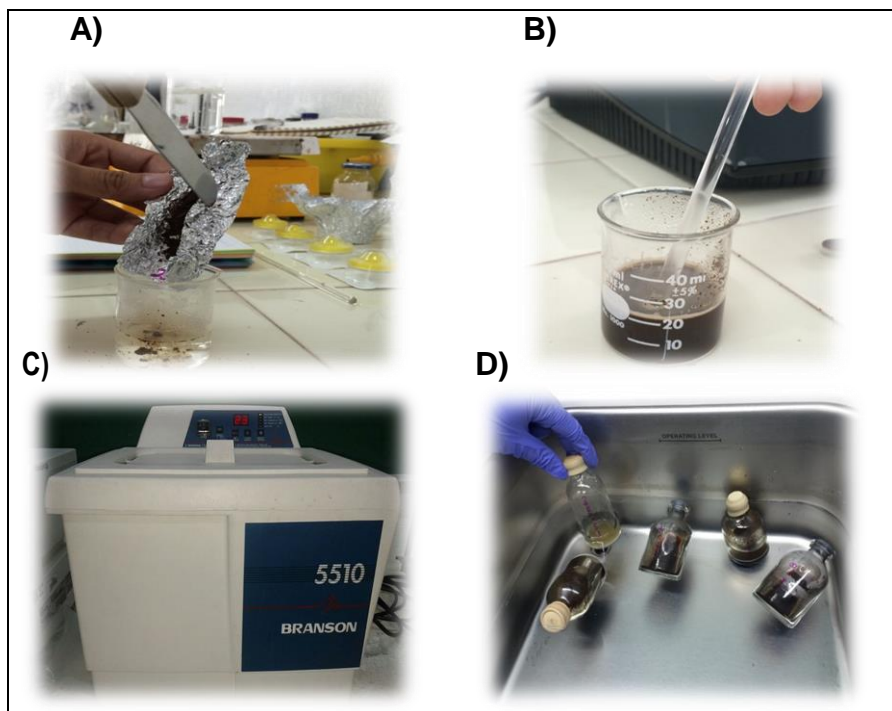


Figura 6. Procedimiento de preparación de muestras. A) Muestra de café adicionado al agua en ebullición. B) Mezcla de la bebida de café. C) Sonicador Brandon 5510. D) Bebidas de café para sonicar.

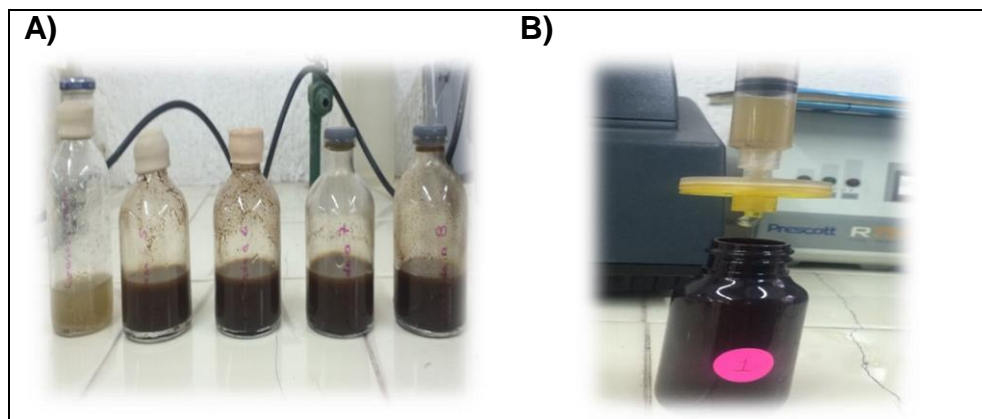


Figura 7. Bebidas de café llevadas a sonicación. A) Bebidas de café sonicadas y llevadas a vórtex. B) Filtración de la bebida de café.

8.4. Determinación de fenoles totales

A la solución obtenida anteriormente se corrió un espectro de absorción de 200 a 800 nm en celdas de cuarzo para leer las absorbancias arrojadas en un espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000), ver figura 8.

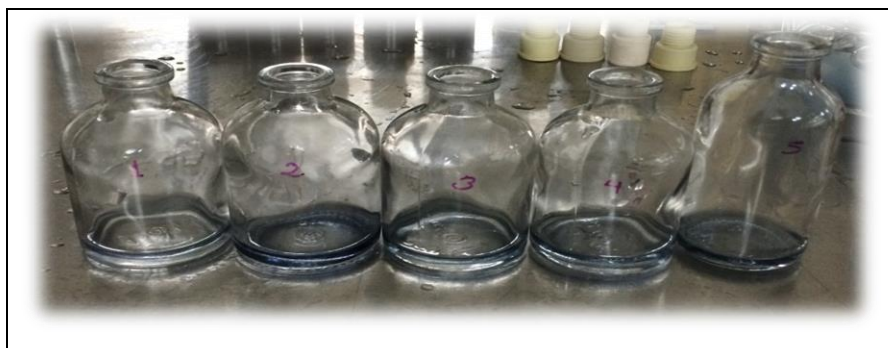


Figura 8. Reacción de fenoles totales presentes en las muestras de café con los agentes oxidantes del reactivo de Follin-Ciocalteu.

