



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS**



***“CARACTERIZACIÓN DE UN PIGMENTO BIOACTIVO OBTENIDO A PARTIR DE
RESIDUOS DE CAFÉ Y EVALUACIÓN DE SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS
ALIMENTICIOS”***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

LIZBETH CAMPOS REYES

ASESOR

DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

COASESOR

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO 2018.

*A las personas que amo y más importantes de mi vida,
Mis padres, Ma. Emperatriz Reyes Galván y Valentin Campos López
Y a mi hermano Edgard.*

Agradecimientos

En primer lugar mi agradecimiento a la Dra. Ma. Del Carmen Hernández Jaimes, por darme la confianza para ser parte de su equipo de trabajo, que además de ser un excelente investigador es una extraordinaria persona. Gracias por su disponibilidad, paciencia, compromiso, consejos, entrega, por compartir sus valiosos conocimientos y guiarme para concluir este proyecto.

Al Dr. Juan Orozco Villafuerte por su apoyo, consejos, aportar ideas valiosas para la investigación, también agradecer por permitirme trabajar en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química.

A la Dra. Leticia Buendía González le agradezco enormemente por permitirme trabajar en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias y por sus observaciones para el proyecto.

A mis papás, por su cariño, apoyo incondicional, consejos, por alentarme en todos los momentos, por su esfuerzo y sacrificios, sin ustedes no hubiera llevado a término este sueño con los mismos resultados, los amo.

A mi hermano que en todo momento me ha brindado su apoyo, por sus valiosos consejos, porque en las circunstancias más difíciles me llena de fortaleza y confianza, te amo.

A mis amigos por su constante apoyo, sus consejos, soy muy afortunada de tenerlos. Especialmente a Fany por estar conmigo en todo momento, por ser compañera, confidente, contagiarme de alegría, por toda tu paciencia, las aventuras que nunca olvidaré y lo más valioso e importante tu amistad incondicional, te quiero.

Finalmente agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química, quienes me brindaron su ayuda desinteresada y sin lugar a dudas ofrecieron un buen ambiente de trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. COLORANTES.....	6
1.1.1. Clasificación de colorantes.....	6
1.1.2. Colorantes naturales.....	7
1.1.2.1. Carotenoides.....	9
1.1.2.2. Clorofilas.....	9
1.1.2.3. Betalaínas	9
1.1.2.4. Hemopigmentos	10
1.1.2.5. Pigmentos fenólicos.....	10
1.1.2.5.1. Flavonoides.....	10
1.1.2.5.2. Antocianinas	11
1.1.2.5.3. Taninos.....	11
1.2. GENERALIDADES DEL CAFÉ	12
1.2.1. Origen	14
1.2.2. Taxonomía.....	14
1.2.3. Características botánicas.....	15
1.3. FRUTO DE CAFÉ.....	16
1.3.1. Composición química de los granos de café.....	17
1.3.2. Sustancias bioactivas.....	20
1.3.3. Ácidos clorogénicos.....	22
1.3.3.1. Ruta metabólica para la síntesis de los ácidos clorogénicos.....	25
1.4. SUBPRODUCTOS DE CAFÉ.....	27
1.4.1. Usos de borra de café.....	28
1.5. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	29
1.5.1. Extracción hidrotérmica	29
1.5.2. Extracción ultrasónica.....	30
1.6. ANTIOXIDANTES.....	30
1.6.1. Clasificación de los antioxidantes	31

1.6.2.	Actividad antioxidante.....	32
1.6.3.	Cuantificación de la actividad antioxidante	33
1.6.3.1.	Método DPPH	34
1.6.3.2.	Método ABTS	35
1.6.4.	Cuantificación de Fenoles Totales.....	36
1.6.5.	Medición del color.....	37
1.6.6.	Cromatografía de capa fina.....	37
1.7.	APLICACIÓN DE COLORANTES NATURALES EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS.....	38
1.7.1.	Yogurt	39
1.7.2.	Leche saborizada	40
	CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	41
2.1.	Objetivo General	42
2.2.	Objetivos Específicos	42
	CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS	43
3.1.	Hipótesis.....	44
	CAPÍTULO 4 JUSTIFICACIÓN	45
4.1.	Justificación.....	46
	CAPÍTULO 5 MATERIALES	48
5.1.	Materiales	49
5.2.	Material Biológico	49
	CAPÍTULO 6 METODOLOGÍA.....	50
6.1.	Preparación de los residuos de café	51
6.2.	Obtención de los extractos	51
6.3.	Barrido espectrofotométrico de los extractos	53
6.4.	Cromatografía en capa fina de los extractos	53
6.5.	Determinación de Fenoles Totales	53
6.6.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH	54
6.7.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS	54
6.8.	Determinación del color del extracto por colorimetría.....	54
6.9.	Elaboración de yogurt usando el pigmento bioactivo obtenido.....	55
6.9.1.	Medición de pH.....	56
6.9.2.	Determinación de color	56
6.9.3.	Prueba hedónica de yogurt con el pigmento bioactivo.....	57
6.10.	Preparación de leche adicionada con el pigmento	58

6.10.1. Medición de pH.....	58
6.10.2. Determinación de color	58
6.10.3. Prueba hedónica de leche saborizada.....	58
6.11. Análisis estadístico	59
CAPÍTULO 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
7.1. Barrido espectrofotométrico de los extractos	61
7.2. Cromatografía en capa fina de los extractos	63
7.3. Determinación de Fenoles Totales	66
7.4. Capacidad antioxidante	67
7.4.1. Capacidad antioxidante por el método DPPH	67
7.4.2. Capacidad antioxidante por el método de ABTS	67
7.5. Determinación del color del extracto por colorimetría.....	68
7.6. Comparación de rendimiento del pigmento.....	70
7.7. Comparación de los resultados de pruebas fitoquímicas de residuos de café y café sin usar 71	
7.8. Evaluación del poder tintóreo del pigmento y determinación del color en yogurt por colorimetría.....	72
7.8.1. Medición de pH en yogurt.....	73
7.8.2. Análisis sensorial de yogurt.....	74
7.9. Preparación de leche adicionando pigmento obtenido.....	76
7.9.1. Determinación del color en leche saborizada por colorimetría	76
7.9.2. Medición de pH en leche adicionada con el pigmento	77
7.9.3. Prueba hedónica de leche adicionada con el pigmento y comparación con leche de café comercial	78
CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES	80
8.1. Conclusiones.....	81
CAPÍTULO 9 RECOMENDACIONES.....	82
9.1. Recomendaciones	83
CAPÍTULO 10 REFERENCIAS	84
CAPÍTULO 11 ANEXOS	102
Anexo No. 1 Reveladores para cromatografía en capa fina.....	103
Anexo No. 2 Determinación de Fenoles Totales.....	104
Anexo No. 3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH	106
Anexo No. 4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de (a) catecol y (b) pirogalol.....	12
Figura 2. Coffea arabica.....	13
Figura 3. (a) Coffea arabica y (b) Coffea canephora.....	16
Figura 4. Partes del grano de café.....	17
Figura 5. Estructura de ácido quínico.....	23
Figura 6. Metabolismo de fenilpropanoides.....	26
Figura 7. Modelo de capacitación del radical libre DPPH por un antioxidante.....	35
Figura 8. Estructura de radical libre ABTS.....	36
Figura 9. Procedimiento para la preparación de los residuos de café.....	51
Figura 10. Procedimiento para la obtención del extracto mediante EH.....	52
Figura 11. Procedimiento para la obtención del extracto mediante ES.....	52
Figura 12. Lectura de variables L^* , a^* y b^* en extracto.....	55
Figura 13. Proceso de elaboración del yogurt.....	56
Figura 14. (a) Barridos espectrofotométricos de CVSUEH y CVEH y (b) COSUEH y COEH.....	62
Figura 15. (a) Barridos espectrofotométricos de COSUES y COES (b) CVSUES y CVES.....	62
Figura 16. Cromatogramas de los extractos de residuos de café con fase móvil 8:2 diclorometano:metanol y 200 uL de ácido acético glacial, reveladas con luz uv a 254 nm (a), luz uv a 366 nm (b), $FeCl_3$ (c) y DPPH (d).....	64
Figura 17. Cromatogramas de los extractos de residuos de café con fase móvil 1:9 diclorometano:metanol y 200 uL de ácido acético glacial, reveladas con luz uv a 254 nm (a), luz uv a 366 nm (b), $FeCl_3$ (c) y DPPH (d).....	64
Figura 18. Cromatogramas de los extractos de residuos de café con fase móvil 6:4 diclorometano:metanol y 200 uL de ácido acético glacial, reveladas con luz uv a 254 nm (a), luz uv a 366 nm (b), $FeCl_3$ (c) y DPPH (d).....	65
Figura 19. Gráfica de color CIELAB.....	69
Figura 20. Prueba del colorante en yogurt natural (a) muestra el yogurt antes de agregar el pigmento y (b) muestra el yogurt después de agregar el pigmento.....	72
Figura 21. Medición de pH del yogurt (a) M468, (b) M277 y (c) M019.....	73
Figura 22. Yogurt con diferentes dosis de pigmento de residuos de café.....	74
Figura 23. Prueba sensorial de yogurt.....	74
Figura 24. Comparación de perfil sensorial en yogurt M468, M277 y M019 (línea color azul, rojo y rosa, respectivamente).....	75
Figura 25. Aceptabilidad del yogurt.....	76
Figura 26. Muestras de leche pigmento de residuos de café.....	78
Figura 27. Análisis sensorial de leche con pigmento de residuos de café.....	78
Figura 28. Comparación de perfil sensorial en leche M007, y M025 (línea color azul, rojo, respectivamente).....	79
Figura 29. Comparación de la aceptabilidad de la leche adicionada con el pigmento y la leche comercial.....	79
Figura 30. Curva patrón de Ácido Gálico.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales países productores de café en 2015.....	13
Tabla 2. Países productores según su especie de café en 2015.	16
Tabla 3. Promedios de la composición química del grano de café verde, según la especie, porcentaje en base seca.	18
Tabla 4. Composición química de granos de café verde y tostado de variedades Arábica.	19
Tabla 5. Sustancias bioactivas presentes en el café.	21
Tabla 6. Nombres y fórmulas químicas y estructurales de algunos ácidos clorogénicos presentes en el café.....	24
Tabla 7. Formato de evaluación sensorial para yogurt.	57
Tabla 8. Formato de evaluación sensorial para leche.....	59
Tabla 9 Resultados generales para fenoles totales método Folin Ciocalteu y actividad antioxidante con el radical libre DPPH y ABS.	66
Tabla 10. Coordenadas cromáticas de color de los extractos de residuos de café.	68
Tabla 11. Rendimiento del pigmento obtenido de residuos de café.	70
Tabla 12. Determinación de fenoles totales (FT) y actividad antioxidante (% de inhibición) en extractos hidrotérmicos de café de Oaxaca sin usar (COSUEH) y residuos de café de Oaxaca (COEH) aplicando los métodos DPPH, ABTS.	71
Tabla 13. Coordenadas cromáticas de color en yogurt.....	72
Tabla 14. Medición de pH.....	73
Tabla 15. Valores obtenidos en la prueba sensorial	74
Tabla 16. Coordenadas cromáticas de color en leche.	77
Tabla 17. Lectura de pH de la leche saborizada.....	77
Tabla 18. Reveladores para cromatografía en capa fina	103
Tabla 19. Procedimiento para la realización de la curva patrón de Fenoles Totales.....	104

RESUMEN

Actualmente en la industria alimenticia existe una fuerte tendencia por el uso de colorantes naturales debido a que son inocuos y algunos pueden favorecer a la salud humana coadyuvando a contrarrestar enfermedades asociadas al estrés oxidativo. A la par, se busca eliminar a los colorantes sintéticos del mercado, esto debido a que investigaciones recientes han informado sobre los efectos tóxicos que estos pueden provocar. Ya se están usando colorantes naturales extraídos de diferentes fuentes vegetales, sin embargo, siguen siendo insuficientes por lo que se continúa en búsqueda de nuevas fuentes. Existen reportes del uso de los granos de café como disolución tintórea o del uso de la borra de café resulta de la producción de café soluble. Por ello, en el presente trabajo se propuso hacer uso de los residuos de café (también conocidos como “borra de café”) como fuente alternativa de estudio para extraer colorantes naturales, dándoles un valor agregado a dichos residuos. Es importante mencionar que en México los subproductos generados del cafeto se han convertido en un problema ambiental debido a que no existe ninguna fábrica que controle los residuos resultantes.

Esta investigación consistió en el aprovechamiento de los residuos de café *Coffea arabica*, los cuales fueron recolectados en las cafeterías del Campus El Cerrillo UAEM. Se utilizaron residuos de café provenientes de dos lugares diferentes (Oaxaca y Veracruz) seleccionados así por su disponibilidad. El objetivo del estudio fue caracterizar un pigmento bioactivo obtenido a partir de residuos de café y evaluar su aplicación en productos alimenticios.

El pigmento bioactivo fue obtenido por dos métodos. Extracción hidrotérmica (EH) y extracción por sonicación(ES). En ambos métodos se utilizó agua destilada, dado que la aplicación sería en alimentos, se buscó evitar el uso de disolventes no permitidos en la industria alimenticia.

Se realizó cromatografía de capa fina como un primer acercamiento para la caracterización cualitativa de los compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos a partir de los residuos de café. Se analizaron por separado los extractos obtenidos de los residuos provenientes de café de Veracruz y de café de Oaxaca, así como de los dos métodos de extracción utilizados. En total se obtuvieron cuatro extractos a analizar 1) obtenido por el método de extracción hidrotérmica a partir de los residuos de café proveniente de Oaxaca (COEH) 2) obtenido por el método de extracción por sonicación a partir de los residuos de café proveniente de Oaxaca (COES) 3) obtenido por el método de extracción hidrotérmica a partir de los residuos de café proveniente de Veracruz (CVEH) 4) obtenido por el método de extracción por sonicación a partir de los residuos de café proveniente de Veracruz (CVES). Todas las placas fueron

positivas para taninos pirogálicos con una coloración azul negruzco y con DPPH se observaron bandas color amarillo blanquecino características de que hay compuestos en el extracto con actividad antioxidante.

Se realizaron barridos espectrofotométricos de los extractos obtenidos a partir de residuos de café y de café sin usar, esto con la intención de tener una idea general de los compuestos químicos presentes en ambas muestras. En ambos casos se encontraron picos de absorbancia entre las longitudes de onda 242-390 nm, sin embargo, la concentración de los compuestos en los extractos de residuos de café es menor en comparación con el café sin usar, esto se debe a que ya hubo una primera extracción de estos compuestos durante la preparación de la infusión aunque conservan el mismo patrón de la curva. De acuerdo con lo reportado entre el rango de 242-390 nm se encuentran algunos compuestos característicos del café como trigonelina, cafeína, melanoidinas y ácidos clorogénicos.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método Folin Ciocalteu, y la capacidad antioxidante de los extractos se evaluó por los métodos DPPH y ABTS. Se observó que la extracción hidrotérmica es el método más eficiente para la obtención de compuestos fenólicos en café, ya que se logró una extracción considerable de éstos a altas temperaturas por abajo de 100 °C. Con el tratamiento que se obtuvo una mayor concentración de fenoles fue COEH (0.09 ± 0 mg EAG/ g), por lo cual se consideró el mejor tratamiento.

Para DPPH los resultados muestran que COEH es el que presenta mayor porcentaje de inhibición ($34.44 \pm 0.15\%$), seguido de COES ($33.65 \pm 0.75\%$), el extracto CVES ($31.14 \pm 0.34\%$) y finalmente CVEH ($30.88 \pm 0.93\%$). Mientras que en ABTS se encontró que el tratamiento que mostró el porcentaje de inhibición mayor fue COEH ($69.26 \pm 0.22\%$), seguido de CVEH ($61.86 \pm 0.41\%$), el extracto COES ($54.63 \pm 0\%$) y finalmente CVES ($54.48 \pm 0\%$). Los residuos de café tienen una capacidad antioxidante considerable en comparación con algunas otras fuentes de antioxidantes como tuna verde, epicarpio de café o cascara de pitahaya.

Se evaluó la tonalidad de los extractos, para ello se calcularon los valores de las coordenadas L*, a* y b* y se graficaron en el espacio CIELAB. En todos los casos se obtuvieron tonalidades café.

Se evaluó el poder tintóreo del pigmento obtenido mediante pruebas en alimentos. Para ello, se adicionó el pigmento en yogurt en concentraciones de 0%, 1% y 2%, las muestras fueron sometidas a un análisis sensorial por medio una prueba de hedónica utilizando 20 panelistas no entrenados, en los resultados se observó que la concentración 1% presentó mayor aceptabilidad. Las características fisicoquímicas

evaluadas fueron: pH y color. Las muestras fueron etiquetadas como M468 (0% de extracto), M277 (1% de extracto) y M019 (2%) presentaron valores en pH de 4.09, 4.16 y 4.25, respectivamente, estos valores se encuentran dentro del intervalo de pH ideal (4.0-4.4) para yogurt.

Finalmente se evaluó el poder tintóreo del pigmento en leche saborizada. El pigmento fue adicionado a la leche en una concentración de 0.6%. La aceptación del producto fue evaluada a través de un análisis sensorial (color, olor, sabor, textura) y se comparó con un producto comercial (leche sabor café SINGLE SHOT Santa Clara), empleando 10 panelistas no entrenados. Se obtuvieron valores de pH para los tratamientos: leche sin tratamiento, M007 (leche adicionada con 0.6% del pigmento), M025 (leche comercial), de 6.7, 6.4 y 6.5, respectivamente. En la evaluación sensorial de la leche con sabor café (producto comercial) y la leche con pigmento de café, los panelistas mostraron mayor aceptación en cuanto a color, olor, sabor y textura por el producto comercial. La aplicación del pigmento obtenido en yogurt y leche tuvo como resultado productos con una aceptabilidad moderada por los consumidores.

INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria se ha visto sujeta a serios cambios debido a que los consumidores están optando por productos más naturales y en especial sin colorantes sintéticos, por ello, las nuevas tendencias buscan eliminar del mercado los colorantes sintéticos de los alimentos debido a que pueden causar efectos nocivos en la salud (Belmonte y Arroyo, 2016).

Hoy en día se usan diferentes colorantes naturales extraídos de fuentes vegetales como fresa, flor de jamaica y mortiño, entre otros (Avendaño y Acevedo, 2014; Marín y Mejía, 2012 y Cano, 2011).

Es importante mencionar que a pesar de que ya existen varias fuentes vegetales de colorantes naturales, dichas fuentes son insuficientes para cubrir la demanda del mercado, por lo que es necesario continuar indagando sobre nuevas fuentes alternas para obtener estos componentes de origen natural (Velázquez, 2013).

Según Garzón (2008), muchos investigadores tienen interés en los pigmentos fenólicos extraídos de fuentes vegetales debido a sus posibles efectos terapéuticos y benéficos, dentro de los cuales se encuentran los efectos anticancerígenos, antitumorales, antidiabéticos, antioxidante, etc.

Por otro lado, existen reportes del uso del café como agente tintóreo. El café es considerado como uno de los colorantes más comunes a lo largo de la historia, sin embargo, el enfoque que se le ha dado ha sido como aplicación en la industria textil principalmente (Zuriaga, 2011).

La generación de residuos del sector cafetalero es inevitable y considerando la enorme cantidad de subproductos generados, el aprovechamiento integral de los mismos con aplicaciones específicas promete un desarrollo sustentable de la economía industrial y del mismo país productor.

Los residuos del café obtenidos después de la molienda y de su utilización como bebida se han utilizado por años de manera artesanal y en pequeñas cantidades para diversas aplicaciones como composta (Suarez, 2012), para absorber aromas (Sara, 2017), como exfoliante (Romero, 2016), como disolución tintórea (Cevallos y Guerrero 2017), obtención de biocombustibles, entre otros. De manera industrial los residuos del café no son utilizados y normalmente son considerados como desecho.

En los últimos años, se ha notado una tendencia creciente en la utilización de residuos agroindustriales, sin embargo, existen muy pocos reportes del uso de los residuos de café también conocidos como “borra

de café” para la obtención de colorantes y los pocos que hay son con aplicación en la industria textil (González y col., 2014).

En esta investigación, se busca dar un valor agregado a los residuos de café (borra de café) generados en las cafeterías del Campus El Cerrillo UAEM. Para ello se plantea la extracción de pigmentos como fuente importante de sustancias con actividad antioxidante. Por tal motivo, los compuestos fenólicos fueron cuantificados y su capacidad antioxidante fue evaluada. La presencia de los compuestos químicos responsables del poder tintóreo de los extractos fue determinada por la técnica de cromatografía en capa fina. Finalmente, los pigmentos bioactivos obtenidos fueron utilizados en la formulación de productos alimenticios. La aceptación de dichos productos fue evaluada mediante una prueba hedónica con panelistas no entrenados.

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

Actualmente el uso de colorantes sintéticos en la industria alimentaria es cada vez más estricto, esto debido a la regulación para su uso, ya que algunos presentan problemas de toxicidad, reacciones de intolerancia y alérgicas. Por lo anterior, se busca eliminar del mercado a los colorantes sintéticos, esto ha generado un incremento en la demanda de pigmentos naturales, ya que hasta ahora no existen evidencias de toxicidad en los humanos por su consumo (Belmonte y Arroyo, 2016).