La concentración de compuestos fenólicos de las fracciones de café se muestra en la Tabla 5. Se encontró que el café verde y el café con un tiempo de tostado de 5 min eran ricos en grupos fenólicos (61 y 52 mg de ácido clorogénico respectivamente) en comparación con los resultados obtenidos a los tiempos 6, 7 y 8 min (46, 35 y 35 correspondientemente), ver figura 12. Esto se esperaba ya que el ácido clorogénico, es el compuesto fenólico más abundante "nativo" en los granos de café, por lo que a mayor tiempo de tostado disminuye la concentración de ácido clorogénico probablemente por su incorporación a compuestos de HMWF (melanoidinas). Sin embargo cabe señalar que el CGA es un compuesto representativo de los compuestos fenólicos presentes en el grano de café, con importante actividad antioxidante, por lo que se emplea como referencia en la determinación de fenoles totales del café.

Tabla 5. Absorbancias de compuestos fenólicos de las fracciones de café mediante espectrofotometría UV-VIS.

Tiempo (min)	Abs a 325 nm	mg de ácido clorogénico/g
Verde	0.419	61
5	0.367	52
6	0.332	46
7	0.266	35
8	0.265	35

Estudios realizados por Bekedam (2008), mencionan que el contenido de CGA en el café puede ser tan alto como 8% de los compuestos presentes en los granos verdes. En el caso de los granos tostados de café *Coffea arábica* el contenido CGA disminuye continuamente como consecuencia a la incorporación a la HMWF (melanoidinas) a través de la migración de acilo, hidrólisis, oxidación, fragmentación, polimerización y la asociación con proteínas.

8.5. Determinación de sólidos solubles

En la tabla 6 se muestran los resultados de la determinación de sólidos solubles, los valores obtenidos se incrementaron en las diferentes bebidas de café no clarificadas, siendo de 0.049 a 0.058 esto se atribuye a la presencia de cafeína, proteínas entre otros compuestos liberados favorablemente a los tiempos de tostado de 6 y 7 min. Estos resultados están relacionados con reportes publicados por Petraco (2005), quien encontró que a mayor grado de tostado hay mayor obtención de sólidos solubles, sin embargo nuestros resultados muestran que al min 8, disminuyen los sólidos solubles, probablemente esto se deba al tipo de café, y la temperatura de 220° C a la que se sometió el grano durante el tostado, entre otros factores relacionados con la resolubilización de celulosa, carbohidratos y desnaturalización de las proteínas, los cuales pueden influir en la calidad del café.

Tabla 6. Sólidos solubles en el café.

Granos	Peso antes del secado (g)	Sólidos Solubles (g)
Verdes	2.702	0.049
5	2.711	0.049
6	2.702	0.058
7	2.711	0.058
8	2.708	0.055

8.6. Análisis espectrofotométrico de Melanoidinas y su evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH

Se determinó la presencia de melanoidinas a las bebidas de café clarificadas en celdas de cuarzo en un espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000), debido a que estas preparaciones presentaban menor interferencia al momento de su determinación, en comparación con las bebidas no clarificadas, ver figura 9.

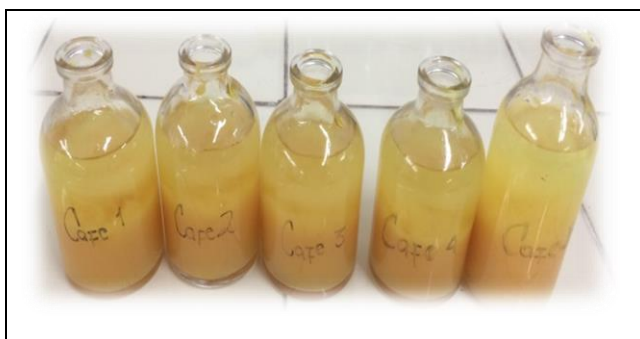


Figura 9. Bebidas de café clarificadas con las soluciones de Carrez's I y II

Los resultados mostraron que hubo una mayor concentración de melanoidinas en las muestras correspondientes a los tiempos 7 y 8 min (2.80 y $3.14 \text{ Lg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en comparación con las muestras de menor tiempo de tostado (5 y 6 min), ver figura 10. Estos resultados demuestran que a mayor tiempo de tostado, mayor concentración de melanoidinas, esto se puede explicar por qué a mayor tiempo de tostado es

posible la formación de nuevos compuestos por la incorporación de CGA's en las HMWF del café como se demostró previamente. Se ha reportado que los CGA's disminuyen por su incorporación a melanoidinas, de acuerdo con Bekedam (2008) la incorporación de CGA's en la estructura de melanoidinas ocurre a través de la fracción de los ácidos fenólicos por enlaces éster al someter a tostado a los granos de café.

Cabe señalar que esta determinación se realizó considerando una curva de calibración como blanco a partir de la bebida de café sin clarificar midiendo además de melanoidinas otros compuestos como azúcares, siendo también importante mencionar que se midieron los valores de absorción de las muestras a 280 nm ya que muchos componentes del café verde se leen a esta longitud de onda como: cafeína, CGA, aminoácidos aromáticos, entre otros, así mismo se midieron a 325 nm ya que los CGA's también puede detectarse a esta longitud de onda y finalmente a 420 nm para supervisar la formación de compuestos de alto peso molecular como producto de la reacción de Maillard. Debido a la conjugación de las melanoidinas con los CGAs se consideró su lectura en estas tres longitudes de onda, ver figura 12. Se requirió realizar diluciones a las muestras para asegurar que las absorbancias de las 3 longitudes de onda se encontraran entre 0.1 y 1.0.

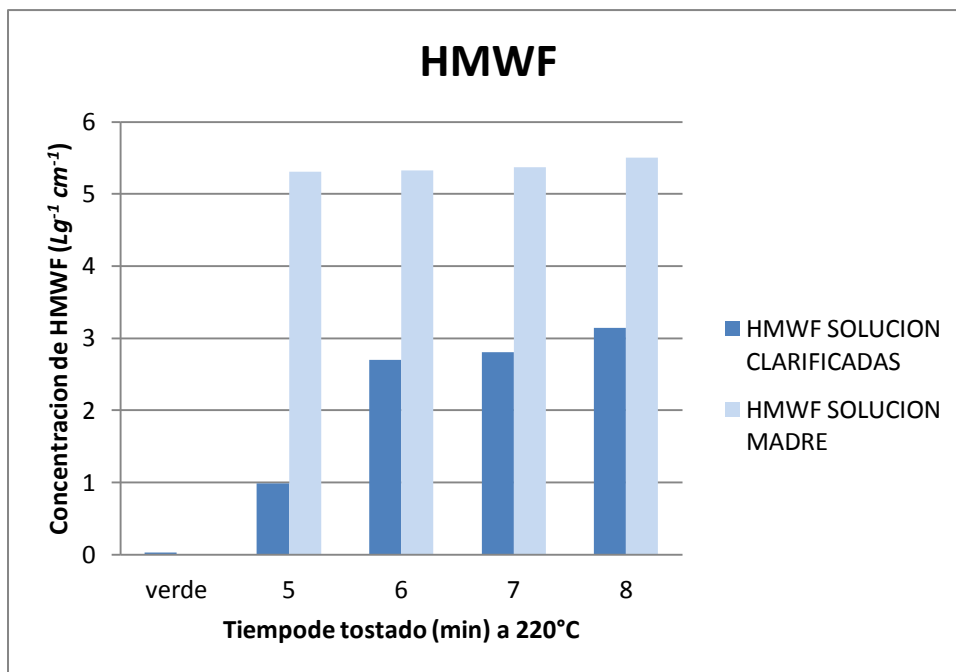


Figura 10. Concentración de HMWF de las bebidas de café y a las bebidas de café clarificadas.

Para la evaluación de la actividad antioxidante de las melanoidinas se utilizó el método de captación del radical DPPH ver figura 11, utilizando como estándar Trolox, el cual demostró que la contribución de CGA`S a las propiedades antioxidantes del café aumenta a menor grado de tostado. A la pérdida de CGA, se denota la formación de nuevos compuestos durante el proceso de tostado. Ver figura 13.

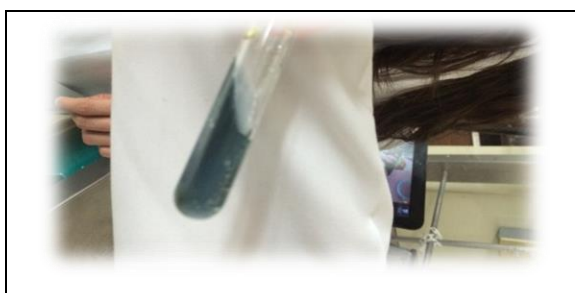


Figura 11. Reacción del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo con la bebida de café

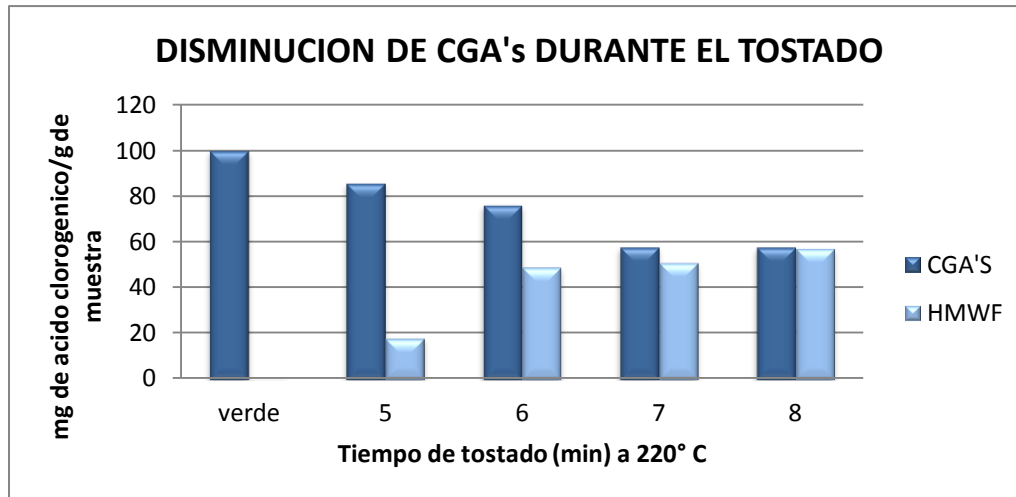


Figura 12. Presencia de CGA`S en los diferentes tiempos de tostado.