Los colorantes han sido usados por el hombre desde tiempos más remotos como aditivos de sus alimentos, en un principio se utilizaron colorantes extraídos de plantas y minerales, en la Edad Media, con el fin de remediar la monotonía de su alimentación, la gente añadía colorantes naturales como el ocre, los extractos de acelgas, de zanahorias o de hierbas (Moreno, 2004 y Sánchez, 2013).

Badui (1993) sostiene que el color de los alimentos es definitivamente muy importante para el consumidor, ya que es, el primer contacto visual que tiene con ellos, por lo cual es determinante para que un alimento sea aceptado o rechazado.

Los colores de los alimentos se deben a diferentes compuestos, principalmente orgánicos, algunos de los cuales se producen durante su manejo y procesamiento, como es el caso del color que se desarrolla debido a las reacciones de Maillard, a la caramelización o a los pigmentos sintetizados o modificados por procesos de fermentación. Sin embargo, la mayoría de los alimentos deben su color a las sustancias pigmentantes que contienen o que se añaden. En la mayoría de los casos estos pigmentos al ser adicionados a algún producto le otorgan distintos tipos de funcionalidad (Francis, 1999).

Los consumidores marcan la pauta respecto al reemplazo progresivo de colorantes sintéticos por colorantes naturales en los alimentos. La tendencia al consumo de lo natural es cada vez más fuerte y el uso de ellos es considerado un atributo de calidad del producto (Carmona, 2013).

Los principales compradores de colorantes naturales son países europeos, EE.UU. y Japón. En 2012 el consumo mundial de los colorantes naturales como aditivos en la industria de alimentos fue de 49,600

toneladas y se espera que crezca a una tasa anual compuesta de 3.8% entre 2013 y 2018 (Carmona, 2013).

1.1. COLORANTES

El color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de luz, el ojo humano sólo puede percibirlo cuando su energía corresponde a una longitud de onda que oscila entre 380 y 780 nm. El color se define como “la parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo” (Badui, 2006).

Un colorante es cualquier material que imparte color a otra sustancia, el cual puede ser obtenido por síntesis o extraído a partir de un vegetal, animal, mineral u otra fuente y que cuando es añadido o aplicada a alimentos, medicamentos o cosméticos, es capaz de impartir color por sí misma (Badui, 2006).

Los pigmentos son compuestos químicos que absorben luz en el intervalo de longitud de onda de la región visible. La producción del color se debe a la estructura específica del compuesto (cromóforo), esta estructura capta la energía y la excitación que es producida por un electrón de una órbita exterior a una órbita mayor, la energía no absorbida es reflejada y/o refractada para ser captada por el ojo, y los impulsos neuronales generados serán transmitidos al cerebro, donde pueden ser interpretados como color (Delgado-Vargas y col., 2000).

1.1.1. Clasificación de colorantes

Los colorantes se pueden clasificar con base a varios criterios según su origen (Cenzano, 1994):

- Orgánicos o naturales: procedentes de plantas y animales, tales como la clorofila, carotenos, betalaínas, flavonoides, antocianinas, entre otros.
- Minerales: tales como lacas, sulfato de cobre y cromato de potasio entre otros.
- Artificiales: obtenidos por síntesis química

Tomando en cuenta la solubilidad de los colorantes se distinguen:

- Hidrosolubles: solubles en agua
- Liposolubles o solubles en la grasa.

Por otra parte, la FDA creó dos categorías de colorantes permitidos (Carmona, 2013):

- Colorantes certificados: son producidos sintéticamente. Actualmente hay nueve autorizados en alimentos, los que llevan el prefijo FD&C o D&C, el color y un número. Por ejemplo: *FD&C Yellow N° 6* (Tartrazina).
- Colorantes liberados de certificación: son los que incluyen pigmentos derivados de fuentes naturales como frutas, hortalizas, minerales o animales. Ejemplos: el extracto de annatto (amarillo), betarragas deshidratadas, caramelo, beta-caroteno y extracto de piel de uva.

1.1.2. Colorantes naturales

Los colorantes naturales pueden ser clasificados, según su naturaleza química en diversos grupos. Como fuentes naturales de estos colorantes se pueden considerar las plantas superiores, las algas, hongos y líquenes, algunos insectos, así como algunos organismos marinos invertebrados (Lock, 1997).

Además de ser más inocuos que sus pares sintéticos, algunos otorgan al producto distintos tipos de funcionalidad, tal es el caso de los carotenoides y de las antocianinas, compuestos conocidos por su

actividad antioxidante y por su efecto protector en la prevención de ciertas enfermedades crónicas degenerativas y distintos tipos de cáncer (Carmona, 2013).

Los pigmentos naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen. Aunque hay colorantes poco comunes como el ácido carmínico, los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en las siguientes categorías (Badui, 2006):

- 1) Carotenoides
- 2) Clorofilas
- 3) Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos
- 4) Betalaínas
- 5) Hemopigmentos
- 6) Otros pigmentos naturales

Los cuatro primeros son de fuentes vegetales, aunque pueden llegar a estar presentes en alimentos de origen animal, a los cuales ingresan a través de la dieta. La mayoría de los pigmentos vegetales se localizan en el protoplasma de las células, dentro de los organelos especializados llamados plástidos, que se observan al microscopio formando pequeñas placas o agujas de estructura cristalina. En algunos casos, cuando son solubles en agua, se encuentran disueltos en las vacuolas de las células. El quinto grupo sólo se encuentra en productos de origen animal. En el sexto grupo se incluyen pigmentos que imparten color tanto a los tejidos vegetales como animales. Son poco abundantes en la naturaleza, pero no por eso menos importantes, debido a las características específicas de cada uno (Badui, 2006).

La estructura química determina las propiedades de los pigmentos que van más allá del color, aunque ésta sea su característica evidente. La estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento, su reactividad con otros compuestos químicos para determinar tanto el color como la durabilidad o cambio de éste, su posible toxicidad, por lo que es necesario en algunos casos certificarlos para que cumplan las normas oficiales (Badui, 2006).

1.1.2.1. Carotenoides

Los carotenoides son un grupo numeroso de pigmentos muy difundidos en los reinos vegetal y animal, producen colores que van desde el amarillo hasta el rojo intenso. Se han identificado en la naturaleza más de 600 de estos compuestos y se estima que anualmente se sintetizan 100,000 toneladas de carotenoides de fuentes naturales. Son esenciales para que las plantas realicen la fotosíntesis, ya que actúan como captadores de la luz solar y en forma muy especial como escudo contra la fotooxidación destructiva. Se encuentran en frutas y verduras, flores, algunas estructuras animales como el plumaje, crustáceos, microalgas y bacterias. Los carotenoides se utilizan en una gran variedad de productos alimenticios a base de agua (jugos, refrescos, sopas, gelatinas, postres, pastas, productos de repostería y panadería y productos cárnicos) y sustitutos cárnicos a base de triglicéridos (margarina, aceites, mantecas vegetales, mantequilla, quesos y productos lácteos) (Arad y Yaron, 1992; Wrolstand, 2000).

1.1.2.2. Clorofilas

Las clorofilas se encuentran en todas las plantas que realizan la fotosíntesis. La clorofila es el principal agente capaz de absorber la energía lumínica y transformarla en energía química para la síntesis de los compuestos orgánicos que necesita la planta. Las hojas de la mayoría de las plantas deben su color verde a la clorofila, aunque ésta va desapareciendo al acercarse a la senescencia para dar paso a otros pigmentos como los carotenoides. Las clorofilas se emplean poco como aditivos alimentarios, con excepción de algunas pastillas o gomas de mascar (Schwartz y Lorenzo, 1990).

1.1.2.3. Betaínas

Este término se refiere a un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles con estructuras de glucósidos, derivados de la 1,7-diazoheptametina y que se han dividido en dos grandes clases: los rojos o betacianinas y los amarillos o betaxantinas. Estos pigmentos se encuentran sólo en 10 familias: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellanaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodaceae*, *Didiereaceae*,

Holophytaceae, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* y *Portulacaceae*. Las betalaínas se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutas y hojas que las sintetizan, principalmente en la epidermis y subepidermis. Se emplea a las betalaínas en diversos alimentos como gelatinas, bebidas y postres en general (Francis, 1999; Franco, 2004).

1.1.2.4. Hemopigmentos

El color rojo de la carne se debe principalmente a los hemopigmentos: la hemoglobina y la mioglobina (Badui, 2006).

1.1.2.5. Pigmentos fenólicos

Los pigmentos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y al menos un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los ácidos fenólicos tienen un solo anillo, mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico (Badui, 2006).

1.1.2.5.1. Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*, amarillo) y las antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, metanol y etanol. (Jackman y Smith, 1996). Hay 13 subclases de flavonoides, lo que da un total de más de 5,000 compuestos que proporciona colores amarillos y naranjas a frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas, duraznos, naranjas y limones (Stewart, 1980); así como a hortalizas en donde son responsables en gran parte de su astringencia. Otros flavonoides proporcionan el color rojizo de las hojas de otoño (Stintzing y col, 2002).

1.1.2.5.2. Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos*, azul) se consideran una subclase de los flavonoides; también se conocen como flavonoides azules. Son compuestos vegetales no nitrogenados pertenecientes a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza. Se han identificado 300 de estos compuestos, que son responsables de una gama muy amplia de colores, desde el incoloro hasta el púrpura. Producen colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y otros productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores (Badui, 2006).

1.1.2.5.3. Taninos

Son una clase de compuestos fenólicos incoloros o amarillo-café, con sabor astringente y amargo, solubles en agua, alcohol y acetona. De acuerdo con su estructura y reactividad con agentes hidrolíticos, particularmente ácidos, se han dividido en dos grupos: taninos hidrolizables o pirogálicos y taninos no hidrolizables o condensados. Los taninos se consideran también antioxidantes, con capacidad de atrapar los radicales libres. Se oxidan con facilidad en presencia de oxígeno e intervienen en reacciones de oscurecimiento en algunas mermeladas a través de reacciones de tipo fenólico. Los taninos también sirven de sustrato en las reacciones de oscurecimiento enzimático, sobre todo en productos como el café y el cacao, y son los responsables de la astringencia de muchos frutos en estado inmaduro, como el plátano, la pera, la uva, la manzana, etcétera (Badui, 2006).

Durante el proceso del tostado del café cambian los componentes, da pauta a la formación de taninos y fracciones de alto peso molecular, melanoidinas. Las melanoidinas son el producto final de la reacción de Maillard, esta reacción se da por diferentes razones entre la degradación de azúcares y compuestos con un grupo amino libre. Son generalmente definidas como compuestos color café de alto peso molecular que contienen nitrógeno (Wang, 2011). De igual manera en el proceso de tueste se forman los taninos, los ácidos clorogénicos se isomerizan, se unen a las melanoidinas, se hidrolizan, forman quinolactonas y se transforman en guayacol, catecol, y pirogalol que consisten en compuestos derivados de los taninos (Puerta, 2011). La estructura de catecol y pirogalol se aprecian en la Figura 1.

Los taninos presentes en el café son el catecol (1,2-dihidroxibenceno) y el pirogalol (1, 2, 3-trihidroxibenceno). Estos compuestos se forman en la torrefacción del grano de café, aunque los taninos hidrolizables derivados del pirogalol son solubles en agua.

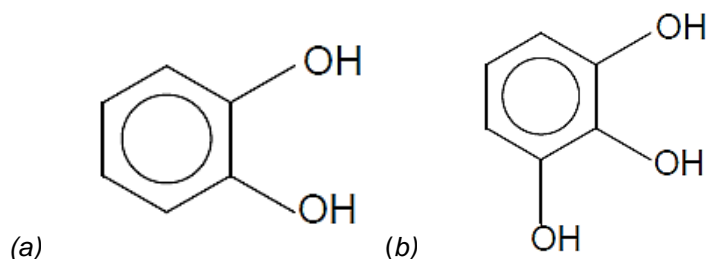


Figura 1. Estructura de (a) catecol y (b) pirogalol.

1.2. GENERALIDADES DEL CAFÉ

El café se define como la semilla seca de la planta del café sin importar que haya sido tostada o molida (Badui, 1993). El árbol del café es originario de Etiopía aunque la historia de su cultivo y su utilización como bebida se centra en Arabia en torno al siglo XV. La bebida fue introducida en Europa en el año 1600 aproximadamente y pronto se hizo popular en muchos países del continente. El origen de la palabra café deriva de la región de donde procede en Etiopía: Kaffa (Clarke, 1985).

El café es un arbusto de la familia de las rubiáceas, del género *coffea*. De hojas lustrosas y alargadas, sus flores son parecidas a las del jazmín. Seis meses después de la floración van apareciendo los racimos de color verde intenso, que se transforman a rojo en el proceso de maduración hasta lograr un tono rojo carmesí (Zuriaga, 2011). En la Figura 2 se aprecia la planta de cafeto.



Figura 2. *Coffea arabica*.

La introducción del cultivo en México ocurrió hace 200 años (Cano-Flores y col., 2004). A nivel mundial, según las estadísticas del año 2015 mencionadas en la Tabla 1, México es el noveno productor de café, mientras que es el primer productor mundial de café orgánico y es uno de los primeros en café gourmet (International Coffee Organization, 2015).

Tabla 1. Principales países productores de café en 2015.

Principales productores de café del mundo en el año 2015			
Puesto	País	Producción (en miles de Kg)	% de producción mundial
1	Brasil	2.594.100	30.16%
2	Vietnam	1.650.000	19.18%
3	Colombia	810.000	9.42%
4	Indonesia	660.000	7.67%
5	Etiopía	384.000	4.46%
6	India	350.000	4.07%
7	Honduras	345.000	4.01%
8	Uganda	285.000	3.32%
9	México	234.000	2.72%
10	Guatemala	204.000	2.37%

Fuente: Organización Internacional del Café, 2015.

El café es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo por sus propiedades organolépticas, teniendo muchos cambios complejos que ocurren durante el tostado, incluyendo el cambio de color de verde a café (Del Castillo, 2002).

1.2.1. Origen

El cafeto es un arbusto de las *rubiáceas*, proveniente del noroeste de África, concretamente de Etiopía en donde crecía de forma silvestre. Existen múltiples leyendas sobre el origen del café; una de ellas muy comentada y difundida, la de un pastor llamado Kialdi quien observó un extraño comportamiento de sus cabras (excitadas y enérgicas) tras haber consumido las bayas de cierto arbusto desconocido. Entonces el pastor decidió probarlas él mismo, sintiéndose lleno de energía. Kialdi llevó algunos frutos y ramas de ese arbusto a un monasterio donde los monjes por curiosidad las pusieron a cocinar. Al probar la bebida la encontraron de tan mal sabor que arrojaron a la hoguera lo que quedaba del recipiente. Los granos a medida que se quemaban despedían un agradable aroma. Fue así como a uno de los monjes se le ocurrió la idea de preparar la bebida a base de granos tostados (Sánchez, 2015).

1.2.2. Taxonomía

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Gamnopétalas-inferováricos

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

1.2.3. Características botánicas

Los cafetos son arbustos de las regiones tropicales del género *Coffea*, de la familia de las *Rubiáceas*, en la que se incluyen más de 500 géneros y alrededor de 800 especies. De todas las especies, solamente se cultivan 10 y dos de ellas han sido descritas como las más importantes por corresponder a más del 90% de la producción mundial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* conocida como Robusta (Antiasarán y col., 2000).

La planta de café es una dicotiledónea, puede alcanzar 10 metros de altura de forma silvestre y en una plantación de café controlada alcanza 3 metros de altura lo cual facilita el cosechado, tiene hojas aovadas, lustrosas y verdes, que se mantienen durante tres a cinco años y flores producidas entre los 3 y 4 años de edad, éstas son de color blanco y de aroma fragante y la parte más alta se divide en cinco pétalos.

Los cafetos cultivados en el mundo, a nivel industrial, son de las especies *Coffea arábica* y *Coffea canephora* (Clarke, 1985):

- *Coffea arábica*: representa aproximadamente 75% de la producción mundial de café. Los granos de café arábica tienen una forma aplastada y alargada, son ovalados con una raya divisoria curva, de ligera forma de “S” como se observa en la Figura 3. Esta variedad posee cualidades que generan una bebida aromática y afrutada, aportando un mejor sabor, mayor calidad y contiene la mitad de cafeína que el café robusta.
- *Coffea canephora* o *robusta*: representa aproximadamente 25% de la producción mundial de café. Los granos de café robusta se caracterizan por una forma más redondeada y circular, y una raya divisoria rectilínea. Es la variedad que aporta un sabor más fuerte, amargo y le da cuerpo a la bebida (más densa), generando una bebida de menor calidad pero con mayor cafeína.

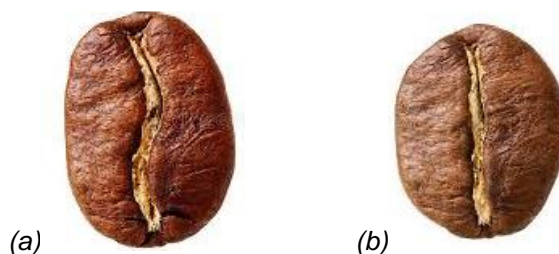


Figura 3. (a) *Coffea arabica* y (b) *Coffea canephora*.

La Tabla 2 muestra los principales países productores de las dos variedades café.

Tabla 2. Países productores según su especie de café en 2015.

Variedad de café	Países productores
<i>Coffea arábica</i>	Brasil, Colombia, Bolivia, Honduras, Ecuador, Venezuela, Etiopía, México, Kenia, Tanzania, Jamaica, Paraguay, Papúa Nueva Guinea, Guatemala, Perú, Nicaragua, Haití, El Salvador, Panamá, Costa Rica, Cuba y Puerto Rico
<i>Coffea canephora</i>	Costa de Marfil, Camerún, Nigeria, Zaire, Uganda, Vietnam, Angola, India, Brasil, Ecuador, Tailandia, Trinidad y Tobago, Ghana, Indonesia y Filipinas

Fuente: Organización Internacional del Café, 2016.

1.3. FRUTO DE CAFÉ

Los frutos de café también llamados cerezas de café, presentan una tonalidad rojo o púrpura. La cereza del café se forma en racimos unidos a las ramas por tallos muy cortos. Está formada por una piel exterior (exocarpio) cuyo cambio en color indica su evolución. El exocarpio recubre la pulpa (mesocarpio) de naturaleza mucilaginoso que encierra, normalmente, dos semillas pegadas por su parte plana y recubiertas por dos capas: una capa densa de pectina, y otra de coloración amarilla conocida como pergamino. Finalmente, el grano está recubierto por una delgada membrana de tonalidad plateada llamada tegumento (Prieto, 2002). En la Figura 4 se observan las partes del grano de café.

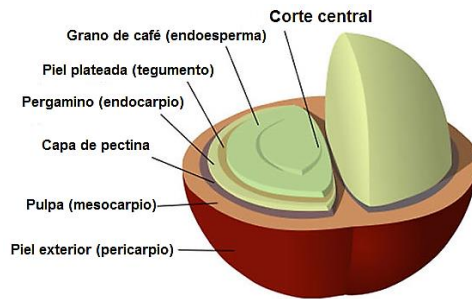


Figura 4. Partes del grano de café

1.3.1. Composición química de los granos de café

El café verde sin procesar contiene agua, proteínas, cafeína, lípidos, diversos carbohidratos y ácidos (principalmente solubles y no volátiles), trigonelina y minerales (Tabla 3). El café tostado contiene azúcares reductores, azúcares caramelizados (melanoidinas), hemicelulosa, fibra, proteínas, ácidos no volátiles (caféico, clorogénico, cítrico, málico, oxálico, quínico y tartárico), cafeína, lípidos, trigonelina y cenizas, en las cuales los principales constituyentes son potasio, fósforo y magnesio (Clarke y Macrae, 1985; Clarke y Vitzthum, 2001; Illy y Viani, 2005).

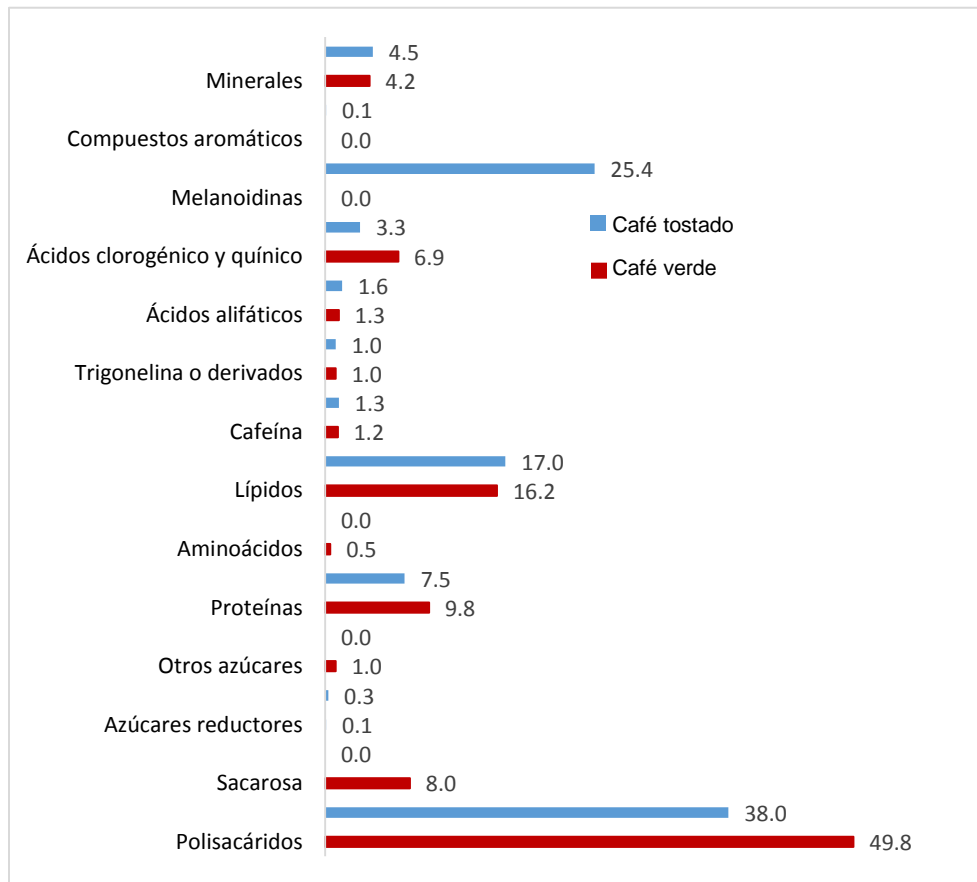
Tabla 3. Promedios de la composición química del grano de café verde, según la especie, porcentaje en base seca.