Se demostró como la actividad antioxidante aumenta con el grado de tostado con la formación de nuevos compuestos durante el proceso por lo que la disminución de CGA's no influye en gran proporción la actividad antioxidante, ver figura 13. Bekedam (2008) afirma que la pérdida de CGA's no presenta una disminución en la capacidad antioxidante demostrándose en este trabajo lo mencionado por el autor. Como se ha reportado por otros autores como Clifford (1985), Hoffman (1998), Farah (2005) entre otros, los compuestos con propiedades antioxidantes (CGA's) se pueden perder o transformar durante el proceso de tostado, la actividad de eliminación de radicales se puede mantener o incluso reforzar por la formación de nuevos productos que poseen esta misma característica principalmente los productos de Maillard.

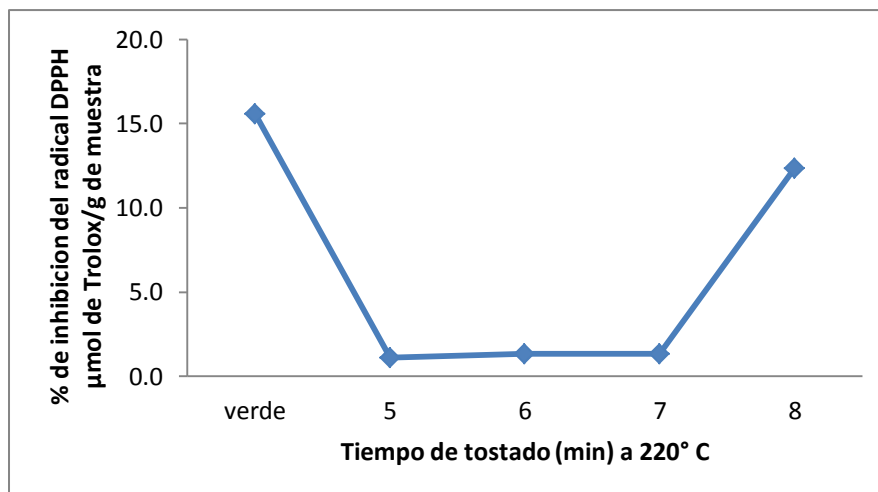


Figura 13. Actividad antioxidante durante el proceso de tostado.

En este trabajo destacó que la bebida de café clarificada obtenida de granos tostados a los 8 min presento una mayor cantidad de HMWF ($3.14 \text{ Lg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y actividad antioxidante ($10.4 \mu\text{mol de trolox/ g}$) por lo que para estos granos, el tiempo de tostado a los 8 min podría ser el adecuado para obtener los beneficios de las melanoidinas y por tanto, sus características benéficas a la salud por su actividad antioxidante. También se mostró que el tratamiento de tostado para estas muestras (8 min) provoco gran pérdida de CGA's con un valor de 42.18 %, lo que se relaciona con el incremento en la concentración de melanoidinas, pues es posible que los compuestos hidroxicinámicos se incorporen a la formación de las melanoidinas. Ver tabla 7.

Tabla 7. Comparación de compuestos en las bebidas de café clarificadas.

Bebida de café clarificada	HMWF ($\text{Lg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Activ. Antiox. DPPH ($\mu\text{mol de Trolox/ g}$)	Disminución de CGA en el tostado (%)
Verde	-	13.6	-
5'	0.990	4.6	14.33
6'	2.697	6.1	23.82
7'	2.808	6.9	42
8'	3.140	10.4	42.18

9. CONCLUSIONES

- ❖ El grano verde del café (*Coffea arabica*) presenta una concentración mayor de ácido clorogénico (61 mg de ácido clorogénico/g de muestra), la cual disminuye a mayor tiempo de tostado, siendo que en las muestras de 5 a 8 min de tostado a 220°C se presenta un decremento del 14.33% a 42.18%.
- ❖ La concentración de sólidos solubles fue mayor a los 6 y 7 min de tostado, por lo que estos tiempos serían favorables para liberar productos como carbohidratos, cafeína, proteínas entre otros que influyen en la calidad del café *Coffea arabica*.
- ❖ Se obtuvo una mayor concentración de melanoidinas (HMWF) en los tiempos de tostados más prolongados, que fueron a los 7 y 8 min, estos resultados estuvieron relacionados con la disminución de CGA's a mayor tiempo de tostado, lo cual puede atribuirse a su incorporación a la producción de melanoidinas.
- ❖ La capacidad antioxidante de las muestras de café analizadas mediante el método de DPPH, mostró que fue mayor en el grano de café verde (13.6 Lg-1 cm-1) y disminuyó en las muestras sometidas al primer tiempo de tostado (4.6 Lg-1 cm-1) sin embargo se observa un aumento conforme el tiempo de tostado, a los 8 min se incrementa (10.4 Lg-1 cm-1), aunque no en la misma magnitud que a la que se encuentra en el grano verde, esto se relacionó con la formación de melanoidinas.

10. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar la determinación de actividad antioxidante en una temperatura diferente a 220°C.
- ❖ Determinar la concentración de melanoidinas entre las especies *Coffea arabica* y *Coffea robusta*.
- ❖ Identificar estructuras de los ácidos cinámicos de mayor concentración del Café que son : ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico por HPLC.
- ❖ Hacer análisis comparativo de actividad antioxidante entre café de grano y café soluble.
- ❖ Cuantificar los ácidos cinámicos presentes en la cereza de café *Coffea arabica*.
- ❖ Identificar los ácidos cinámicos que interactúan mayoritariamente en la formación de melanoidinas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, K., Shankaranarayana, M. 1987. Volatile flavour compounds in coffee. *Indian Coffee* 51: (6-7): 8-19 p.
- Aerts, R.J., Baumann T.W. 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in coffee seedlings. *Journal of Experimental Botany* 45 (273): 497-503 p.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry* 127:183-198 p.
- Barreiro, J., Sandoval, A. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas 35 p.
- Bekedam E. 2008. Coffee brew melanoidins structural and functional properties of brown-colored coffee compounds. 168 p.
- Bekedam K., Schools H., Van Boekel M., Smith G. 2006. High molecular weight melanoidins from coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7658-7666 p.
- Belitz H., Grosch W. 1999. *Food Chemistry*. Springer- Verlag, Berlin.
- Billaud C., Louis A. 2003. Maillard. 1878-1936. *Food Rev. Intern.*, 19, 345-347 p.
- Budryn G., Nebesny E., Podsddek A., Oyrelwicz D., Materska M., Jankowski S., Janda B., 2009. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and maillard reaction products in coffee beans. *Eur Food Res Technol* 228: 913–922 p.
- Capel, Wichman. F., Fernández F., Lizárraga D., Pérez L., Riobo S. 2010. *Café y estilo de vida saludable, centro de información café y salud (cicas)*, M-41351-2010.
- Chichester C. 1967. Kinetic behavior of the inhibition in the reaction between d-glucose and glycine. *Journal Food Science* 32:98 p.
- Clifford M. N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric* 79:362-372 p.
- Clifford. M. N. 1985. Chlorogenic acids. In *Coffee Volume 1: Chemistry*; Clarke, R. J.; Macrea, R., Eds.; Elsevier Applied Science Ltd.: London, UK 153-202 p.

- Donangelo C.M. 2011. Propiedades funcionales y biodisponibilidad de componentes bioactivos del café. Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de la República.
- Farah A., De Paulis T., Trugo L.C. Martin P. R. 2005. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J. Agric. Food Chem* 53, 1505 – 1513 p.
- Fundación produce Chiapas A.C., Instituto Tecnológico y de estudios superiores en Monterrey 2003. Programa estratégico de necesidades de investigación y trasferencia de tecnología del estado de Chiapas, Cadena agroalimentaria del café.
- Gniechwitz D., Reichardt, N., Ralph, J., Blaut, M., Steinhart, H., Bunzel, M. 2008. Isolation and characterization of a coffee melanoidin fraction. *J. Sci. Food Agric* 88, 2153-2160 p.
- Gotteland M., de Pablo, S. 2007. Some trues concerning coffee. Laboratorio de Microbiología y Probióticos.
- Gotteland, de Pablo S. 2008. Café y salud, instituto de nutrición y tecnología de los alimentos (inta), Universidad de Chile.
- Gotteland, de Pablo S. 2008. Laboratorio de Microbiología y Probióticos, Laboratorio de Microminerales, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.
- Gutiérrez A. 2002. Café, antioxidantes y protección a la salud. *Medisan* 6(4):72-81 p.
- Halvorsen B.L., Carlsen M. H., Philips K. M., Bohn S. K., Holte K., Jacob D. R., Blomhoff R. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *A Journal Clinical Nutrition* 84:95-135.
- Heyns K., Hauber R. 1970. Determination of structure of specific C-14 labeled brown polymerisates of sorbose by thermal fragmentations. *Justus Liebigs Ann. Chem* 733, 159-169 p.
- Hofmann. 1998. T. Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde - chemical characterisation of a red coloured domaine. *Eur. Food Res. Technol* 206 251-258 p.