Componente químico	Árabica (%)	Robusta (%)
Polisacáridos	50.8	56.40
Sacarosa	8.00	4.00
Azúcares reductores	0.10	0.40
Proteína	9.80	9.50
Aminoácidos	0.50	0.80
Cafeína	1.20	2.20
Trigonelina	1.00	0.70
Lípidos	16.20	10.00
Ácidos alifáticos	1.10	1.20
Ácidos clorogénicos	6.90	10.40
Minerales	4.20	4.40
Compuestos aromáticos	trazas	trazas

Fuente: Clarke y col., 1985; Clarke, 2001; Illy y col., 2005.

En el tostado cambian los contenidos de los compuestos químicos y la concentración de éstos en los granos tostados con respecto al grano verde, en la Tabla 4 se observan estas diferencias (Illy y Viani, 2005).

Tabla 4. Composición química de granos de café verde y tostado de variedades *Arábica*.



Fuente: Illy y Viani, 2005.

Carbohidratos. Entre 15% y 20% de los polisacáridos contenidos en los granos de café verde se degradan en el tostado; la sacarosa se descompone completamente, se carameliza, y así, se producen pigmentos que dan color caramelo y amargo a la bebida y también ácidos fórmico, acético, glicólico, láctico y compuestos aromáticos como los furanos. Más del 99% de los azúcares reductores reaccionan con los aminoácidos en la conocida reacción de *Maillard* o glicación (Clarke y col., 2001; Nursten, 2005 y Murkovic y col., 2006), de esta manera, se forman las melanoidinas que dan el pigmento marrón a los granos de café y otorgan sabor y color a la bebida. Diferentes estudios sugieren que éstas son responsables de propiedades antioxidantes (Cinza-Borrelli y col., 2002). Además, mediante estas reacciones se producen los pirroles, tiofenos, oxazoles, tiazoles y pirazinas del aroma del café tostado.

Ácidos. Los principales ácidos del café tostado son: clorogénico, quínico, cítrico, acético, málico, fórmico, fosfórico, glicólico, láctico y otros 36 ácidos. Estos ácidos provienen del café verde y otros se producen en el tostado a partir de los carbohidratos, sacarosa, ácidos cítrico, málico y fosfórico, trigonelina y lípidos contenidos en la almendra (Clarke y col., 2001 y Ginz, 2000).

Ácidos clorogénicos. Son compuestos fenólicos que se relacionan con la prevención de enfermedades oxidativas, debido al grupo fenol que poseen en su estructura (Morishita y Ohnishi, 2001), en la protección de los dientes ya que forman una película protectora contra las bacterias (Daglia y col., 2002)

1.3.2. Sustancias bioactivas

Estudios recientes indican que algunos constituyentes del café, como los ácidos fenólicos (derivados del ácido clorogénico y taninos), los compuestos formados durante la reacción de Maillard (melanoidinas), la cafeína y ligninas, poseen propiedades antioxidantes (Tabla 5) (Yanagimoto y col., 2004; Fujioka y Shibamoto, 2006; Van Dam, 2006; Votavova y col., 2009).

De esta forma, éstas sustancias bioactivas pueden reducir las enfermedades asociadas al estrés oxidativo como la diabetes, la neurodegeneración, las enfermedades hepáticas, cardiovasculares y cáncer (Penckofer y col., 2002; Gandhi y Wood, 2005; Albano, 2006; Butterfield y col., 2006; Davidson y Duchon, 2007; Hwang y Bowen, 2007).

Tabla 5. Sustancias bioactivas presentes en el café.

Sustancias bioactivas presentes en el café	
Sustancia	Actividad Biológica
Ácido cafenil quínico	Antioxidante
Acetaldehído	Inhibidor de la tiroxinaza
Adenina	Vasodilatador y Diurético
<i>Alfa</i> -tocoferol	Antioxidante
Asparagina	Diurético
Ácido aspártico	Neuroexcitante
<i>Beta</i> -caroteno	Antioxidante
Ácido cafeico	Antidepresivo y antioxidante
Calcio	Vasodilatador
Colina	Hipoquinético
Ácido cítrico	Anticoagulante y antioxidante
Citrostadienol	Antirreumático
Cianidina	Antioxidante
Cisteína	Antioxidante
Cicloeucaalenol	Antibacterial
Eugenol	Antioxidante y vasodilatador
<i>Gamma</i> -tocoferol	Antioxidante
Guaiacol	Anestésico
Hierro	Antihemorrágico

Ácido isoclorogénico	Antioxidante
Isoeugenol	Antioxidante
Lanosterol	Antioxidante
Metionina	Antioxidante
Niacina	Vasodilatador
Ácido oléico	Antiinflamatorio
Ácido oxálico	Hemostático
<i>Para</i> -cresol	Antioxidante
Melanoidinas	Antioxidante

Fuente: Duke, 2009.

Durante el procesamiento del café, el tostado afecta su composición, lo que puede reducir la actividad antioxidante, debido a la degradación del ácido clorogénico y otros compuestos fenólicos. Sin embargo, 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 (Budryn y col., 2009).

1.3.3. Ácidos clorogénicos

Los compuestos fenólicos son constituyentes de plantas superiores, se encuentran en una amplia gama de alimentos como frutas, vegetales, cereales y legumbres, así como bebidas de origen vegetal, como vino, té y café (Cheynier, 2005; Manach y col., 2004). Éstos compuestos son metabolitos secundarios de plantas generalmente involucrados en defensa contra radiación ultravioleta o agresión por patógenos (Farah y Donangelo, 2006).

Muchos de estos compuestos fenólicos han recibido una atención considerable como factores protectores contra enfermedades crónico degenerativas en humanos (cataratas, enfermedades neurodegenerativas y diabetes mellitus), cáncer y enfermedades cardiovasculares (Scalbert y col., 2005).

Los compuestos que más contribuyen con la capacidad antioxidante del café son los compuestos fenólicos, principalmente los ácidos clorogénicos, seguidos por las melanoidinas (Perrone y col., 2012). El café es la principal fuente de ácido clorogénico en la dieta humana (Santos y col., 2007).

En los granos de café, los compuestos fenólicos están presentes predominantemente como una familia de ésteres formados entre ácidos hidroxicinámicos y ácido quínico, colectivamente conocidos como ácidos clorogénicos (Clifford, 1985).

Otros compuestos fenólicos, como taninos, lignanos y antocianinas también se encuentran presentes en los granos de café aunque en menor cantidad (Farah y Donangelo, 2006). En la Figura 5 se muestra la estructura de ácido quínico el cual pertenece al grupo de los taninos.

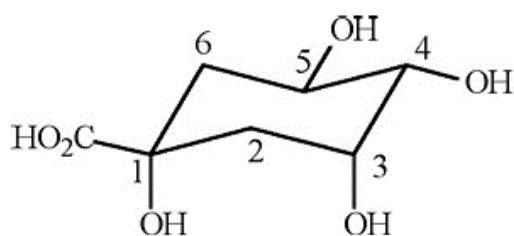


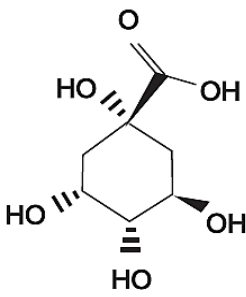
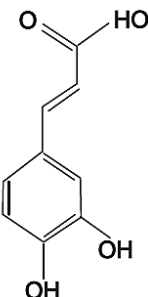
Figura 5. Estructura de ácido quínico

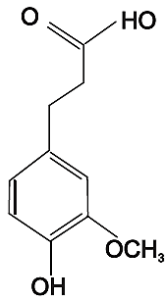
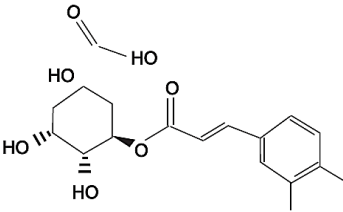
Los ácidos clorogénicos se encuentran en las paredes celulares, esterificados a los polisacáridos: se biosintetizan a partir de la fenilalanina, son precursores de la lignina, influyen en la textura y plasticidad de las plantas, cumplen funciones de protección de las plantas contra los microorganismos, de la luz ultravioleta, el daño por herbívoros y los daños físicos (Kroon, 1999; Parr y Bolwell, 2000).

Los ácidos clorogénicos se encuentran en los granos de café principalmente como mono y di-ésteres, y conforman más de 40 ácidos, en grupos de isómeros con sustituciones en las posiciones 1, 3-, 4-, ó 5-, del ácido quínico (Clifford y col., 2006).

La cantidad de ácidos clorogénicos varía con el grado de maduración, la especie y otros factores asociados a la calidad del café, tal como la altura y la presencia o ausencia de sombra e inclusive se les relaciona con la resistencia a algunas enfermedades (Aerts y Baumann 1994). En la Tabla 6 se muestran los nombres, fórmulas químicas y estructurales de algunos de los principales ácidos clorogénicos presentes en el café.

Tabla 6. Nombres y fórmulas químicas y estructurales de algunos ácidos clorogénicos presentes en el café.

Nombre común	Fórmula molecular y nombres químicos	Fórmula estructural	Obtención
Quínico QA	$C_7H_{12}O_6$ 1,3,4,5-Tetrahidroxi-(1 α , 3R, 4 α , 5R) ciclohexano-carboxílico		Quina, café
Cafeico CA	$C_9H_8O_3$ 3,4-Dihidroxi-cinámico3-(3,4-Dihidroxifenil)-2-propenoico		Arándano, manzana, cidra, orégano, verbena, tomillo, albahaca, cúrcuma, café

Ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$		Cereales, arroz, café, trigo, avena, manzana, maní
FA	<i>Trans</i> -4-Hidroxi-3-metoxicinámico 3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-2-propenoico		
Clorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$		Café, arándanos, manzana, cidra. Es el ácido fenólico más abundante en el café.
5-caffeoil-quínico	1,4,5-Thrihydroxi-ciclohexano carboxílico 3-(3,4-dihidroxicinamato) 3-[[3-(3,4-Di-hidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]oxi]-1,4,5,-trihidroxiciclohexano-carboxílico		
5-CQA			

Fuente: Clifford, 1985; Clifford, 1999; Kroon y col., 1999; Clifford y col., 2006; María y col., 2004; Parr y col., 2000.

1.3.3.1. Ruta metabólica para la síntesis de los ácidos clorogénicos

Los ácidos clorogénicos son productos de la ruta de fenilpropanoides. En las plantas, los ácidos fenólicos son sintetizados a partir de la fenilalanina y tirosina en la ruta del ácido shiquímico, en la cual convierte a precursores simples de los carbohidratos, derivados de la glicolisis y de la ruta de las pentosas fosfato (fosfo-enol-piruvato y D-eritrosa-4-fosfato), en aminoácidos aromáticos. La síntesis de los aminoácidos aromáticos comienza con la condensación de una molécula de D-eritrosa-4-fosfato y con una molécula de fosfo-enol-piruvato, el resultado es un azúcar de siete carbonos, que es ciclada y posteriormente reducida para formar shikimato. El corismato es un punto de ramificación que por un lado, da origen a la fenilalanina, y por el otro, origina al triptófano (Farah y Donangelo, 2006).

Los ácidos fenólicos se sintetizan por la ruta de los fenilpropanoides (Figura 6), la cual comienza utilizando L-fenilalanina generada por la ruta del ácido shikimico. La L-fenilalanina es desaminada por la fenilalanina amonialiasa (PAL) formando el ácido cinámico. El ácido cinámico es subsecuentemente hidroxilado por la ácido cinámico 4-hidroxilasa (CAH) para originar al ácido p-cumárico. El ácido p-

cumárico se convierte a p-cumaril CoA por la enzima ácido 4-cumárico: CoA ligasa (4CL). La ruta general de los fenilpropanoides termina con p-cumaril Coenzima A (Vermeris y Nicholson, 2006).

Los pasos finales de la biosíntesis del 5-monoacil CGA han sido estudiados en gran cantidad de plantas como el café y parecen incluir uniones del ácido *trans*-cinámico a la coenzima A (CoA) a partir CoA liasa, seguido por transferencia de ácido quínico por una cinamoil transferasa (Gross, 1981). Los ácidos hidroxicinámicos (p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico) puede ser sintetizados por ácido cinámico por hidroxilación o alternativamente por tirosina por acción de la tirosina amonio-liasa (Farah y col., 2006).

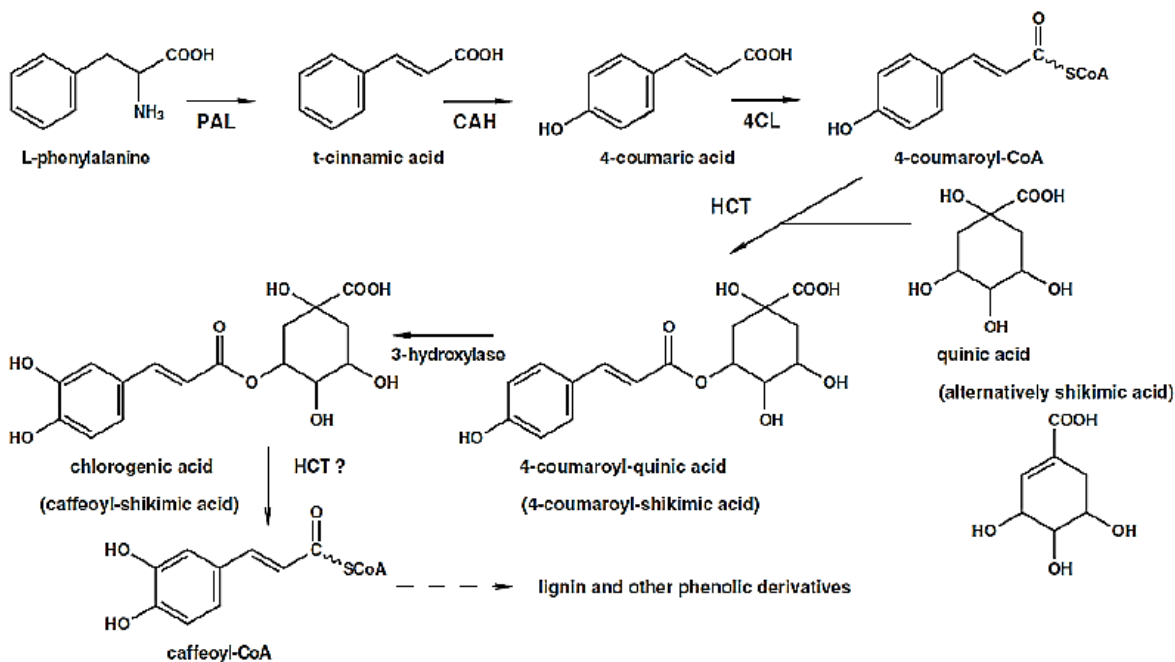


Figura 6. Metabolismo de fenilpropanoides

Fuente: Belén, 2013.

1.4. SUBPRODUCTOS DE CAFÉ

La generación de residuos del sector cafetalero es inevitable y, considerando la enorme cantidad de subproductos generados, el aprovechamiento integral de los mismos con aplicaciones específicas promete un desarrollo sustentable de la economía industrial del mismo país productor (Aguilar, 2013).

Recientemente se han tenido avances significativos en el empleo de subproductos o desechos agroindustriales para la obtención de productos de valor comercial, como vitaminas, agentes antimicrobianos, antioxidantes naturales, enzimas, entre otros, los cuales son de gran interés para la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos (Murthy y Madhava, 2012).

De acuerdo con Aguilar (2013) en el caso de los residuos de la industria del café existe muy poca información sobre su aprovechamiento aplicado a nivel industrial, y hablando de México en particular, la información disponible es aún menor.

En recientes años ha incrementado el interés por diferentes subproductos del café, ha incrementado el interés del uso de la pulpa de café para producción de biocombustibles (Corro y col., 2013), extracción de compuestos bioactivos (Bai, 2018), producción de proteína unicelular y hongos comestibles (Salmones y col., 2005), extracción a partir de la pulpa y de las hojas de café para obtención de un colorante natural (Díaz, M. y col., 2009; Aguilar y col., 2013).

Otro desecho de café, al cual se le ha dado un interés especial, es la borra de café, es un subproducto derivado de la producción de café soluble, también se obtiene durante la preparación de la bebida, el residuo corresponde a la fracción insoluble del grano tostado, la cual representa el 10% del peso del fruto fresco, cabe resaltar que este subproducto es desechado en grandes cantidades (Puertas-Mejía y col., 2013; Calle, 1997).

1.4.1. Usos de borra de café

Producción de papel. Un campo menos estudiado es su uso en la industria del papel. Los residuos del café después de la preparación de la infusión son materiales ricos en celulosa y hemicelulosa los cuales pueden ser empleados para la producción de diversos tipos de papel (García-Muñoz y col., 1999).

Extracción de sustancias bioactivas. Mussatto y col., (2011) estudiaron el proceso de extracción de compuestos bioactivos del residuo de la infusión de café empleando extracción convencional sólido-líquido. Los autores reportaron las condiciones adecuadas para la máxima extracción del contenido fenólico total y de la máxima actividad antioxidante.

Utilización como combustible directo. En las fábricas de café soluble, después del proceso de prensado y secado, la borra se utiliza como combustible en las calderas generadoras de vapor de agua (Rodríguez y col., 2010).

Producción de biogás. Kostenberg y col., (1994) reportan una producción de biogás, con un contenido de metano entre 52% y 62%, del orden de 250 a 300 L/kg de sólidos volátiles de borra.

Producción de bioetanol. Agudelo (2002) reporta que se pueden obtener hasta 27.85 g de etanol a partir de 56.98 g de celulosa proveniente de borra de café delignificada enzimáticamente, utilizando procesos de sacarificación y fermentación simultánea.

Producción de biodiesel. Combustible que se elabora a partir del proceso de esterificación de aceites de origen vegetal o animal, utilizando metanol o etanol, con el fin de reemplazar el combustible diésel; para el caso del aceite extraído de la borra, el promedio de los rendimientos fue de 10%, se comprobó que

muy poco aceite pasa a la bebida y que éste puede recuperarse casi completamente de la borra (Rodríguez y col., 2010)

Usos tradicionales. Los residuos del café obtenidos después de la molienda y de su utilización como bebida se han utilizado por años de manera artesanal y en pequeñas cantidades para diversas aplicaciones como composta (Suarez, 2012), para absorber aromas (Sara, 2017), como exfoliante (Romero, 2016) y disolución tintórea (Cevallos y Guerrero 2017) principalmente en la industria textil.

1.5. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para la extracción de los compuestos presentes en los residuos del café, generalmente, se macera o se muele. Se hace uso de diferentes soluciones acuometanólicas, cloroformo, etanol-cloroformo, agua, metanol, etanol-agua, diclorometano (Cevallos y col., 2017; Puertas-Mejía y col., 2013; Solís y col., 2005)

Actualmente en la búsqueda de tecnologías no contaminantes y consideradas “verdes”, se ha encontrado que la extracción asistida con ultrasonido llena estos requisitos ya que emplea menos disolventes.

1.5.1. Extracción hidrotérmica

Los ácidos clorogénicos son precursores del sabor y de los pigmentos del café tostado (Moreira y col., 2001) cabe mencionar que tienen gran solubilidad en agua (Amorim y col., 1973).

La extracción de ácidos clorogénicos en la bebida depende de la molienda del café, la proporción de café en agua, el método de elaboración y la prolongación de tiempo en que esta el café en contacto con

el agua, altas temperaturas por abajo de 100 °C resultan en una extracción considerable de ácidos clorogénicos (Trugo y col., 1984; Clifford, 1987). Los índices de extracción incrementan en los primeros 10 minutos, mientras que la extracción más alta de ácidos clorogénicos usualmente ocurre en los 2 primeros minutos a 93 °C, incrementando con menor velocidad después de esto (Merrit and Proctor, 1959, Clifford, 1987).

1.5.2. Extracción ultrasónica

Ultrasonido es el nombre que reciben las ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano. El efecto del ultrasonido se debe a la cavitación, se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentra sometido a presiones de alta amplitud, el resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces en la alternancia de ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan, lo que supone liberación de energía, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos (Herrero y Romero, 2006).

Esta metodología es emergente y se fundamenta en la aceleración de la transferencia de masa y calor, de manera que interaccionan con el material alterando sus propiedades físicas y químicas y el efecto de cavitación favorece la liberación de los compuestos a extraer y mejora el transporte de masa debido al rompimiento de la pared celular (Robles-Ozuna y col., 2012).

1.6. ANTIOXIDANTES

Se define como antioxidante a aquella “sustancia que, presente en bajas concentraciones comparada con los sustratos oxidables, retardan o previene significativamente la oxidación de esos sustratos” (Gutteridge, 1993; Miller, 1998).

Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura. Como consecuencia, son altamente reactivos lo que hace que tengan una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre (Halliwell y col., 1992). Los antioxidantes detienen el efecto de los radicales libres.

Perez y Pérez de Alejo (2000) señalaron que uno de los mecanismos de acción de los antioxidantes presentes en el cuerpo es aquél en que la molécula de antioxidante, al colisionar con un radical libre de oxígeno, le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un radical libre de oxígeno débil no tóxico.

En el ámbito de los alimentos se puede definir a los antioxidantes como “aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando grandemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas” (Chipault, 1962).

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son (Namiki, 1990):

- La prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado
- La regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano

1.6.1. Clasificación de los antioxidantes

Según el modo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios:

- a) Primarios: Incluyen compuestos fenólicos (Gordon, 2001). Impiden la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres, especialmente de las especies reactivas del oxígeno. Se comportan como captadores de estas especies reactivas de oxígeno (Katalinic, 2005).
- b) Secundarios: Cuando el nivel de antioxidantes primarios ha sido rebasado, el organismo tiene un segundo nivel de protección, los antioxidantes secundarios que atrapan a los radicales libres que se han formado, impidiendo así la iniciación de una cadena oxidativa o interrumpiendo su propagación (Doria y col., 2012). De acuerdo a Gordon (2001) operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, adsorción de radiación UV.
- c) Terciarios: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquéllas que se han estropeado (Page y col., 2009).

1.6.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia para disminuir la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, ADN). Las especies reactivas de oxígeno que se producen y escapan a los sistemas de defensa, producen continuamente irremediables daños (Quintanar y col., 2009):

- a) Daño al ADN. Los radicales libres pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas, conversión de bases (la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5- metilcitosina en timidina), aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas (una o dos hebras) todo lo anterior puede inducir mutaciones y carcinogénesis.
- b) Daño a las proteínas. Las especies reactivas de oxígeno pueden inducir en el extremo la fragmentación de proteínas, pero además existen una serie de alteraciones que pueden modificar

notablemente su función, modificando con ello el metabolismo, la estructura, el transporte, los receptores, las proteínas reguladoras y los inmunorreguladores, entre otros.

- c) Daño a los lípidos. La oxidación de los lípidos membranales provoca pérdida de la permeabilidad, la fluidez y la integridad de las membranas (la plasmática y de los orgánulos celulares).
- d) Daño a los carbohidratos. Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el organismo también utiliza los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores. Por lo tanto, el problema real se presenta cuando las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobrepasan las defensas endógenas ocasionando los daños antes mencionados (González y col., 2001).

Una especie reactiva de oxígeno es un átomo o molécula con electrones desapareados, y por lo tanto, es una especie inestable. Entre estos podemos mencionar a los radicales, (ión superóxido, radical hidroxilo, alcoxilo, peroxilo y óxido de nitrógeno) y a los no radicales (peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y peroxinitrito) (González y col., 2001).

1.6.3. Cuantificación de la actividad antioxidante

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra de los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Arnous y col., 2002; Giusti y col., 2001; Kim y col., 2002).

Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos (Marco, 1968).

Los siguientes son ejemplos de los modelos *in vitro* más frecuentemente usados para la evaluación de la actividad antioxidante total:

- a) Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)
- b) Ensayo FRAP, (Del inglés ferric-reducing antioxidant power)
- c) Método ORAC, (Del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity)
- d) Método del 6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina (ABTS)
- e) Método del N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD)

Dos de los métodos más utilizados son DPPH y ABTS, es por este motivo que en el presente trabajo se eligieron estos métodos, y se describen a continuación:

1.6.3.1. Método DPPH

Brand-Williams y col., (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable, que tiene un electrón desapareado, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una disolución metanólica. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta típico del radical, decolorándose a amarillo pálido cuando el DPPH reacciona con un antioxidante (Figura 7). La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición de la absorbancia del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales.

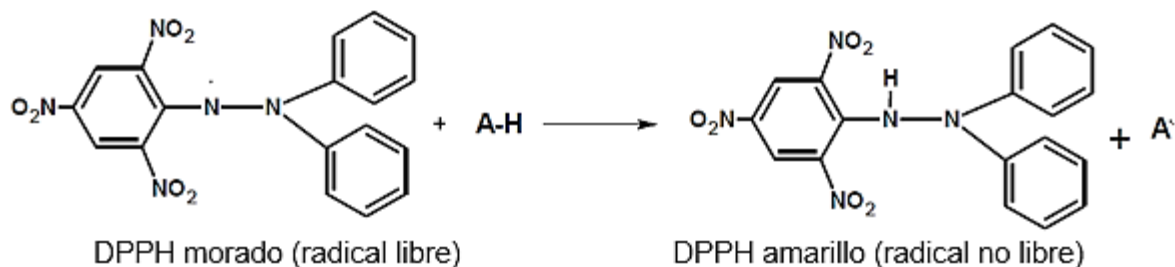


Figura 7. Modelo de capacitación del radical libre DPPH por un antioxidante

Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.

1.6.3.2. Método ABTS

La generación del radical ABTS•+ (Figura 8) constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El método original de ABTS•+ estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Éste fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes.

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS•+, implica la producción directa del cromóforo ABTS•+ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Éste presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La

adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de captación del radical catión $ABTS^{\bullet+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones (Ojha, 2012).

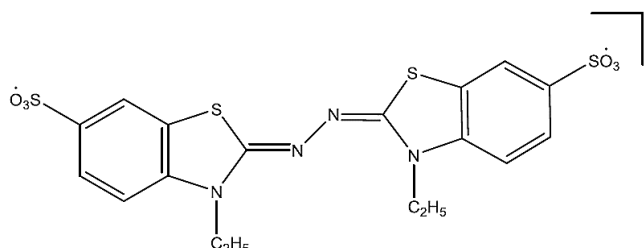


Figura 8. Estructura de radical libre ABTS.

1.6.4. Cuantificación de Fenoles Totales

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico de color amarillo (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico (Na_2CO_3 al 5-10 %, acuoso) reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiito, 1985).

Si bien es cierto que el mecanismo en concreto aún no está definido completamente se pueden apreciar los productos. Los cuales son la reducción a los polifenoles tienen una coloración azulada que se cuantifica espectroscópicamente de uv/vis debido a que absorbe a una longitud de onda de 750 nm, usando una recta patrón con ácido gálico, el contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico (García, 2003).

1.6.5. Medición del color

El color a menudo se utiliza para determinar el contenido de pigmentos de un producto, que a su vez es un índice de calidad, como es en el caso del salmón o del vino (González y Vicente, 2007).

Thomas Young menciona que el ojo detecta diferentes colores porque contiene tres tipos de receptores, cada uno de ellos sensible a una única tonalidad del color (Badui, 2006).

Existen tres tipos de conos; uno especialmente sensible a la luz roja con longitud de onda variando desde 700 a 770 nm, otro a la luz verde desde 495 a 570 nm y un tercero a la luz azul desde 400 a 475 nm. La combinación de estos tres colores básicos (rojo, verde y azul) permite diferenciar numerosos tonos (Figura y Teixeira, 2007).

El método de espectrometría de reflexión se basa en tres coordenadas: el tono (rojo, azul, verde y amarillo, y combinaciones de éstos), la cromaticidad o saturación (qué tan intenso es el color) y la luminosidad (componente blanco o negro). El CIE (Comisión Internacional de la Iluminación) desarrolló un sistema basado en una fuente de iluminación estándar y un observador estándar, sobre el que se construyó un sistema tricromático basado en la percepción del ojo humano: rojo, verde y azul, y tres parámetros: L^* = luminosidad, a^* = rojo a verde; b^* = amarillo a azul. Con el espacio de color CIELAB es posible describir cualquier color. Por otra parte, existen dos magnitudes psicofísicas, el tono (h^*) y el croma (C^*), calculadas a través de fórmulas matemáticas a partir de a^* y b^* (Badui, 2006).

1.6.6. Cromatografía de capa fina

En 1906, el botánico Ruso M. Tswett realizó un experimento que condujo al descubrimiento de lo que hoy conocemos como cromatografía. Colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de

una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio (CaCO_3). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades, dicho lo anterior, esta técnica permite determinar la presencia de los compuestos coloreados de interés.

La *cromatografía* se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases inmiscibles: una *fase móvil*, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada *fase estacionaria*. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido (Gómez, 2013).

En la cromatografía en capa fina (CCF), se utiliza una placa recubierta con el adsorbente (*fase estacionaria*) en forma de una capa delgada, de espesor constante, adherida sobre un soporte rígido, que puede ser una placa de vidrio, aluminio o poliéster (Gómez, 2013).

El eluyente (*fase móvil*) ascenderá por capilaridad por la placa y arrastrará los componentes en forma diferenciada a lo largo de ésta, produciendo “manchas” de los componentes. El grado de elución de las sustancias dependerá tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado (Gómez, 2013).

1.7. APLICACIÓN DE COLORANTES NATURALES EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS

Los colorantes extraídos de fuentes vegetales como los residuos de café pueden tener aplicación en algunos productos alimenticios como el yogurt y la leche, además de aportar nutrientes, afectaran beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y ejercen un papel preventivo ya que pueden reducir los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades.

1.7.1. Yogurt

El yogurt es un derivado lácteo, de consistencia semisólida, coagulado mediante la fermentación de la leche por bacterias ácido lácticas, las bacterias más comunes que son responsables de estos efectos son: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Luis et al., 2015).

Para llevar a cabo el proceso de fermentación la acción de esas bacterias desencadena un proceso microbiano, la lactosa se transforma en ácido láctico durante el proceso de fermentación tienden a crear coágulo con propiedades adecuadas de pH, sabor y aroma (Rivero et al., 2017).

De acuerdo con Gaona (2017) la elaboración del yogurt tiene diferentes etapas:

- Filtración: En esta etapa se filtra la leche mediante tamices de tela con el fin de eliminar impurezas o partículas extrañas.
- Pasteurización: Se pasteuriza la leche con el fin de inactivar la carga microbiana y que no se presenten interferencias con el desarrollo de los microorganismos lácteos; la pasteurización debe de alcanzar una temperatura de 90° C durante 20 minutos.
- Enfriamiento: Después de la pasteurización se debe de enfriar a 45°C para cumplir con la etapa de inoculación.
- Inoculación del cultivo láctico: Se agrega 3 % del fermento *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, con base a la cantidad de yogurt a producir y después se agita lentamente.
- Incubación: Se coloca en la caja térmica, a temperatura de 45°C por 4 horas ya que éste es el tiempo necesario para la fermentación láctea, formando coágulo alcanzando un valor de pH 4.5.

- Enfriamiento: Alcanzada la acidez adecuada y formado el gel, se refrigera para frenar la actividad del iniciador, evitando que la fermentación continúe, la temperatura de enfriamiento no debe de exceder a 5°C en cámaras de refrigeración.
- Agitación y dosificación: Consiste en romper el coágulo cuidadosamente para tener un producto homogéneo; la agitación se realiza lentamente durante aproximadamente 3 minutos. En la etapa de dosificación se añade el colorante, el saborizante y por último el conservante, dosificando con base en las especificaciones de los productos adquiridos.
- Envasado y etiquetado: Se vierte en envases previamente esterilizados, para luego pasar a la etapa de etiquetado, donde se debe especificar los ingredientes, incluido los aditivos alimentarios que se emplearon en la elaboración del yogurt.
- Almacenamiento: Se almacena el producto final a temperaturas de refrigeración de 5°C.

1.7.2. Leche saborizada

Desde hace muchos años la leche se ha constituido en un alimento básico de la dieta humana, para satisfacer las necesidades nutricionales, la leche de vaca es una emulsión formada por el 87% de agua y el 13% de grasa. Su alto valor nutricional proviene de las proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales de alta disponibilidad, como el calcio, esencial en la formación y mantención de huesos y dientes (Carpio, 2001).

De acuerdo con Espinoza y Zapata, (2010) el mercado actual ofrece gran cantidad de marcas y tipos de leches, siendo las saborizadas altamente requeridas por los consumidores, puesto que están listas para el consumo y sus sabores cautivan tanto a los niños como a los jóvenes y adultos. “*Leche saborizada* es el producto obtenido a partir de la leche entera, parcialmente descremada o descremada pasteurizada, sometida a tratamiento a altas temperaturas, a la que se han adicionado saborizantes, aromatizantes, edulcorantes y estabilizadores autorizados con el objeto de obtener un producto con carácter organoléptico diferente” (Reglamento Sanitario de los Alimentos, 2009).

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Caracterizar el pigmento bioactivo obtenido a partir de residuos de café y evaluar su aplicación en productos alimenticios

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar dos métodos de extracción de los pigmentos bioactivos
- Identificar la presencia de compuestos de interés
- Cuantificar fenoles totales en los extractos mediante Folin-Ciocalteu
- Cuantificar actividad antioxidante de los extractos por DPPH y ABTS
- Medir color en el extracto líquido por colorimetría
- Comparar resultados de pruebas fitoquímicas de residuos de café y café sin usar
 - Probar posibles aplicaciones de los pigmentos en la industria alimentaria (usar el pigmento obtenido para la elaboración de yogurt y leche con sabor a café y realizar un análisis sensorial de los productos alimenticios elaborados)

CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis

Los pigmentos obtenidos a partir de residuos de café conservan una fracción de compuestos químicos con poder tintóreo y capacidad antioxidante, lo que los convierte en pigmentos bioactivos. Dichos pigmentos conferirán atributos (color, olor, sabor y textura) aceptables a los alimentos funcionales a desarrollar.

CAPÍTULO 4 JUSTIFICACIÓN

4.1. Justificación

En los últimos años, existe recelo ante los colorantes sintéticos por lo que los consumidores demandan el reemplazo de éstos por colorantes de origen natural, ya que se ha vuelto de suma importancia saber lo que consumen, así mismo, se ha incrementado el uso de pigmentos naturales a nivel mundial debido a la exigencia de productos naturales, que sean inocuos y aporten beneficios a la salud.

Se han realizado trabajos basados en la extracción de los colorantes de origen natural a partir de diversas fuentes como fresa, flor de jamaica, mortiño, mora de castilla, entre otros, sin embargo, éstas resultan insuficientes por lo que se siguen buscando nuevas fuentes vegetales alternas para extraer colorantes naturales.

Dicho lo anterior, el café tiene gran potencial como colorante, se ha visto que los colorantes naturales provenientes de esta planta se pueden extraer de la pulpa, hojas, de los granos, así como de los residuos resultantes de la preparación de la bebida. Tras el procesamiento de la planta, normalmente los residuos son utilizados de manera artesanal en algunas aplicaciones como composta o exfoliantes. Sin embargo, no se ha encontrado registro en la literatura en donde hayan hecho uso de los residuos del café para extraer pigmentos con aplicación en la industria alimenticia, por lo que se puede adoptar como una posible alternativa de estudio.

En México, muy pocas o ninguna industria controla los residuos generados de la producción del café y por lo tanto sigue siendo un problema de contaminación vigente. Considerando los avances recientes en el empleo de residuos de café con fines específicos, se presenta una alternativa del aprovechamiento de los residuos de la industria cafetalera, la borra o residuos de café, al darle un valor agregado ayudará a minimizar los problemas ambientales producidos por la generación de estos residuos. El aprovechamiento de la borra de café en aplicaciones específicas, como extraer un colorante natural, promete un desarrollo sustentable de la economía industrial y del mismo país productor.

Algunos pigmentos naturales tienen la cualidad de contener propiedades antioxidantes. Un ejemplo de ello son los pigmentos fenólicos, los cuales se conocen por ofrecer actividad biológica antioxidante, antidepresivo, vasodilatador, entre otros. Estudios han sugerido una positiva relación entre el consumo de alimentos con propiedades antioxidantes y su función en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas, originado por radicales libres, por ello se busca evaluar la capacidad antioxidante de los

residuos de café generados en el procesamiento del café de la especie arábica, procedentes de Veracruz y Oaxaca, con el fin de establecer un uso potencial de estos subproductos.

En esta investigación se obtendrá un pigmento bioactivo a partir de los residuos de café y se evaluará su posible aplicación como colorante natural en la industria alimentaria. De esta manera se le dará un valor agregado a un material que es considerado como desecho.

CAPÍTULO 5 MATERIALES

5.1. Materiales

Etanol (96%) y metanol (99.9%) fueron obtenidos de J. T. Baker S.A. de C.V., 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (97%, DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (98%, ABTS), (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (97%, Trolox), reactivo comercial de Folín-Ciocalteu 2N, ácido gálico (98%), carbonato de sodio anhidro (99%) y persulfato de potasio fueron obtenidos de Sigma Aldrich, para todos los experimentos se utilizó agua destilada.

5.2. Material Biológico

Residuos de granos de café (Marca Villa's, proveniente de Veracruz y Marca La Organización, proveniente de Oaxaca), los cuales fueron recolectados en la cafetería del Campus El Cerrillo de la UAEM en el mes de enero del 2018. Leche entera de vaca pasteurizada, leche en polvo, yogurt natural, azúcar, leche descremada de vaca ultrapasteurizada, leche sabor a café marca *Café SIGLE SHOT* Santa Clara.

CAPÍTULO 6 METODOLOGÍA

6.1. Preparación de los residuos de café

En la Figura 9 se presenta la metodología utilizada para la preparación de los residuos de café:

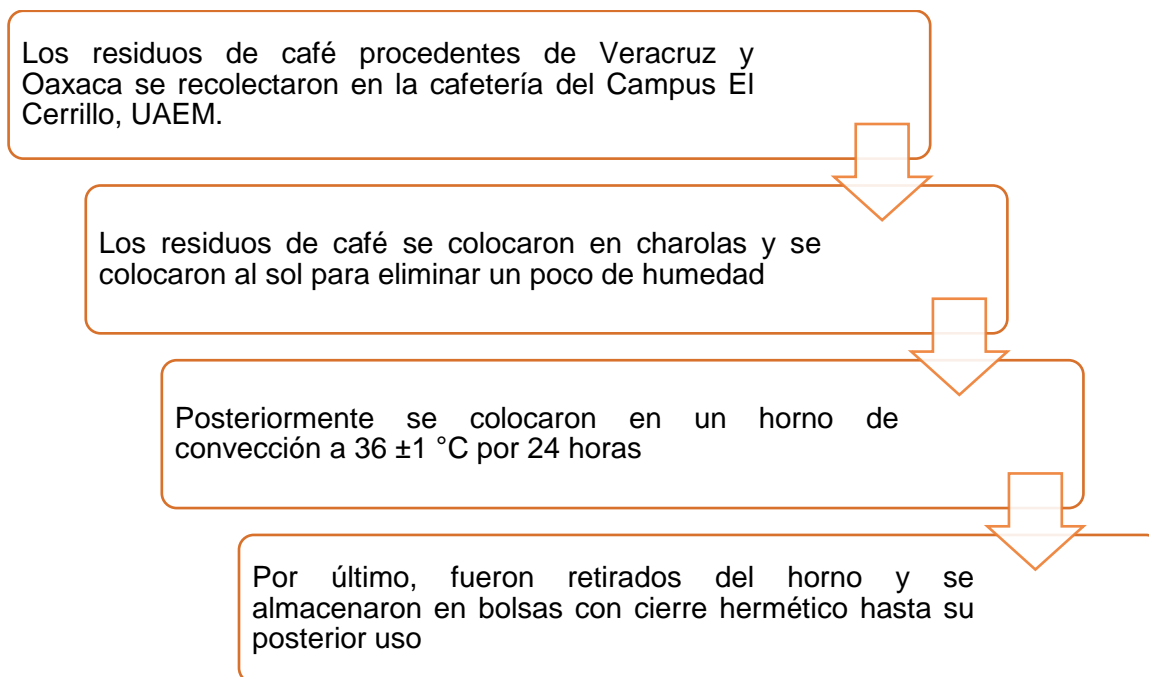


Figura 9. Procedimiento para la preparación de los residuos de café.

6.2. Obtención de los extractos

Se realizaron dos tipos de extracciones:

- Extracción hidrotérmica (EH)
- Extracción por sonicación (ES)

A ambos residuos de café (Oaxaca y Veracruz) se les aplicaron los dos tipos de extracción, obteniendo un total de cuatro extractos.