- Humphrey C. J., Macrae R. 1987. Determination of chlorogenic acid in instant coffee using derivative spectrophotometry and its application to the characterization of instant coffee/ chicory mixtures. Colloque Scientifique International Sur Le Café 179-186 p.
- Illy A., Viani R. 2005. Espresso coffee: the science of quality. Elsevier Academia Press
- James J. 2004. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. Psychosom 66:63–71 p.
- Jiménez A., Sánchez M., Martínez M. 2012. Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. An. Vet. 28:67-78 P.
- Li, C., Yue, W., Y Cheng, C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of ethanol extract of propolis collected in taiwan. Journal of Food and Drugs Analysis 11(4): 277-282 p.
- Lupano C.E. 2013. Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento. Universidad nacional de la plata. Primera edición, 2013 ISBN 978-950-34-1028-8 p.
- Molina Q.D.M.A., Medina J.L.A., González A.G.A., Robles S.R.M., Gámez M.N. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cascara de uva (*vitis vinifera l.*) de mesa cultivada en el noroeste de México. CyTA – Journal of Food Vol. 8, No. 1, 57–63 p.
- Montero C. 2003. Alimentación y vida saludable: ¿Somos lo que comemos?. 145 p.
- Mullen W., Nemzer B., Stalmach B. Ou. A., Hunter J., Clifford M. N., Combet E. 2011. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. Journal of Agricultural and food Chemistry. Centre for Nutrition and Food Safety, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, GU2 7XH, United Kingdom.
- NMX-F-013-SCFI-2010. Café puro tostado, en gran o molido, sin descafeinar o descafeinado-especificaciones y métodos de prueba.

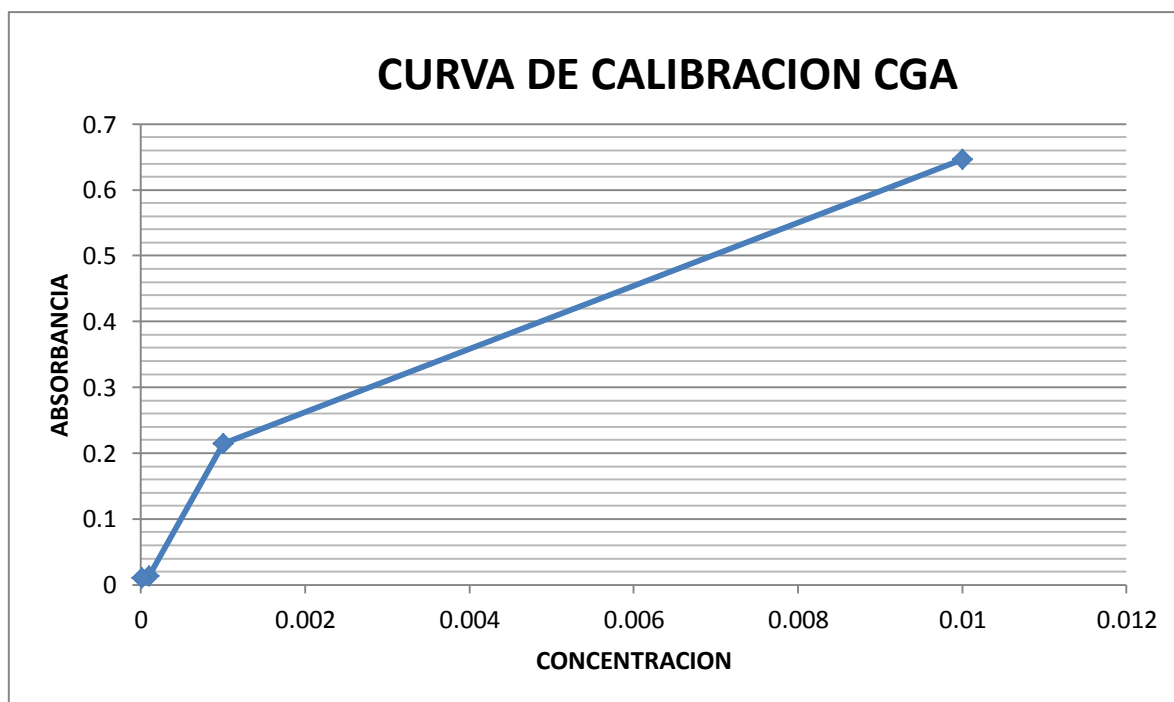
- Ojijo N. 1993. Some common aroma notes of coffee and their chemical origins or associated substances: a review. *Kenya Coffee* 58(685): 1659-1663 p.
- Parliment T. H., Ho C. T., Schieberle P. 2000. An overview of coffee roasting. In *caffeinated beverages: health benefits, physiological effects and chemistry*. Eds.: ACS Symposium Series 754. American Chemical Society: Washington, DC 188-201 p.
- Pérez L., Chávez k., Medina L., Gámez N., 2012. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *coffea arabica* and *coffea canephora*. *J. Mex. Chem* 56(4), 430-435 p.
- Petraco, M. 2005. Espresso coffee. *The Science of Quality*. 2nd edition. Elsevier Academic Press. Rome, Italy 215-229 p.
- Pino R., González M.L., Rivero M.D, Muñiz P. 2012. Influence of the degree of roasting on the antioxidant capacity and genoprotective effect of instant coffee: contribution of the melanoidin fraction. *Journal Agriculture Food Chemistry* 60, 10530–10539 p.
- Puerta G. 1999. Influencia del proceso de beneficio en la calidad del café. *Cenicafé* 50(1):78-88 p.
- Spiller M. 1998. The chemical components of coffee. *caffeine* 97–161 p.
- Spiller M. 1998. The chemical components of coffee. Gene A. Spiller, ed. *Caffein*. CRC Press 103 – 167 p.
- Veira, L.; R. Fonseca e A. Guimaraes. 2005. Parámetros bromatológicos de graos cruz e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). *Cinec. Tecnol. Aliment* 25 (2): 239-243 p.
- www.anacafe.org. Autor: Francisco A. D’Onofrio Radio Nederland. El café, ¿un nuevo amigo de la salud? Consultado el 06/09/14.
- www.anacafe.com. *Crónica.com.mx*, Martes 24 de abril de 2012. Por Bertha Sola. ¿Se te antoja un cafecito? Consultado el 06/09/14.
- www.cafesca.com. El café de México y Chiapas. Consultado el 06/09/14.
- www.cenicafe.org. Marin C., Puerta G. 2008. Contenido de ácidos clorogénicos en granos de *coffea arábica* y *coffea canephora*, según el desarrollo del fruto. *cenicafe* 59(1):7-28 p.

12. ANEXOS

Para cada determinación de las muestras de café se realizó una curva de calibración con su estándar correspondiente. Se realizaron diluciones hasta obtener una absorbancia entre 0.1 y 1 para tener linealidad en los resultados.

12.1. Fenoles totales

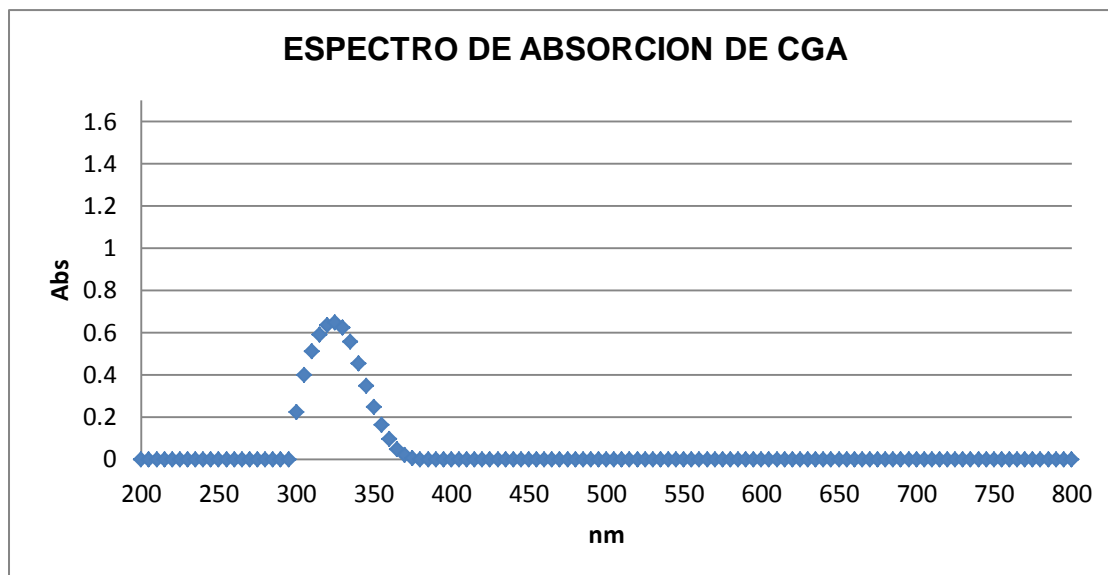
Para fenoles totales se utilizó ácido clorogénico como estándar debido a que en la composición del grano de café este es el que se encuentra en mayor concentración.



[]	A
0.01	0.646
0.001	0.215
0.0001	0.013

$$y = 60.171x + 0.0539$$

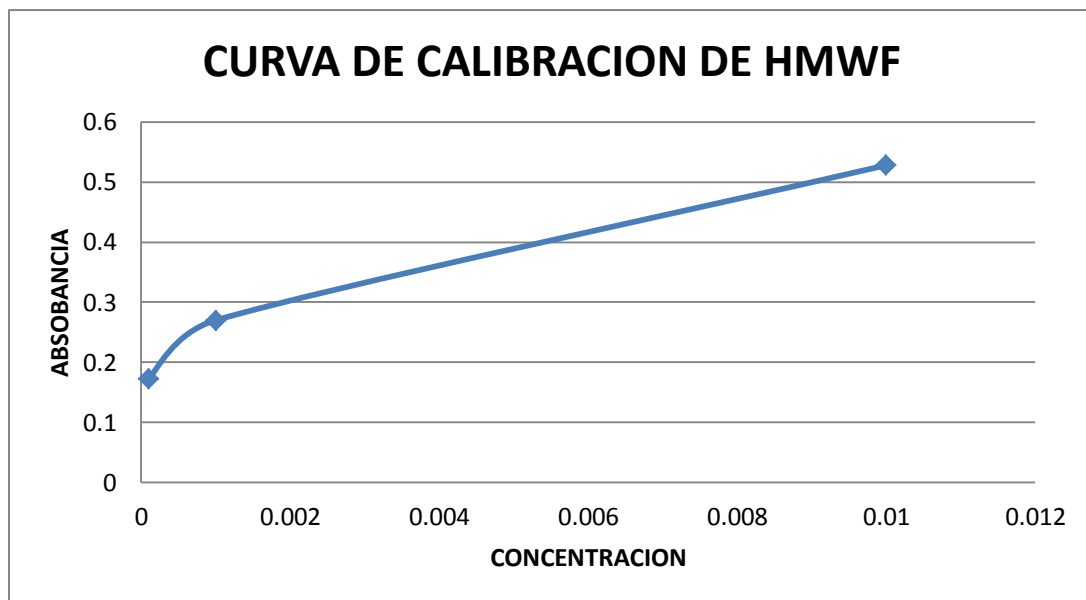
$$R^2 = 0.9461$$



Al realizar la curva de calibración se observó una mayor absorbancia a 325 nm por lo cual se decidió tomar esa longitud de onda para hacer las determinaciones de las muestras de café.