La extracción hidrotérmica se llevó a cabo de acuerdo a la Figura 10

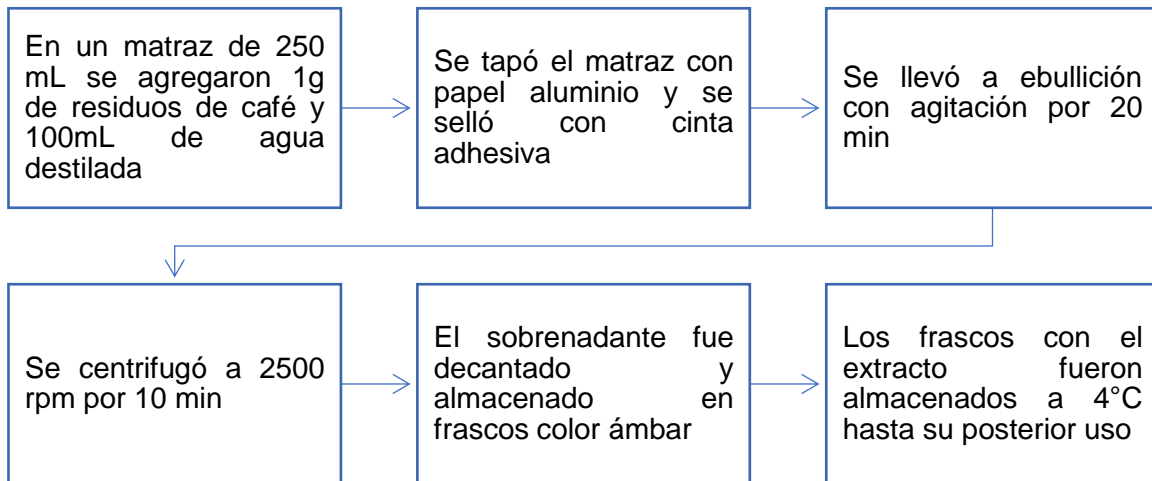


Figura 10. Procedimiento para la obtención del extracto mediante EH

La extracción por sonicación se realizó de acuerdo al procedimiento de la Figura 11:

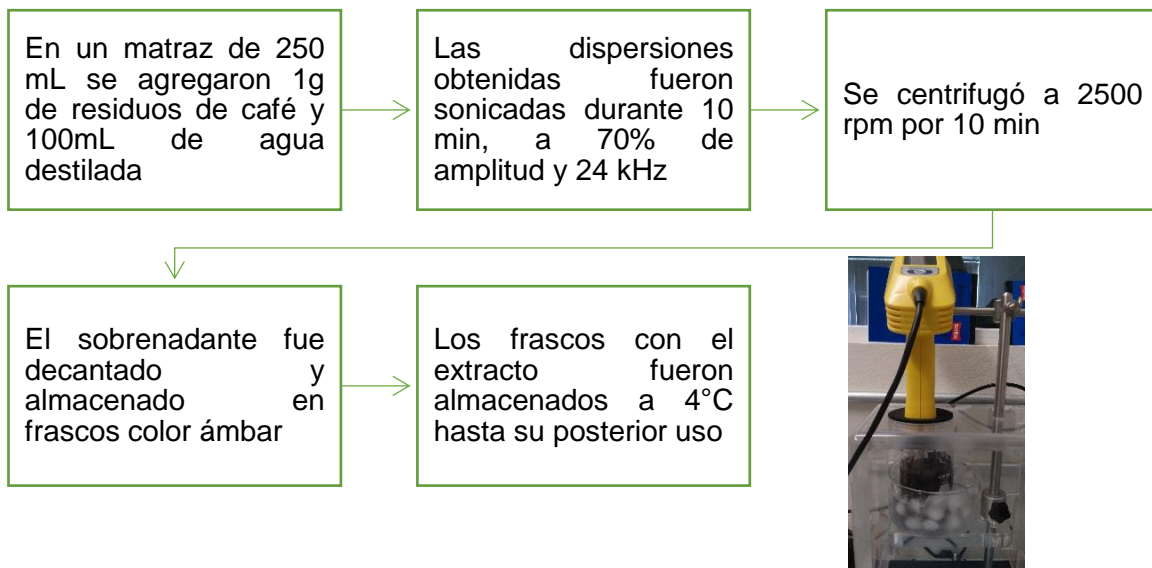


Figura 11. Procedimiento para la obtención del extracto mediante ES

6.3. Barrido espectrofotométrico de los extractos

El barrido espectrofotométrico se realizó midiendo los extractos hidrotérmicos y por sonicación de café de Oaxaca y Veracruz sin usar, así como los residuos, con una longitud inicial de 190 nm y una longitud final de 600 nm, con un intervalo de 2.0 nm. Para la medición de todos los extractos se realizó una dilución 1:10.

6.4. Cromatografía en capa fina de los extractos

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Rey y col., (2009) y Hurtado y col., (2015) con ligeras modificaciones. Cada uno de los extractos (COEH, COES, CVEH y CVES) fueron inyectados 4 veces en una placa cromatográfica, después se introdujo la placa con la muestra ya integrada en una cámara de vidrio, la cual contenía la fase móvil, diclorometano:metanol en proporción 6:4, 9:1 y 8:2 mL y 200 uL de ácido acético glacial, la fase móvil subió por capilaridad en la placa, arrastró y separó los distintos componentes de la muestra en función de su polaridad. Cuando la fase móvil alcanzó el borde superior de la placa (0,5 cm), éste fue retirado de la cámara y secado a temperatura ambiente hasta total evaporación de los disolventes. Para la identificación de las manchas se utilizó una lámpara UV las placas fueron observadas a longitudes de onda de 254 y 366 nm. Por último, las placas fueron reveladas con cloruro férrico (ver Anexo No. 1) y DPPH, éste último permitió reconocer cualitativamente, bandas con posible actividad antioxidante en color amarillo blanquecino.

6.5. Determinación de Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales se realizaron por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Trejo (2010) con pequeñas modificaciones, se utilizó una disolución de carbonato de sodio anhidro 20% p/v, una disolución patrón de ácido gálico 0.1 mg/mL, el reactivo de Folin-Ciocalteu y agua destilada, todas las reacciones se dejaron reposar 60 minutos a temperatura ambiente en la obscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis Thermo Fisher Scientific. (La técnica general se describe en el Anexo No. 2).

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

El método para la determinación de la capacidad antioxidante se realizó por medio del método de DPPH descrito por Brand-Williams y col. (1995) con algunas modificaciones; para el cual se tomaron 0.1 ml de cada muestra y se les añadió 3.9 mL de una disolución del radical DPPH* (0.025 g/L), para la curva patrón se utilizó una disolución stock 1.2 mM de TROLOX. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, después se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis Thermo Fisher Scientific. (La técnica general se describe en el Anexo No. 3). La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración.

6.7. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

También se utilizó el método de ABTS para la determinación de la capacidad antioxidante descrito por López-Martínez y col. (2010) con algunas modificaciones. Se preparó una disolución stock 7mM de ABTS y una de persulfato de potasio 140mM, se combinaron 5mL de la primera con 88uL de la segunda, se dejó reposar durante 12 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz, transcurrido el tiempo se diluyó hasta obtener una absorbancia de 0.74 a 734 nm. Se tomaron 0.1 mL de las diferentes muestras y se les añadió 3.0 mL de la disolución ABTS, para la curva patrón se utilizó una disolución stock 1 mM de TROLOX. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis Thermo Fisher Scientific. (La técnica general se describe en el Anexo No. 4).

6.8. Determinación del color del extracto por colorimetría

La cuantificación del color se realizó por medio de un colorímetro KONIKA MINOLTA. Se determinó el valor de las variables L*, a*, b*, la primera se refiere a la luminosidad, la segunda va de rojo a verde y la tercera de amarillo a azul.

Se calibró el equipo, posteriormente se colocó la muestra del extracto en papel filtro y éste a su vez se colocó dentro de una caja Petri. Se midió la muestra obteniendo los valores correspondientes a las

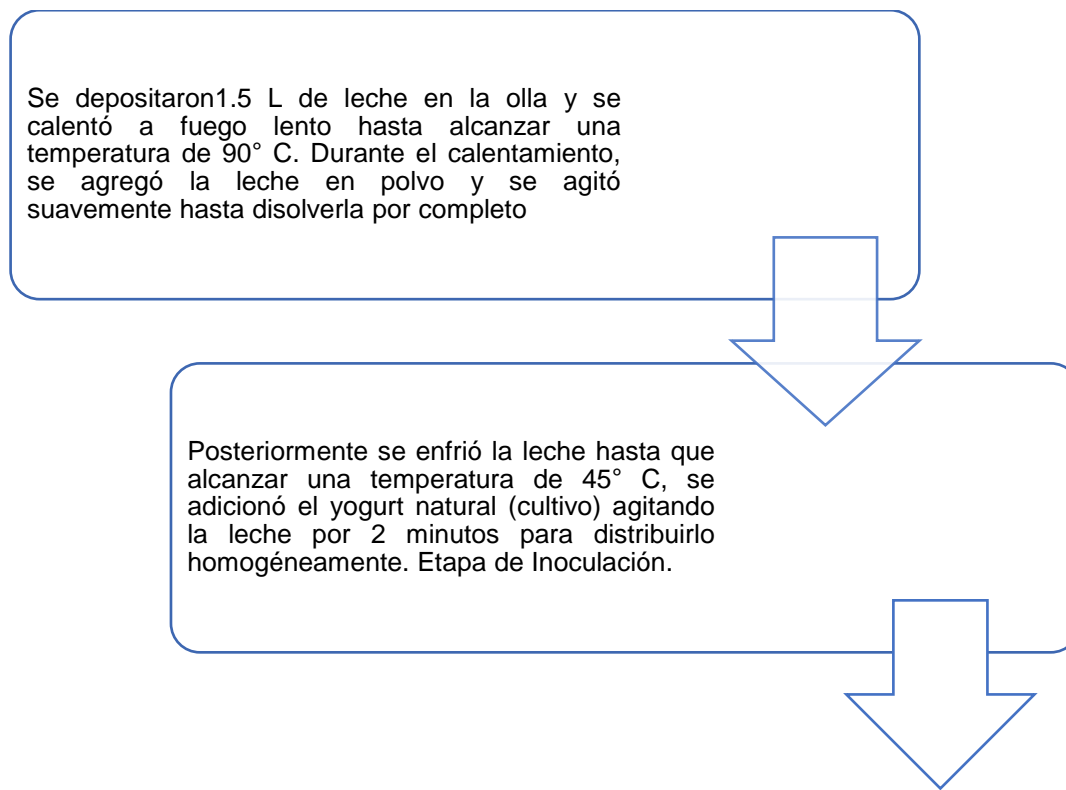
variables L^* , a^* y b^* como se muestra en la Figura 12 (Chuchuca y col., 2012). Se repitió este procedimiento para cada uno de los extractos (CVEH, CVES, COEH y COES).



Figura 12. Lectura de variables L^* , a^* y b^* en extracto.

6.9. Elaboración de yogurt usando el pigmento bioactivo obtenido

Se preparó el yogurt y se le adicionó el pigmento obtenido de los residuos de café. El procedimiento se describe en la Figura 13.



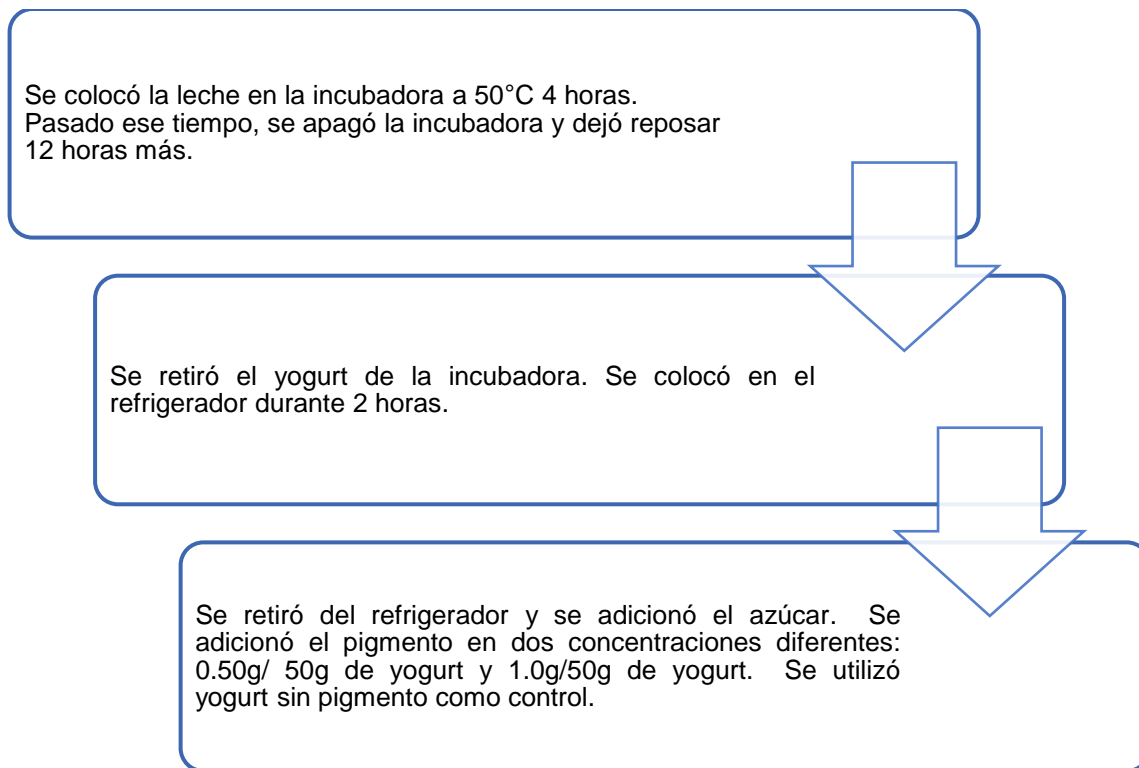


Figura 13. Proceso de elaboración del yogurt.

Las muestras de yogurt fueron nombradas de la siguiente manera: M468, M277 y M019, las cuales contenían las concentraciones del pigmento obtenido: 0% del extracto, 1% del extracto (0.50g de extracto/50g de yogurt) y 2% de extracto (1.0g de extracto/50g de yogurt) respectivamente.

6.9.1. Medición de pH

Las mediciones de pH se llevaron a cabo con un potenciómetro HANNA pH 210 Microprocessor pH Meter. Las muestras de yogurt M468, M277 y M019 fueron colocadas en vasos de precipitado. El electrodo se lavó con agua destilada, se secó y se introdujo en cada una de las muestras, finalmente se hizo el registro de la lectura del pH.

6.9.2. Determinación de color

La determinación de color de las muestras de yogurt se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente en la sección 6.8

6.9.3. Prueba hedónica de yogurt con el pimiento bioactivo

Para evaluar las características sensoriales de las muestras en estudio, se realizó un análisis sensorial mediante un panel no entrenado de 20 personas (estudiantes de la Facultad de Ciencias UAEM), con el fin de determinar la aceptabilidad según el nivel de adición del pigmento obtenido. Se utilizó la escala hedónica para medir la aceptación del producto, empleando escalas categorizadas de 1 a 9 puntos. Los atributos evaluados fueron: olor, color, sabor y textura. En la Tabla 7 se presenta la valoración de cada puntuación de la escala hedónica.

Tabla 7. Formato de evaluación sensorial para yogurt.

Nombre: _____	Fecha: _____																								
INSTRUCCIONES																									
<p>Frente a usted se presentan tres muestras de yogurt. Por favor, observe y pruebe cada una de ellas, yendo de izquierda a derecha. Indique el grado en que le gusta o le disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje/categoría, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.</p>																									
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Puntaje</th> <th style="width: 90%;">Categoría</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">1</td><td>Me disgusta extremadamente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td><td>Me disgusta mucho</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td><td>Me disgusta moderadamente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">4</td><td>Me disgusta levemente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">5</td><td>No me gusta ni me disgusta</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">6</td><td>Me gusta levemente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">7</td><td>Me gusta moderadamente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">8</td><td>Me gusta mucho</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">9</td><td>Me gusta extremadamente</td></tr> </tbody> </table>		Puntaje	Categoría	1	Me disgusta extremadamente	2	Me disgusta mucho	3	Me disgusta moderadamente	4	Me disgusta levemente	5	No me gusta ni me disgusta	6	Me gusta levemente	7	Me gusta moderadamente	8	Me gusta mucho	9	Me gusta extremadamente				
Puntaje	Categoría																								
1	Me disgusta extremadamente																								
2	Me disgusta mucho																								
3	Me disgusta moderadamente																								
4	Me disgusta levemente																								
5	No me gusta ni me disgusta																								
6	Me gusta levemente																								
7	Me gusta moderadamente																								
8	Me gusta mucho																								
9	Me gusta extremadamente																								
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="width: 15%;">CÓDIGO</th> <th colspan="4">Calificación para cada atributo</th> </tr> <tr> <th style="width: 15%;">OLOR</th> <th style="width: 15%;">COLOR</th> <th style="width: 15%;">SABOR</th> <th style="width: 15%;">TEXTURA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>M468</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>M277</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>M019</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		CÓDIGO	Calificación para cada atributo				OLOR	COLOR	SABOR	TEXTURA	M468					M277					M019				
CÓDIGO	Calificación para cada atributo																								
	OLOR	COLOR	SABOR	TEXTURA																					
M468																									
M277																									
M019																									

6.10. Preparación de leche adicionada con el pigmento

Se usaron 250 mL de leche descremada ultrapasteurizada, a la cual se le añadieron 1.5 g (equivalente a 0.6%) del pigmento obtenido, y se agregó azúcar, se mantuvo con agitación constante hasta obtener una mezcla homogénea.

6.10.1. Medición de pH

Las mediciones de pH para la leche comercial y la leche adicionada con el pigmento se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita previamente en la sección 6.9.1

6.10.2. Determinación de color

Las mediciones de color para la leche comercial y la leche adicionada con el pigmento se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita previamente en la sección 6.8

6.10.3. Prueba hedónica de leche saborizada

En la prueba hedónica se usó como referencia un producto comercial, leche sabor café, marca *Café SINGLE SHOT* Santa Clara. El etiquetado fue al azar usando una letra y 3 números. M025 y M007 para leche comercial y la leche adicionada con el pigmento, respectivamente. Las muestras fueron sometidas a un análisis sensorial por medio de una prueba de degustación (Tabla 8) utilizando 10 panelistas no entrenados.

Tabla 8. Formato de evaluación sensorial para leche.

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES

Frente a usted se presentan dos muestras de leche. Por favor, observe y pruebe cada una de ellas, yendo de izquierda a derecha. Indique el grado en que le gusta o le disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje/categoría, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.

Puntaje	Categoría
1	Me disgusta extremadamente
2	Me disgusta mucho
3	Me disgusta moderadamente
4	Me disgusta levemente
5	No me gusta ni me disgusta
6	Me gusta levemente
7	Me gusta moderadamente
8	Me gusta mucho
9	Me gusta extremadamente

CÓDIGO	Calificación para cada atributo			
	OLOR	COLOR	SABOR	TEXTURA
M007				
M025				

6.11. Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevarán a cabo al menos por triplicado. Los resultados se expresaron como el promedio de tres determinaciones, los cuales fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existía diferencias significativas entre las medias y una Prueba de Múltiples Rangos para saber que medias son significativamente diferentes de otras, mediante el software Statgraphics Centurion XVI, versión 16.0.09, considerándose estadísticamente significativos para un $p \leq 0.05$ y con un intervalo de confianza de 95.0 %.

CAPÍTULO 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Barrido espectrofotométrico de los extractos

Los principales compuestos químicos reportados en el café son los ácidos clorogénicos, las melanoidinas, cafeína y trigonelina, estos compuestos absorben la luz a una longitud de onda específica. Una manera de determinar la presencia de dichos compuestos es haciendo un barrido de absorbancia mediante espectrofotometría para determinar la longitud de onda a la cual absorben. Para ello, se hicieron barridos de absorbancia de extractos de café sin usar (sin haber sido usado para preparar la bebida de café) y de extractos obtenidos a partir de residuos de café (café obtenido después de la preparación la bebida de café). Se usó el café de las dos fuentes (Oaxaca y Veracruz).

En la Figura 14 se presentan los resultados obtenidos, como puede observarse, los gráficos de CVSUEH (café de Veracruz sin usar, extracción hidrotérmica) y CVEH muestran un pico entre las longitudes de onda de 270 y 380 nm, en cuanto a COSUEH (café de Oaxaca sin usar, extracción hidrotérmica) y COEH se aprecia que tienen un comportamiento similar al obtenido por el café de Veracruz con el mismo tipo de extracción, pero presentan un pico entre las longitudes de onda de 270 y 390 nm. De acuerdo con la literatura, la máxima absorbancia de los ácidos clorogénicos es alrededor de 242 a 325 nm (Lallemant y col., 2012). Las melanoidinas presentan un pico de absorbancia a 293 nm (Kim y col., 2008). Finalmente, López (2008) reporta que la cafeína y trigonelina absorben a una longitud de onda de 276nm y 268nm respectivamente. Los resultados obtenidos presentan un pico de absorbancia abarcando las longitudes de onda antes mencionadas por lo que podemos corroborar la presencia de los compuestos químicos antes mencionados en los extractos obtenidos a partir del café nuevo. Por otro lado, en la Figura 14 también puede observarse que los extractos obtenidos a partir de los residuos del café presentan los mismos picos de absorbancia sólo que en menor intensidad, en ambos casos (café de Oaxaca y de Veracruz). Por lo tanto, podemos decir que los residuos de café conservan los compuestos químicos presentes en el café sin usar, pero en menor concentración.

Es importante destacar que el café de Oaxaca presenta una mayor concentración de los compuestos en ambos casos (a partir de residuos de café y de café sin usar), dado que las absorbancias son mayores.

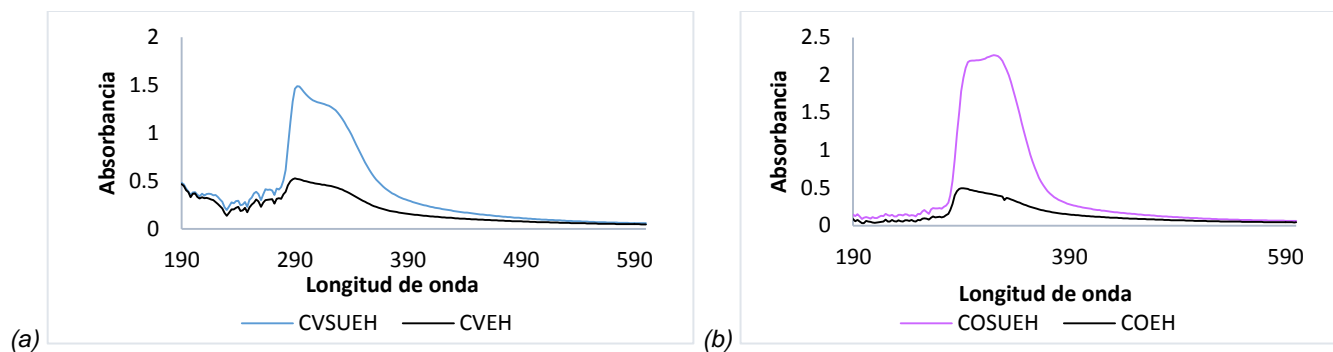


Figura 14. (a) Barridos espectrofotométricos de CVSUEH y CVEH y (b) COSUEH y COEH

En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos en las barridos de absorbancia de CVSUES (café de Veracruz sin usar, extracción por sonicación), CVES, COSUES (café de Oaxaca sin usar, extracción por sonicación) y COES, como puede observarse, los gráficos de CVSUES y CVES muestran un pico entre las longitudes de onda de 270 nm y 374 nm, para COSUEH y COEH se aprecia que tienen un comportamiento similar al obtenido por el café de Veracruz, pero presentan un pico entre las longitudes de onda de 276 y 376 nm. Los 4 tratamientos analizados tienen un pico de absorbancia que abarca las longitudes de onda donde algunos autores reportan que absorben las principales sustancias bioactivas del café (Lallemant y col., 2012; Kim y col., 2008 y López, 2008).

De la Figura 15, también puede resaltarse que los residuos de café, independientemente del origen presentan los compuestos característicos presentes en el café, aunque en menor concentración comparados con el café sin usar, esto era de esperarse dado que son obtenidos de un residuo que fue previamente usado. También puede observarse que el café de Oaxaca presenta una mayor concentración de los compuestos en ambos casos (a partir de residuos de café y de café sin usar), dado que las absorbancias son mayores.

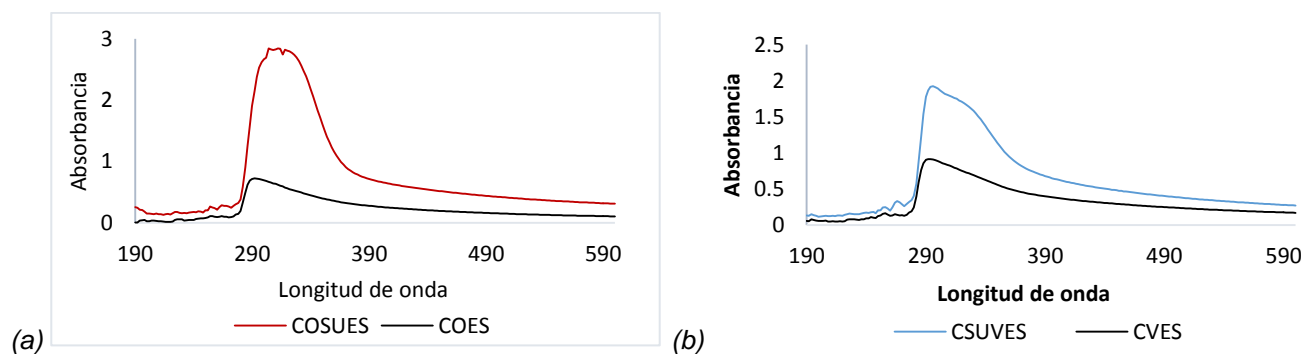


Figura 15. (a) Barridos espectrofotométricos de COSUES y COES (b) CVSUES y CVES

7.2. Cromatografía en capa fina de los extractos

El estudio en cromatografía de capa fina se realizó para caracterizar cualitativamente los extractos de residuos de café, el sistema que se empleó como fase móvil fue diclorometano:metanol y ácido acético glacial en proporciones 8:2, 9:1 y 6:4 y se usaron como reveladores FeCl_3 y DPPH, para identificar la presencia de taninos y actividad antioxidante, respectivamente.

Se realizó la preparación de las diferentes fases móviles en las proporciones antes descritas para determinar si tenían mayor afinidad los compuestos presentes en los extractos por la fase móvil o por la fase estacionaria, también se eligieron de esa manera para saber con cuales proporciones de la fase móvil se obtenía una mejor separación y resolución de las bandas cromatográficas.

Las placas de las muestras de los extractos COES, COEH, CVES, CVEH con fase móvil en proporción 8:2 (diclorometano:metanol) y ácido acético, fueron observadas con y sin revelador. Las placas sin revelador mostraron la presencia de manchas color café, encontrando que las más polares eran más oscuras en comparación con las menos polares, esto concuerda con lo reportado por Cevallos y Guerrero (2017) quienes registran que, en las cromatoplasmas con muestras de extracto de borra de café, existe presencia de bandas color marrón oscuro. Después se revelaron las placas con luz ultravioleta con longitud de onda corta y larga (Figura 16 (a y b)) donde se observa que hubo un arrastre de los compuestos hasta el fin de la placa, sin embargo, hay mayor concentración de los compuestos polares que se encuentran en la parte inferior de la placa.

Por otra parte, la placa cromatográfica que se reveló con FeCl_3 usando el mismo sistema como fase móvil, mostró coloraciones azul negruzco Figura 16 (c), esta coloración nos indica la presencia de taninos pirogálicos (Robles-García y col., 2016) en los extractos COES, CVES, COEH, y CVEH, las bandas positivas para el revelador FeCl_3 se ubican en la parte inferior de la placa por lo que nuestros compuestos de interés son polares y tienen mayor afinidad por la fase estacionaria. También se usó como revelador DPPH, para reconocer actividad antioxidante en los extractos de manera cualitativa, Figura 16(d) en donde es positivo si hay presencia de bandas color amarillo blanquecino (Gu, Wu y Wang, 2009), en la placa se observa para los cuatro extractos esta coloración, desde la parte inferior hasta la parte superior de la placa, lo que indica presencia de compuestos con actividad antioxidante en los extractos.

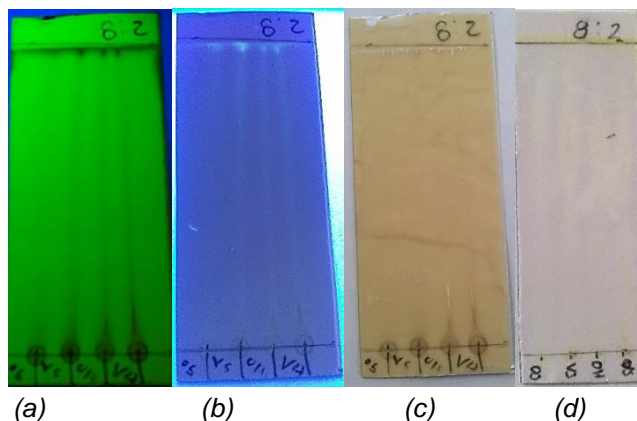


Figura 16. Cromatogramas de los extractos de residuos de café con fase móvil 8:2 diclorometano:metanol y 200 uL de ácido acético glacial, reveladas con luz uv a 254 nm (a), luz uv a 366 nm (b), $FeCl_3$ (c) y DPPH (d).

En el sistema con fase móvil en proporción 9:1 (diclorometano:metanol) y ácido acético, las bandas de interés tuvieron mayor arrastre en la cromatoplaqa, al revelar con luz uv en longitud de onda corta y larga Figura 17 (a) y (b), respectivamente.

Las placas donde se usó como revelador $FeCl_3$ se detectaron taninos en el cromatograma para los extractos COES, CVES, COEH y CVEH, se observaron bandas de color azul negruzco que es positivo para taninos pirogálicos, las bandas se ubican en la parte inferior Figura 17 (c), se reveló con DPPH para la determinación de grupos funcionales con capacidad antioxidante indicando que existe presencia de dicha actividad Figura 17 (d).

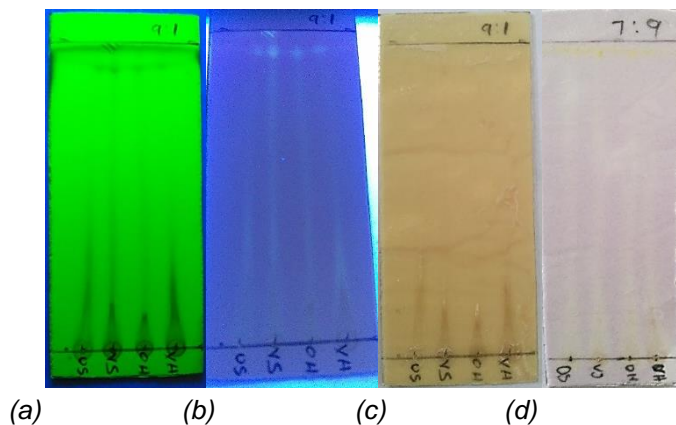


Figura 17. Cromatogramas de los extractos de residuos de café con fase móvil 1:9 diclorometano:metanol y 200 uL de ácido acético glacial, reveladas con luz uv a 254 nm (a), luz uv a 366 nm (b), $FeCl_3$ (c) y DPPH (d).

Finalmente, al usar como fase móvil, en proporción 6:4 (diclorometano: metanol), ácido acético para la cromatografía de capa fina para los extractos COES, COEH, CVES y CVEH se observó al revelar las placas con luz uv de longitud de onda corta y larga Figura 18 (a) y (b), respectivamente, que los compuestos de interés mostraron mayor afinidad por la fase móvil, al obtener un mayor desplazamiento en la placa cromatográfica, situándose en la parte media de la placa.

Al usar FeCl_3 como revelador Figura 18 (c), se observó que fue positivo para la búsqueda de taninos pirogálicos, sin embargo, las corridas de los extractos no fueron tan definidas en comparación con los otros sistemas. De igual manera al revelar con DPPH dio positivo para compuestos con actividad antioxidante, la coloración amarilla blanquecina se observó a lo largo de la placa, Figura 18 (d).

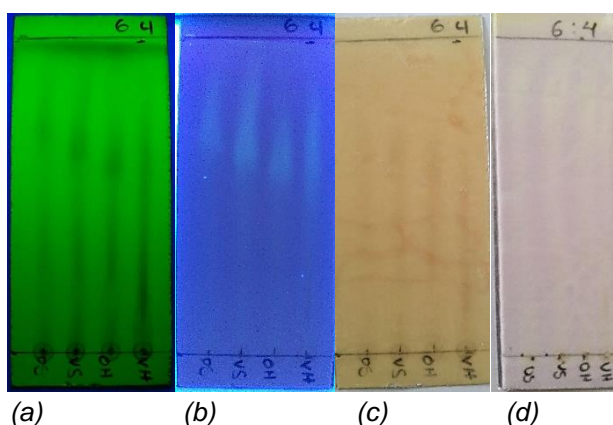


Figura 18. Cromatogramas de los extractos de residuos de café con fase móvil 6:4 diclorometano:metanol y 200 μL de ácido acético glacial, reveladas con luz uv a 254 nm (a), luz uv a 366 nm (b), FeCl_3 (c) y DPPH (d).

Los sistemas 8:2, 9:1 (diclorometano:metanol) y ácido acético dieron mejores resultados en el arrastre de los extractos COES, COEH, CVES, y CVEH, las bandas se observaron más definidas, así mismo en el revelado la detección fue más precisa ya que los compuestos de interés se posicionaron en la parte inferior de la placa debido a su naturaleza polar y afinidad por la fase estacionaria. Mediante ensayos cromatográficos se confirmó la presencia de compuestos fenólicos, y compuestos con actividad antioxidante de manera cualitativa en los extractos COES, COEH, CVES y CVEH.

La técnica cromatográfica usada permitió detectar de manera cualitativa los compuestos químicos. Sin embargo para poder cuantificarlos es necesario el uso de otro tipo de técnicas como Folin Ciocalteu para Fenoles totales y DPPH y ABTS para actividad antioxidante. Por tal motivo se procedió a realizar el análisis con esas técnicas.

7.3. Determinación de Fenoles Totales

En la Tabla 9 se presentan los resultados de fenoles totales de los 4 extractos. Se puede observar que COEH fue el que presentó el mayor valor (0.09 ± 0 mgEAG/g) mientras que COES, CVEH y CVES no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Tabla. 9 Resultados generales para fenoles totales método Folin Ciocalteu y actividad antioxidante con el radical libre DPPH y ABS.

Tratamientos	Fenoles totales mgEAG/g	% de inhibición DPPH	% de inhibición ABTS
COEH	0.09 ± 0^a	34.44 ± 0.15^a	69.26 ± 0.22^a
COES	0.08 ± 0^b	33.65 ± 0.75^a	54.63 ± 0.35^b
CVEH	0.08 ± 0^b	30.88 ± 0.93^b	61.86 ± 0.41^d
CVES	0.08 ± 0^b	31.14 ± 0.34^b	54.48 ± 0^b

Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa con una $P \leq 0.05$

De acuerdo con Cortes y col., (2016) la borra de café en un extracto de agua-ácido clorhídrico tiene un contenido de fenoles de totales 0.82 ± 1.37 mgEAG/g. Díaz (2011) en pulpa de café en un extracto (metanol/acetona) reporta $135,16 \pm 5,51$ mg AG / 100g de pulpa fresca. También Ordoñez-Gómez y col., (2018) reportan que en cáscaras de los siguientes frutos se tienen concentraciones de polifenoles totales por gramo (g EAG/100 g muestra): lima dulce (*C. limetta*) 1.25 ± 0.02 , limón cidra (*C. medica L.*) 0.79 ± 0.02 , limón mandarina (*Citrus x limonia*) 1.43 ± 0.02 , mandarina común (*C. reticulata*) $3.22 \pm 0,05$, naranja valencia (*C. sinensis (L.) sbeck*) 1.40 ± 0.04 , toronja (*C. paradisi Macf*) 3.08 ± 0.03 , los extractos obtenidos de los residuos de café poseen menor cantidad de fenoles totales en comparación con los que reportan Ordoñez-Gómez y col., (2018), Cortez y col., (2016) y Díaz (2016), esto es porque se usaron residuos y la principal extracción de los compuestos ya se había realizado previamente durante la preparación del café. La extracción de compuestos a partir de la borra con ácido como lo reporta Cortes y col., (2016) favoreció la extracción, sin embargo, en esta investigación se usó agua destilada ya que la aplicación del extracto fue dirigida a productos alimenticios y se buscó obtener un producto que no cause efectos perjudiciales a la salud humana.

Por otro lado, Ávila (2009) registró que el contenido polifenólico total de extractos en cloroformo del hongo *Lentinula edodes* es de 0.0633 mg de ácido gálico equivalentes/g de extracto. Muñoz y col., (2007) registra que *Passiflora quadrangularis* o “tumbo costeño” tiene 2.16 mg GAE/100 g. Herrera (2016) reporta que en un extracto de etanol el epicarpio de café tiene 0.713 ± 0.014 mg de ácido gálico/100 g. Los extractos obtenidos de residuos de café poseen mayor cantidad de fenoles totales en comparación con los que reportan Ávila, Muñoz y col., y Herrera.

7.4. Capacidad antioxidante

Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y es de menor costo en comparación con otros métodos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

7.4.1. Capacidad antioxidante por el método DPPH

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante por medio del método DPPH en porcentaje de inhibición se muestran en la Tabla 9. Se aprecia que al comparar el café del mismo origen y con diferente tratamiento, ya sea hidrotérmico o por sonicación no se presentan diferencias significativas, como es el caso para COEH y COES, donde se obtuvo un porcentaje de inhibición de 34.44 ± 0.15 y 33.64 ± 0.75 respectivamente, mientras que CVEH y CVES tuvieron valores de 30.88 ± 0.93 y 31.14 ± 0.34 , respectivamente, de igual manera no tienen diferencias estadísticamente significativas.

Existen en la literatura varios estudios de determinación de actividad antioxidante reportada como porcentaje de inhibición evaluada en diferentes plantas. De acuerdo a Puertas-Mejía y col., (2013) la borra de café colombiano (*Coffea arabica*) en extracto de metanol acidulado tiene un % de inhibición de DPPH de $15,42 \pm 0.83$ y en extracto de etanol:agua tiene 25.95 ± 3.02 . También Herrera (2016) reporta que el epicarpio de café tiene un porcentaje de inhibición en extracto de acetato de etilo de 29% y en extracto de etanol 23%. Repo de Carrasco y col. (2008) determinaron el % de inhibición en extracto de tuna verde, encontrando valores de 34.20%. Los resultados para los extractos realizados en esa investigación presentan un % de inhibición mayor en comparación con los reportados para tuna verde, epicarpio de café y borra de café.

7.4.2. Capacidad antioxidante por el método de ABTS

De la Tabla 9 se observa que el tratamiento COEH es el que presenta un porcentaje mayor de inhibición con 69.26 ± 0.22 , seguido de CVEH que tuvo un porcentaje de inhibición de 61.85 ± 0.41 , mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), mientras que los tratamientos COES y CVES, presentaron un % de inhibición de 54.63 ± 0.35 y 54.48 ± 0 , respectivamente, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Rugiero (2017) reporta que en granos de café verde y tostado se tienen % de inhibición de 32.29 ± 1.24 y 16.35 ± 1.93 , respectivamente, mientras que Figueroa y col. (2011) reportaron que la cáscara de pitahaya posee un porcentaje de inhibición del radical ABTS de 12.17%, siendo así que los extractos de café COEH, COES, CVEH y CVES tienen un % de inhibición mayor que los reportados por Rugiero (2017) y Figueroa y col. (2011).

Se puede observar que se obtuvieron mayores porcentajes de inhibición con el método ABTS que con el de DPPH, para dar una explicación a este hecho, el ABTS tiene que ser generado tras una reacción química, enzimática o también electroquímica a diferencia del DPPH que es un radical comercial. Con el ABTS se puede evaluar la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede ser usado en medio orgánico. El radical ABTS tiene además la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un solo pico de absorbancia a 515 nm (Re et al., 1999; Repo y Encina 2008).

Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH• con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir, un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH• está impedido estéricamente (Brand- Willians y col., 1997).

7.5. Determinación del color del extracto por colorimetría

Los resultados de la evaluación de color se muestran en la Tabla 10, en ella se puede observar que los cuatro extractos fueron evaluados en los atributos de color L*, a*, y b*.

Tabla 10. Coordenadas cromáticas de color de los extractos de residuos de café.

Tratamiento	L*	a*	b*
COEH	76.44 ± 0.70	-1.37 ± 0.09	6.65 ± 0.48
COES	77.09 ± 0.64	-1.23 ± 0.06	5.06 ± 1.41
CVEH	80.14 ± 1.82	-1.20 ± 0.08	7.41 ± 0.37
CVES	75.66 ± 0.01	-1.0 ± 0.02	6.78 ± 0.60

L* son los valores de luminosidad del color, éste va de 0 (negro) a 100 (blanco). De acuerdo al análisis estadístico existen diferencias significativas entre el valor de CVEH al compararlo con los demás tratamientos. Los extractos son diferentes, siendo el extracto CVEH más luminoso que los extractos

COEH, COES y CVES, mientras que éstos últimos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre si, los valores se pueden observar en la Tabla 10.

El parámetro a^* va de verde a rojo ($-a^*$ son tonalidades verdes y $+a^*$ son tonalidades rojas). Los valores de todos los extractos fueron negativos, lo cual indica que existe la presencia de tonalidades verdes. Los resultados muestran que el tratamiento CVES es el menos verde con un valor de -1.0 ± 0.02 , mientras que los tratamientos COEH, COES y CVEH no presentan diferencias significativas.

Por último, en el parámetro b^* , que va de azul a amarillo ($-b^*$ para tonalidades azules y $+b^*$ para tonalidades amarillas), se obtuvieron valores positivos en todos los extractos. Esto indica la presencia de tonalidades amarillas, existiendo diferencia significativa entre los tratamientos CVEH y COES, siendo COES el extracto menos amarillo teniendo un valor de 5.06 ± 1.41 .

Como se observa en la Figura 19 los valores de las tres variables para cada tratamiento fueron graficados en el espacio CIELAB los puntos cayeron donde se ubica el círculo color rojo y corresponden al color café.