12.2. HMWF

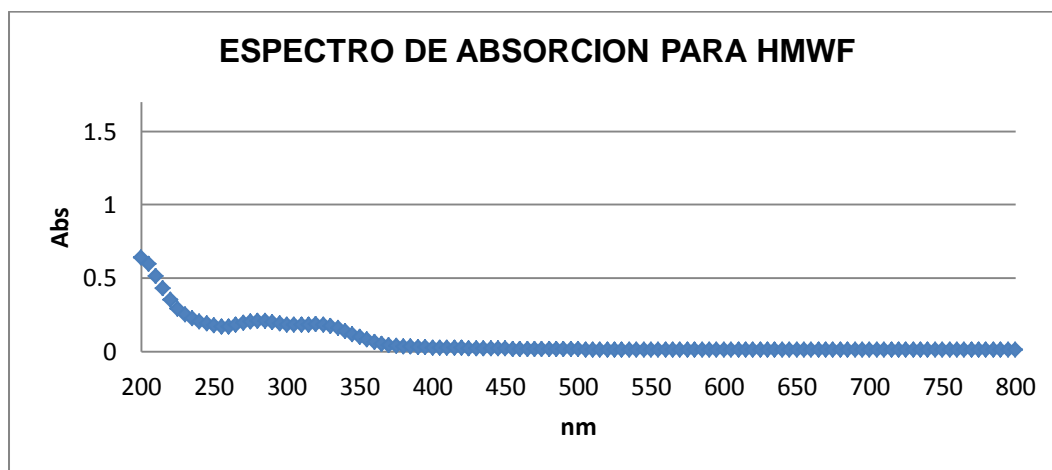
Para la determinación de la fracción de alto peso molecular se utilizó la bebida de café como tal de cada grano, ya que no se cuenta con un estándar para las melanoidinas.



[]	A
0.01	0.528
0.001	0.27
0.0001	0.173

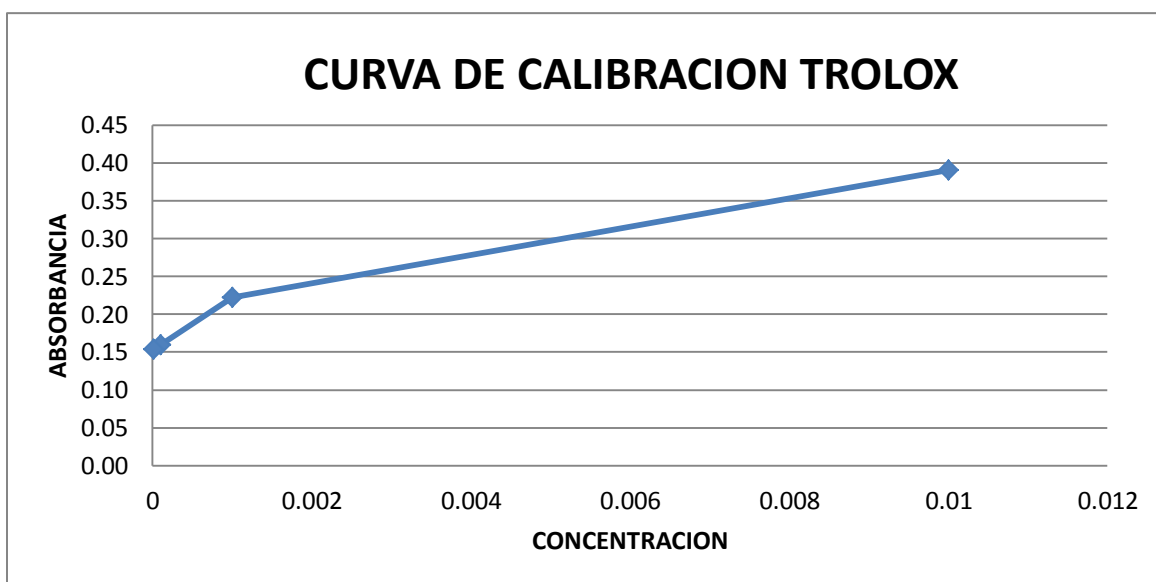
$$y = 32.943x + 0.2018$$

$$R^2 = 0.9661$$



12.3. Actividad antioxidante

Para esta determinación se utilizó Trolox como estándar. Este es un análogo de la vitamina E por tal motivo se utiliza como estándar para determinar la capacidad antioxidante.



[]	A
0.001	0.222
0.0001	0.160
0.00001	0.154

$$y = 22.448x + 0.1694$$
$$R^2 = 0.9646$$