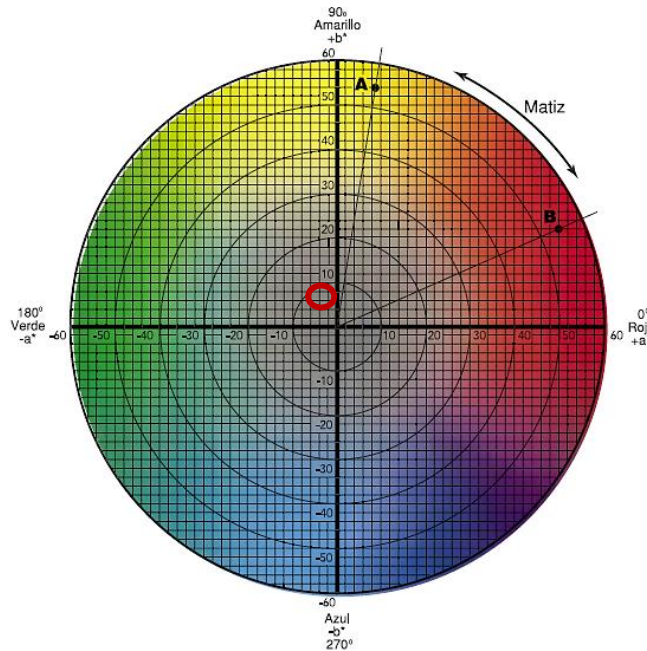


Figura 19. Gráfica de color CIELAB

7.6. Comparación de rendimiento del pigmento

Se prepararon 500 mL de extracto para cada tratamiento, usando 20 g de residuos de café por 100 mL de agua destilada, los extractos obtenidos fueron liofilizados. El rendimiento en peso obtenido tras el liofilizado se calculó a partir de las determinaciones del peso de polvo obtenido, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento en peso} = \left(\frac{\text{gramos obtenidos}}{\text{gramos en la mezcla inicial}} \right) \times 100$$

El pigmento obtenido se pesó y se registró. Los resultados se presentan en la Tabla 11, donde se observa que el mayor porcentaje de rendimiento lo obtuvo el tratamiento COES, seguido de COEH.

Tabla 11. Rendimiento del pigmento obtenido de residuos de café.

Rendimiento de pigmento	
Tratamiento	% de rendimiento
COES	3.73
COEH	3.71
CVES	3.27
CVEH	3.64

Cevallos y Guerrero (2017) reportan que, usando 64 g de borra de café, obtienen un rendimiento de 10.15% debido a que hicieron previamente un lavado con etanol, y después de dicho proceso se realizó la lixiviación con cloroformo. En este trabajo sólo se utilizó como disolvente agua destilada, por ello se obtiene menor cantidad del pigmento, esto es debido a que va dirigido a productos alimenticios y se buscó evitar el uso de disolventes tóxicos.

Con base en los resultados obtenidos de las pruebas fitoquímicas, los extractos hidrotérmicos de residuos de café de Oaxaca presentaron los mejores resultados en cuanto a contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante por los dos métodos (DPPH y ABTS). Con respecto al rendimiento, también fue uno de los que presentaron los valores más altos. Con base en lo anterior se decidió usar los COEH para su posterior aplicación en productos alimenticios (yogurt y leche).

7.7. Comparación de los resultados de pruebas fitoquímicas de residuos de café y café sin usar

Este análisis se desarrolló con la finalidad de saber cuál era la cantidad de fenoles totales, así como el % de inhibición presente en el café antes de usarse y cuál era la cantidad que se conservaba en los residuos de café.

De acuerdo con las pruebas fitoquímicas realizadas, el contenido total de fenoles se recoge en la Tabla 12. La cantidad de fenoles totales en COSUEH y COEH es de 0.44 ± 0.01 y 0.09 ± 0.0 mgEAG/g, respectivamente, donde se observa que COSUEH presenta mayor contenido de fenoles totales, de manera que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 12. Determinación de fenoles totales (FT) y actividad antioxidante (% de inhibición) en extractos hidrotérmicos de café de Oaxaca sin usar (COSUEH) y residuos de café de Oaxaca (COEH) aplicando los métodos DPPH, ABTS.

Muestras	Fenoles Totales mgEAG/g	DPPH % de inhibición	ABTS % de inhibición
COEHSU	0.44 ± 0.01	91.03 ± 0.0	99.16 ± 0.0
COEH	0.09 ± 0.0	34.44 ± 0.14	69.26 ± 0.21

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por los métodos indicados (Tabla 12) se han expresado en % de inhibición para ambas muestras de café, de las muestras de COEH y COSUEH, se encuentran valores de 91.03 ± 0.0 y 34.44 ± 0.14 , para el ensayo de DPPH, 99.16 ± 0.0 y 69.26 ± 0.21 para el ensayo de ABTS, respectivamente. De igual manera en ambos ensayos entre los tratamientos se encuentran diferencias estadísticamente significativas con un nivel de 95.0% de confianza, en donde COSUEH presenta un mayor % de inhibición, sin embargo, es notorio que los residuos de café conservan un fracción importante de sustancias bioactivas con actividad antioxidante.

Se sabe que después del proceso de torrefacción de los granos de café, se afecta marcadamente su composición, lo que puede reducir la actividad antioxidante, debido a la degradación de los ácidos clorogénicos, sin embargo la actividad antioxidante se puede preservar debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard, melanoidinas pues estas presentan actividad antioxidante (Budryn y col., 2009) o bien hay otros constituyentes del café involucrados en esta actividad biológica (Duke, 2009). Por todo lo anterior, a pesar de que la presencia de fenoles es baja en los residuos de café se sigue preservando una capacidad antioxidante alta.

7.8. Evaluación del poder tintóreo del pigmento y determinación del color en yogurt por colorimetría

Al yogurt se le adicionó el pigmento liofilizado de residuos de café (*Coffea arabica*). Posteriormente se agitó suavemente hasta lograr la completa homogeneización. Las concentraciones aplicadas fueron M468: 0%, usándolo como blanco, M277: 1% y M019: 2% (Figura 20).

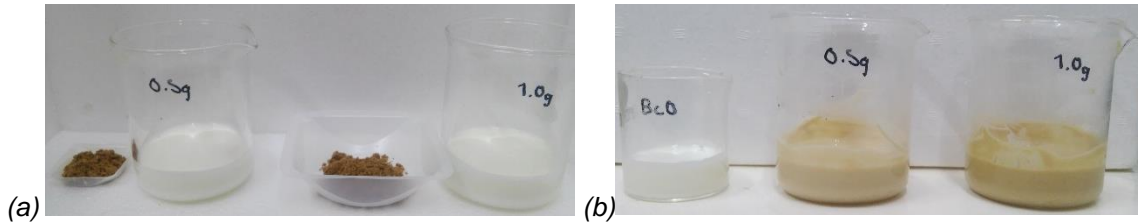


Figura 20. Prueba del colorante en yogurt natural (a) muestra el yogurt antes de agregar el pigmento y (b) muestra el yogurt después de agregar el pigmento.

Los resultados del análisis de color del yogurt M468, M277 y M019 se resumen en la Tabla 13. Se aplicó una prueba de comparación de rangos múltiples para determinar las diferencias significativas entre las variables L^* , a^* y b^* .

Tabla 13. Coordenadas cromáticas de color en yogurt.

Tratamiento	L^*	a^*	b^*
M468	88.94±0.74 ^a	-2.20±0.04 ^a	1.48±0.38 ^a
M277	71.23±0.14 ^b	0.99±0.09 ^b	16.28±0.07 ^b
M019	63.89±0.37 ^c	3.6±0.02 ^c	18.46±0.02 ^c

En relación con el índice de L^* , que mide luminosidad (blanco / negro), se obtuvo que los tratamientos M468, M277 y M019 presentan diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95.0% para la variable L^* , donde el yogurt más luminoso es M468, como era de esperarse dado que es el yogurt al cual no se le agregó nada, seguido de la mezcla M277 y se encontró que los valores más bajos de L^* , corresponden al tratamiento M019.

También el análisis estadístico muestra que para la variable a^* (verde/rojo) en el análisis de comparación se encuentran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de yogurt, M468 tiende a valores color verde, mientras que M277 y M019 tienen valores positivos, lo que quiere decir que hay presencia de tonalidades color rojo. Se observa que a mayor contenido del pigmento mayor será el índice a^* .

Por otra parte, para b^* (azul/amarillo) se observa que las mezclas de yogurt presentan diferencias estadísticamente significativas, los valores de M468, M277 y M019 son positivos, es decir hay presencia de tonalidades color amarillo, siendo el menos amarillo el yogurt M468 y el más amarillo M019 esto se debe a que la concentración del pigmento en este tratamiento es mayor.

7.8.1. Medición de pH en yogurt

Se midió el pH de los 3 tratamientos (M468, M277 y M019) con ayuda de un potenciómetro (Figura 21). La adición del pigmento en el yogurt afecta su pH, en la Tabla 14 se aprecia que existe una variación del pH. M019 presentó el valor más alto seguido de M277 y M468, respectivamente.



Figura 21. Medición de pH del yogurt (a) M468, (b) M277 y (c) M019.

Schimidt y col., (2012) señalan que el intervalo de pH entre 4.0 y 4.4 se considera el más cercano a lo ideal para yogurt de leche de vaca, ya que el producto en este intervalo de pH no presenta un sabor demasiado agrio o amargo. De acuerdo a lo presentado por el autor citado, se concluye que el yogurt elaborado tuvo variaciones dentro de lo normal para este tipo de productos.

Tabla 14. Medición de pH.

Medición de pH	
M468	4.09
M277	4.16
M019	4.25

El pH obtenido en el yogurt con el pigmento obtenido a partir de residuos de café de acuerdo a la literatura se encuentra dentro del intervalo del pH ideal para el yogurt. Por otro lado, Marín y Mejía (2012) adicionaron al yogurt un colorante extraído de flor de Jamaica registrando un pH de 2.0. Por lo tanto, podemos concluir que el pigmento obtenido a partir de residuos de café con aplicación en yogurt presentó mejores resultados en comparación con el pigmento obtenido de flores de Jamaica.

7.8.2. Análisis sensorial de yogurt

Al finalizar el proceso de elaboración de yogurt natural con la adición de pigmento de residuos de café. Las muestras fueron presentadas a los jueces en condiciones homogéneas, en recipientes idénticos y codificadas con claves de cuatro dígitos tomadas de una tabla de números aleatorios (Figura 22).



Figura 22. Yogurt con diferentes dosis de pigmento de residuos de café.

La información fue registrada en hojas de degustación diseñadas para la evaluación de cuatro variables: olor, color, sabor, y textura para yogurt, en un panel con 20 degustadores no entrenados (Figura 23).



Figura 23. Prueba sensorial de yogurt

En la Tabla 15 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de nivel de agrado, para cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 15. Valores obtenidos en la prueba sensorial

Código	Olor	Color	Sabor	Textura
M468	125±1.16	139±1.82	128±1.64	140±1.38
M277	137±1.23	138±1.21	120±1.69	145±1.12
M019	136±1.70	132±1.79	106±1.84	134±1.53

Como se observa en la Tabla 15 para cada tratamiento se sumaron las calificaciones para cada atributo, se observó que M277 obtuvo puntuaciones más altas en olor y textura, en los atributos de color y sabor destaca el tratamiento M468, mientras que el tratamiento M019 tuvo menos aceptación por los panelistas obteniendo las puntuaciones más bajas en los cuatro atributos. Se observa que el tratamiento M277 obtuvo el segundo lugar en puntuaciones en color y sabor, así que se concluye que en general la adición del pigmento obtenido al yogurt natural en una concentración de 1% tiene una aceptación favorable.

En la Figura 24 se muestra el gráfico de araña en donde se presentan los resultados obtenidos en la prueba hedónica para olor, color, sabor y textura para yogurt; donde cada línea representa un tratamiento, M468 línea azul, M277 línea color rojo y M019 línea rosa. M277 alcanza los puntos más altos en olor y textura, M468 tiene el puntaje más alto en los atributos de color y sabor. Y M019 obtiene las puntuaciones más bajas en las variables color, sabor y textura.

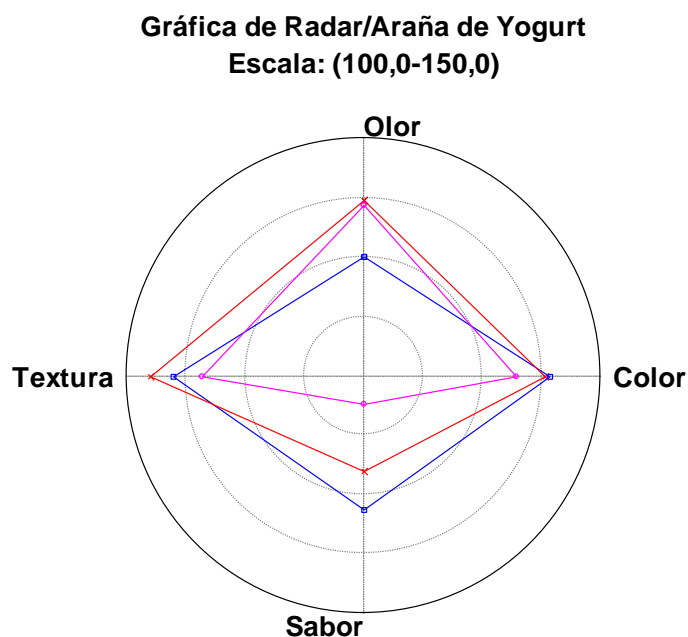


Figura 24. Comparación de perfil sensorial en yogurt M468, M277 y M019 (línea color azul, rojo y rosa, respectivamente).

Con base en el análisis sensorial del yogurt, el pigmento obtenido a partir de residuos de café además de conferir color al yogurt, tener actividad antioxidante, también proporciona sabor por lo que se podría usar como un saborizante.

Para evaluar la aceptabilidad del producto, se tomó en cuenta la puntuación final promedio de los cuatro atributos para los tres tratamientos, en donde de acuerdo a la Figura 25, el tratamiento M277, al cual se

le añadió 1% del pigmento de residuos de café tuvo la puntuación más alta, seguido del tratamiento M468 y finalmente el que obtuvo una menor aceptabilidad fue el tratamiento M019 al cual se le agregó 2%, de acuerdo a los comentarios colocados en las hojas de evaluación, este tratamiento presentó una marcada acidez por lo que los panelistas sugirieron agregar una mayor cantidad de azúcar o reducir la cantidad del pigmento.

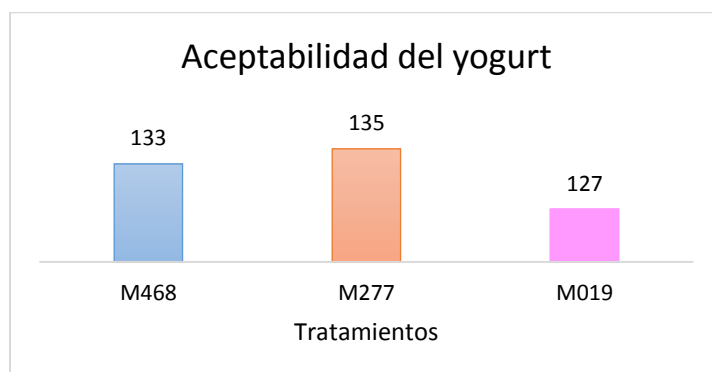


Figura 25. Aceptabilidad del yogurt.

Narváez (2015) concluye en su proyecto que el colorante obtenido del fruto de Evilán (*Monnina spp*) presenta características óptimas para ser utilizadas como colorante en yogurt de mora, al agregar una concentración del 4% de colorante de Evilán (*Monnina spp*) en yogurt natural. Por otro lado, Marín y Mejía (2012) reportan que el pigmento del tipo antocianina contenido en la flor de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*), al agregarlo en yogurt, alteró el sabor tornándose amargo y mucho más ácido, y el olor se modificó significativamente, dando como resultado un producto incomedible. Con base en los resultados obtenidos en la prueba de evaluación sensorial podemos decir que el pigmento agregado en yogurt en una concentración de 1% tuvo una buena aceptabilidad entre los panelistas por lo que dicho pigmento podría tener una potencial aplicación en yogurt.

7.9. Preparación de leche adicionando pigmento obtenido

Previamente se hicieron pruebas en leche del poder tintóreo del pigmento obtenido. Se determinó que 0.6% de pigmento brindaba una tonalidad similar a la de la leche comercial sabor café.

7.9.1. Determinación del color en leche saborizada por colorimetría

Los valores para las variables L^* , a^* y b^* se resumen en la Tabla 16. El análisis estadístico, muestra que la variable de luminosidad (L^*) se observó entre los tratamientos M007 (leche adicionada con el

pigmento) y M025 (leche de café comercial) que no existen diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, el valor de la variable a^* en los dos tratamientos es negativo, por lo que tiende a tonos color verde, sin embargo, existen diferencias significativas entre los tratamientos, resultando uno más verde que el otro. Finalmente, en la variable b^* los valores son positivos para los tratamientos, por lo cual tienden a tonos color amarillo, entre los tratamientos M007 y M025 no existen diferencias significativas para a^* .

Tabla 16. *Coordenadas cromáticas de color en leche.*

Tratamiento	L^*	a^*	b^*
M007	71.31±1.9 ^b	-0.75±0.2 ^b	15.78±1.0 ^b
M025	69.34±0.6 ^b	-0.31±0.2 ^c	18.17±1.9 ^b

7.9.2. Medición de pH en leche adicionada con el pigmento

Se midió el pH de la leche sin tratamiento, M007 y M025 con ayuda de un potenciómetro. La adición del extracto de café liofilizado como saborizante a la leche afecta su pH, en la Tabla 17 se observan las lecturas de pH, donde el valor de pH fue menor para el tratamiento M007, de acuerdo con Carpio (2001) el pH de la leche normal es de 6.5 – 6.7, tomando en cuenta este dato la leche sin tratamiento y M025, entran en el intervalo, cuando se adiciona un saborizante a algún alimento se espera que no se modifique de manera significativa el pH. Por lo tanto, se puede asumir que el pH de la leche saborizada debe ser el mismo.

Tabla 17. *Lectura de pH de la leche saborizada.*

Medición de pH	
Tratamiento	pH
Leche sin tratamiento	6.7
M007	6.4
M025	6.5

7.9.3. Prueba hedónica de leche adicionada con el pigmento y comparación con leche de café comercial

En la prueba sensorial, las muestras de leche se presentaron en recipientes iguales, debidamente etiquetados Figura 26.

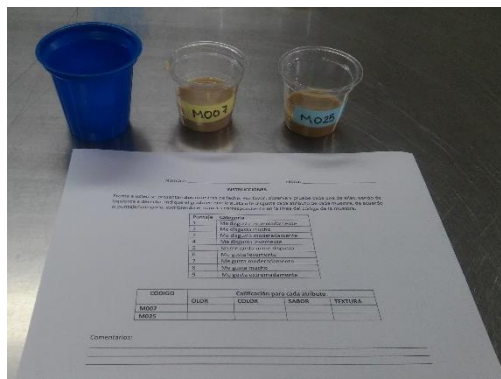


Figura 26. Muestras de leche pigmento de residuos de café.

Al finalizar el proceso de la preparación de leche con la adición del pigmento obtenido, se procedió a registrar la información de las variables de color, color, sabor y textura mediante cuestionarios de degustación diseñados para un análisis sensorial para leche saborizada, con un panel de 10 degustadores no-entrenados para cada tratamiento (Figura 27).



Figura 27. Análisis sensorial de leche con pigmento de residuos de café.

Se realizó la prueba de perfil sensorial, los resultados se muestran en la Figura 28. La línea azul corresponde a la muestra M007 que a su vez pertenece a la leche adicionada con el pigmento obtenido de los residuos de café mientras que la línea roja representa a la leche comercial. Las diferencias obtenidas en relación con los atributos de la leche comercial y la leche con el pigmento obtenido de residuos de café como saborizante se pueden observar fácilmente en la Figura 28. A diferencia de los

resultados obtenidos para el yogurt, la leche con el pigmento no fue muy bien recibida por los panelistas. La leche comercial presentó mayor puntuación en los cuatro atributos evaluados. Esto puede deberse a que el pigmento obtenido en el laboratorio generó un sabor perceptiblemente ácido a la leche. Cabe mencionar que la leche de manera natural tiene un pH cercano a la neutralidad a diferencia del yogurt que presenta un pH considerado medianamente ácido. Por este motivo, la leche con sabor ácido no resulta atractiva para el consumidor.

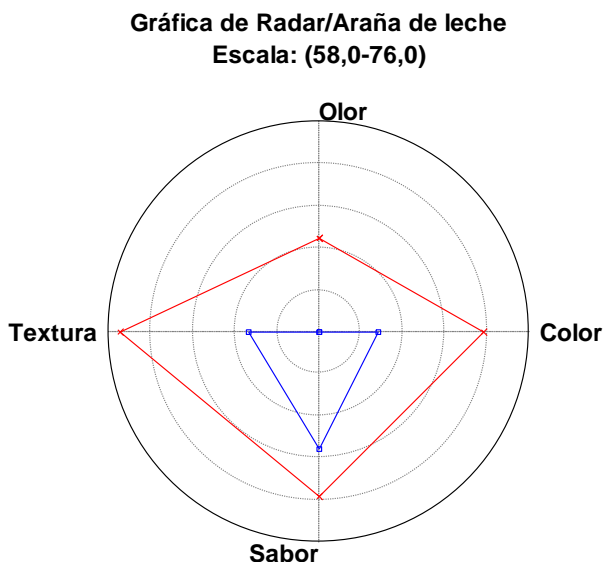


Figura 28. Comparación de perfil sensorial en leche M007, y M025 (línea color azul, rojo, respectivamente).

Para evaluar la aceptabilidad del producto, se tomó en cuenta la puntuación final promedio de los cuatro atributos para las dos muestras de leche saborizada, en donde de acuerdo a la Figura 32, la leche M025, obtuvo mayor puntaje en comparación a la leche M007. La leche comercial presentó valores más altos en todos los atributos.

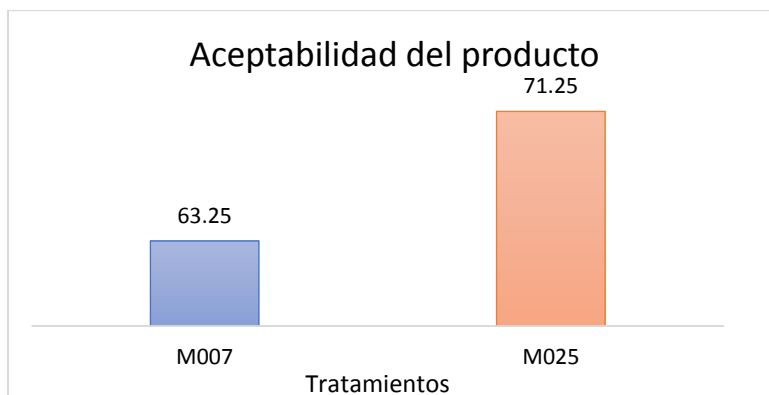


Figura 29. Comparación de la aceptabilidad de la leche adicionada con el pigmento y la leche comercial

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

8.1. Conclusiones

Se logró la utilización de los residuos de café y se extrajeron compuestos bioactivos. Los resultados arrojados por la presente investigación ponen de manifiesto que la extracción hidrotérmica, empleando como disolvente agua destilada, es el método más conveniente para la obtención de los compuestos fenólicos de los residuos de café estudiados.

Los extractos obtenidos a partir de los residuos de café presentan actividad antioxidante independientemente del método de extracción utilizado.

El yogurt adicionado con 1% de pigmento obtenido a partir de residuos de café presenta características sensoriales aceptables en cuanto a sabor, olor, color y textura. Lo que lo convierte en un pigmento con potencial aplicación en este tipo de productos.

El pigmento obtenido modifica de manera negativa las características sensoriales de la leche, provocando que no haya una buena aceptación por parte del consumidor.

El pigmento obtenido de residuos de café es una buena alternativa como fuente natural de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante. La obtención del pigmento para productos alimenticios a partir de residuos de café, es una alternativa para el aprovechamiento de este desecho orgánico, que a la vez permite fomentar el uso de colorantes naturales como aditivos en alimentos.

CAPÍTULO 9

RECOMENDACIONES

9.1. Recomendaciones

- Realizar investigaciones similares, para determinar en que otro alimento se puede utilizar el pigmento obtenido de residuos de café.
- Realizar un estudio de la vida útil del yogurt al adicionarle el pigmento de residuos de café con una cámara de vida de anaquel.
- Probar diferentes concentraciones del pigmento obtenido de residuos de café en yogurt
- Probar diferentes concentraciones de azúcar para equilibrar la acidez en el yogurt y leche o bien evaluar en la formulación de los productos el uso de diferentes azúcares o edulcorantes
- Realizar más estudios sobre los compuestos antioxidantes presentes en los residuos de café para implementarlos como aditivos alimenticios.

CAPÍTULO 10 REFERENCIAS

- Aerts, J. Baumann, W. (1994). Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings Journal of Experimental Botany 45(273): 497-503.
- Agudelo, A. y R.A. (2002). Obtención de etanol a partir de la borra de café. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y arquitectura. 120 p. Trabajo de grado de Ingeniero químico.
- Aguilar, A. y Chávez, J. (2013). *Obtención y análisis de colorantes naturales a partir de hojas de Manguifera indica L. (Mango) y Coffea arabica L. (Café)* [Tesis de ingeniería]. Antigua Guatemala: Universidad "Dr. José Matías Delgado", Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola "Julia Hill de O' Sullivan".
- Aguilar, C. (2013). Alternativas Actuales para el Manejo Sustentable de los residuos de la industria del café en México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, núm. 10, pp. 33-40.
- Albano, E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the Nutrition Society*, núm. 65, pp. 278–290.
- Amorim H. V, Malavolta E., Teixeira A., Cruz V. F., Melo M., Guércio M. A., Fossa E., Breviglieri O., Ferrari S. E. y Silva D. M. (1973). Relationship between some organic compounds of Brazilian green coffee with the quality of the beverage, pp. 113-127.
- Antiasarán, I.; Martínez, J.; Muñoz, M. (2000). *Alimentos: composición y propiedades*, McGraw-Hill, ES, pp. 239-249.
- Arad, S. y Yaron, A. (1992). "Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics", *Trends Food Sci. Technol.*, 3(4):91.
- Arnous, A.; Makris, D.; Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.*, 15, 655-665.
- Avendaño, G. y Acevedo, B. (2014). "Microencapsulación de colorantes naturales presentes en la fresa (*Fragaria vesca*)". *AVANCES Investigación en Ingeniería*, núm. 1, pp. 76-82.

- Ávila, I. (2009). Estudio de los compuestos polifenólicos, con énfasis en flavonoides, del hongo *Lentinula edodes* y determinación de la actividad antioxidante [Tesis de Magister]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
- Badui, S. (1993) Química de los Alimentos. Pearson Education, México, pp. 736.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Bai. (2018). Extraída el 20/III/2018 desde: <http://www.drinkbai.com>
- Belén. (2013). Compuestos fenólicos – vía del ácido shiquímico. pdf. Extraída el 12/V/2018 desde: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/fitoquimicafbfq/57932178.COMPUESTOS%20FEN%C3%93LICOS.pdf>.
- Belmonte, J. y Arroyo, I. (2016). “Colorantes artificiales en alimentos”. Revista Naturaleza y Tecnología, núm. 10, pp. 24-38.
- Brand-Williams W., Cuveller ME., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensonWissTechnol – Food Science and Technology*. 25-30.
- Britton, G. (1999). “Pigments in foods. More than just colours”, *Proc. 1st Int. Cong. Pigments in Foods*. Sevilla, España.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsddek, A., Zyzelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S. y Janda, B. (2009). Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *European Food Research and Technology*, núm. 228, pp. 913–922.
- Butterfield, A., Perluigi, M. y Sultana, R. (2006). Oxidative stress in Alzheimer’s disease brain: new insights from redox proteomics. *European Journal of Pharmacology*, núm. 545, pp. 39–50.
- Calle, V. (1997) “Subproductos del café”. Chinchiná: Cenicafé. 84 p. Boletín técnico No. 6

- Cano, A. (2011). “*Extracción y uso de tres pigmentos naturales a partir de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.), Mortiño (Vaccinium mytillus L.) y Mora de castilla (Rubus glaucus) como alternativa colorante natural para alimentos*” [Tesis de ingeniería]. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida.
- Carmona, I. (2013). “De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria”. *Agrimundo Inteligencia Competitiva para el sector Agroalimentario*, núm. 5, pp. 1-6.
- Carpio, L. (2001). Factores asociados a la adulteración comercial de leches y yogures en Guayaquil [Tesis de doctorado]. Ecuador: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas.
- Cenzano I. 1994. Color y Colorantes. *Nuevo Manual de Industrias Alimentarias*, Madrid, pp. 47-52.
- Cevallos, J. y Guerrero, C. (2017). *Extracción y caracterización de colorante natural a partir de la borra de café* [Tesis de ingeniería]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(suppl.): 223S- 229S.
- Chipault J.R. (1962). Antioxidants for food use. In Lunderberg WO. *Autoxidation and antioxidants*, Wiley, New York, 477-542.
- Chuchuca, G.; Dick A. y Peñafiel J. (2012). *Implementación y validación de una metodología económica para la medición de color aplicada en alimentos* [Tesis de licenciatura]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción.
- Cinza-Borelli, R., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M. y Forglano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50:6527-6533.
- Clarke, J.; Macrae, R. (1985). *Coffee*. Vol. 1. Chemistry. Inglaterra: Elsevier Applied Science Publisher, 306p.
- Clarke, J.; Vitzthum, G. (2001). *Coffee recent developments*. Inglaterra: Blackwell Science. 257p.

- Clarke, R.J., Macrae, R. (1985). *Coffee*. Volume 1, Chemistry. Ed: Elsevier Applied Science, London and New York. England, pp.1-25.
- Clifford, N. (1985). Chlorogenic acids. In: Clarke, R.J.; Macrae, R. (Eds.).*Coffee: Chemistry*. London, Elsevier Applied Science Publishers, pp. 153-202.
- Clifford, N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3): 362-372.
- Clifford, N., Kazi, T., Surucu, B., Kuhnert, N. (2006). Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in Green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6): 1957-1969.
- Codex Alimentarius (2011). *Leche y productos lácteos*. Segunda edición. Viale delle terme di Caracalla, Roma, pp. 1-259.
- Corro, G., Paniagua, L., Pal, U., Bañuelos, F. y Rosas, M. (2013). Generation of biogas from coffee-pulp and cow-dung codigestion: Infrared studies of postcombustion emissions. *Energy Conversion and Management*, 74, 471-481.
- Cortes, S.; Ortiz, A. y Stella, L. (2016). Determinación de antioxidante en subproductos de café producido y comercializado en Risaralda (Colombia). Universidad de Colombia, pp.1-8.
- Davidson, M. y Duchon, R. (2007). Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circulation Research*, núm. 100, pp. 1128–1141.
- Del Castillo, A. (2002) Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Agric. And food chemistry*. 50: 3698-3708.
- Díaz, A. (2011). *Pulpa de café: Coffea arabica L.: como fuente alternativa de antioxidantes*. [Tesis]. Universidad técnica particular de Iona. Iona-Ecuador.

- Díaz, M. y Elías, G. (2009). *Propuesta para la obtención de un colorante natural a partir de la pulpa seca del Coffea arabica (café)* [Tesis de licenciatura]. El salvador: Universidad del Salvador Facultad de Química y Farmacia.
- Doria E., Buonocore D., Focarelli A., Marzatico F. (2012). Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volumen 2012: pp. 1-13.
- Duke JA. Phytochemical and ethnobotanical databases chemicals in: *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) – Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/duke/>. Fecha de acceso: 14 de Marzo del 2018.
- Espinoza, A. y Zapata, L. (2010) Estudio de leches saborizadas-Presentación 200 mL. Chile: Organización de Consumidores y Usuarios (ODECU).
- Farah, A y Donangelo, C. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1): pp. 23-26.
- Figueroa R., Tamayo J., González S., Moreno G. y Vargas L. (2011). “Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*)”. *Revista Iberoamericana de Tecnología*. Vol. 12. 44-50.
- Figura, O., Teixeira, A. (2007). *Food Physics: Physical Properties, Measurement and Applications*. Heidelberg, Springer-Verlag, Berlin, New York.
- Francis, F. (1999). “Colorants”, en *Practical Guides for the Food Industry*. American Association of Color Chemists. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.
- Francis, F.J. (1999). “Colorants”, en *Practical Guides for the Food Industry*. American Association of Color Chemists. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.
- Franco, M. (2004). *Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de jiotilla (Escontria chiotilla) una cactácea subexplotada*. [Tesis de maestría en biotecnología]. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F.

- Fujioka, K. y Shibamoto, T. (2006). Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, núm. 54, pp. 6054–6058.
- Gandhi, S. y Wood, W. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, núm. 14, pp. 2749–2755.
- Gaona, G. (2017). *Análisis sensorial para la determinación de los niveles aceptables de colorante y saborizante en el yogurt* [Tesis de ingeniería]. Machala: Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud.
- García Martínez, Eva. (2003). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, ETSIAMN. Universitat Politècnica de València.
- García-Muñoz y Riaño-Luna. (1999). "Extracción de celulosa a partir de la borra de café". *Cenicafé* 50(3), pp. 205-214.
- Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. (en línea). Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Consultado 10 de Mayo 2018. Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF's/v13n3/v13n3a2.pdf>
- Ginz, M.; Balzer, H.; Bradbury, G.; Maier, G. (2000). Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *Alemania: European Food Research and Technology* 211:404-410.
- Giusti, M.M.; Wrolstad, R. E. (2001). Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Anal. Chem.*, Wrolstad, R.E., E.; John Wiley & Sons: New York.
- Gómez, M. (2013). Práctica no. 6. Cromatografía en capa fina. *Manual de Prácticas Química Orgánica I*.
- González, A., Vicente, I. (2007). *El color en la industria de los alimentos*. Editorial Universitaria. La Habana.

- González, J., Muñiz, R., y Valls, B., (2001). Alimentos Funcionales. *Nutrición hospitalaria*. 84-91.
- Gordon, M. (2001). El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Zaragoza: Ed. Acribia, pp. 7-21.
- Gutteridge, J. (1993). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*; 41:1819-1828.
- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.*, 307: 108-112.
- Herrera, F. (2016). *Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (Coffea arabica L.) empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial* [Tesis de ingeniería]. Bogotá: Universidad Libre: Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Ambiental.
- Herrero, M. y Romero de Ávila, D. (2006). "Innovaciones En el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas". *Rev. Med. Univ. Navarra* 50(4): 71-74.
- Hurtado, P., Jurado, B., Ramos, E., y Calixto, M. (2015). "Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano)". *Rev Soc Quím Perú* 81(3), pp. 283-291.
- Hwang, E. S. y Bowen, P.E. (2007). DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, núm. 47, pp. 27-50.
- Illy, A.; Viani, R. (2005). *Espresso coffee: the science of quality*. Ámsterdam: Elsevier, 398 pp.
- Jackman, L. y Smith, L. (1996). "Anthocyanins and betalains", en *Natural Food Colorants*, Ed. Por G.A.F. Hendry y J.D. Houghton. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Escocia.

- Julkunen-Tiito, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 33 No.2, 1985, 213-217 pp.
- Katalinic V., Modun D., Music I., Boban M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6- sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; 140: 47-52.
- Kim, D-O.;Lee, K.W.;Lee, H.J.;Lee, C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3713-3717 pp.
- Kim, J. Lee, Y. (2008) "Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction". *Food Chemistry* 108 582-592.
- Kostenberg, D., Marchaim, U., Watad A., y Epstein, E. (1994). Biosynthesis of plant hormones during anaerobic digestion of instant coffee waste. *Plant growth regulation* 17:127-132.
- Kroon, A., Williamson, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives, núm. 79, pp. 355:361.
- Lallemand, L., Zubieta, C., Soon Goo Lee, Wan, Y., Acajjaoui, S., timmins, J., McSweeney, S., Jez, J., McCarthy y McCarthy, A. (2012). A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in coffee. *Plant Physiology*, Vol. 160, pp. 249–260.
- Lock, O. (1997). "Colorantes naturales". Perú: Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica de Perú.
- López, J. (2008). *Cuantificación de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)* [Tesis de licenciatura]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.
- López-Martínez L., García-Galindo H. (2010). Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia Revista de Investigación de la Universidad De La Salle Bajío*. Vol. 2. No. 3. Versión On-line

- Marco G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, pp. 594-598.
- María, C.A.B. DE; Moreira, R.F.A. (2004). Métodos para análisis de ácido clorogénico. *Química Nova* 27(4): pp. 586-592.
- Marín, S. y Mejía, C. (2012). *Extracción de colorante a partir de la flor de jamaica* [Tesis de ingeniería]. Nicaragua: Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería Química.
- Miller NJ. (1998). Nonvitamin plasma antioxidants. In: Armstrong D [Ed]. Free radical and antioxidant protocols. New Jersey: Humana Press, pp. 285-297.
- Moreira, A., Trugo, C., De María, A., Matos, G., Santos, M. y Leite, M. (2001). Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51(1): 95-99.
- Moreno, R. (2004). "Colorantes naturales". Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. Extraída el 10/V/2018 desde <http://www.raulalberto.tripod.com.co/paginadealimentos/id57.html>
- Morishita, H., Ohnishi, M. (2001). Chlorogenic acids, pp. 919-953. *In: Rahman A-U (ed). Studies in natural products chemistry. Volume 25. Elsevier.*
- Muñoz, A.; Ramos-Escudero, D.; Alvarado-Ortiz, C. y Castañeda, B. (2007). "Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos". *Rev Soc Quím Perú*, Nº 3, pp. 142-149.
- Murkovic, M.; Derler, K. (2006). Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Inglaterra: Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, p. 25-32.
- Murthy, P. S. y Madhava, M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., y Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173–179.

- Namiki M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29, 273-300.
- Narváez, L. (2015) *Obtención del pigmento natural del fruto de Evilán (Monnina spp) para su uso como colorante en yogurt* [Tesis de Ingeniería]. Ecuador: Universidad Politécnica Estatal Del Carchi: Facultad De Industrias Agropecuarias Y Ciencias Ambientales, Escuela De Desarrollo Integral Agropecuario.
- Noonan, J. (1980). Color Additives in Food. En CRC Handbook of additives, Furia, T. CRC Press, Boca Ratón, USA, pp. 587-615.
- Nursten, H. (2005). The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and Implications. Inglaterra: Atheneuym Press Ltd, 214 p.
- Ojha H, Mishra K, y Chaudhury, K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *FoodChemistry*, pp. 1036-1043.
- Ordoñez-Gómez, E.; Reategui-Díaz, D. y Villanueva-Tiburcio, J. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria* 9(1): pp. 113 – 121.
- Page H., Salmon A., Leiser S., Robb E., Brown M., Milter R., Stuart J. (2009). Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*; 46: 1109-1118.
- Parr, J., Bolwell, P. (2000). Phenols in the plant and in the man. The potential for posible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7):985-1012.
- Penckofer, S., Schwertz, D. y Florczak, K. (2002). Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants. *Journal of Cardiovascular Nursing*, núm. 16, pp. 68–85.
- Perez, P. y Pérez de Alejo, J. (2009). Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cubana Med Milit.* Vol 29, pp. 192-198.

- Perrone D, Farah A, Donangelo M. (2012). Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *J. Agric. Food Chem.* Apr 10; 60 (17): 4265-4275.
- Peterson, L. (1979). Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*, Vol.100 No.2, 201-220.
- Puerta, G. (2011). Composición química de una taza de café. *Avances Técnicos Cenicafé*, pp. 1-12.
- Puertas-Mejía, M.; Villegas-Guzmán, P. y Rojano, B. (2013). “Borra de café colombiano (*Coffea arabica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres *in vitro*”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, núm. 3 pp. 469-478.
- Quintanar, M.; Calderón, J. (2009). “La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones”. *Revista de Educación Bioquímica*, vol. 28, núm. 3, septiembre, 2009, pp. 89-101.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto N° 977/96, actualizado en Abril de 2009.
- Repo de Carrasco R., Encina Zelada C. R. (2008). “Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas”. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. Versión impresa ISSN 1810-634X. SciElo Perú.
- Repo, R. y Encina, C. (2008). Determinación de la actividad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev. Soc. Quím. Perú* 74:108-124.
- Rey, D. y Vargas, C. (2009). *Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica de extractos de Amanita muscaria* [Tesis de licenciatura]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

- Robles-García, M.; Aguilar, A.; Gutiérrez-Lomelí, M.; Rodríguez-Félix, F.; Morales-Del-Río, J.; Guerrero-Medina, P.; Madrigal-Pulido, J. y Del-Toro-Sánchez, C. (2016). "Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). Biotecnia, Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, No. 3, pp. 3-8.
- Robles-Ozuna, L. y Ochoa-Martínez, L. "Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos". Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 13, núm. 2, 2012, pp. 109-122.
- Rodríguez, N. y Zambrano, D. (2010). "Los subproductos del café: fuente de energía renovable". Cenicafé. Avances técnicos 393, pp. 1-8.
- Romero, V. (2016, junio 23)." Exfolia tu piel con borra de café". Extraída el 30/XI/2017 desde <http://www.panorama.com.ve/facetas/Exfolia-tu-piel-con-borra-de-cafe-20160621-0062.html>
- Rugiero, L. (2017). *Cuantificación de antioxidantes contenidos en el café (Coffeaa arabica) verde y tostado procedente de Veracruz* [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química.
- Salmones, D., Mata, G. y Waliszewski, K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, 96, 537-544.
- Sánchez, M. (2015). "El café, la cafeína y su relación con la salud y ciertas patologías". Universidad de Valladolid: Facultad de Medicina TFG en Nutrición Humana y Dietética.
- Sánchez, R. (2013). "La química del color en los alimentos". *Química Viva*, núm. 3, pp. 234-246.
- Santos, H., Batista, L., Duarte, S., Abreu, P., Gouvêa, P. (2007). Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Quim. Nova*. 22; 30 (3): 604-610.
- Sara. (2017, Junio 6). "Eliminar los malos olores con café". Extraída el 30/XI/2017 desde <http://trucosdehogarcaseros.com/eliminar-los-malos-olores-con-cafe/>
- Scalbert A; Johnson IT; Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(suppl): 215S-217S.

- Schimidt, C., Perreira, C., Dos Anjos, G., Lucas, S. (2012). Formulação e avaliação sensorial hedônica de iogurte com polpa de Acerola. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia* 1 (5): 10-14.
- Schwartz, J.A. y Lorenzo, T.V. (1990). "Chlorophylls in Foods", *Crit. Rev. Food Sci. Technol.*, 29:1.
- Solís, L y Herrera, C. (2005). "Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café". *Agronomía Costarricense* 29(2): 99-107.
- Stewart, I. (1980). "Color as related to quality in citrus", en *Citrus Nutrition and Quality*, American Chem. Soc., Washington, D.C.
- Stintzing, F., Stintzing, A., Carle R., Frei B. y Wrolstad R. (2002). "Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments", *J. Agricul. Food Chem.*, 50:6172.
- Suarez, J. (2012). *Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de Betania Antioquia: usos y aplicaciones* [Tesis de ingeniería]. Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ingenierías.
- Trejo-Márquez Ma. A., Pascual-Bustamante S. (2010). Taller Multidisciplinario de Procesos Tecnológicos de Frutos y Hortalizas. Práctica 4 Evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos. 10-11.
- Van Dam, M. (2006). Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, núm. 16, pp. 69–77.}
- Velázquez, J. (2013). Obtención y desarrollo de nuevas fuentes de colorantes naturales para la industria de alimentos mediante bioprospección en micro. [Tesis de licenciatura] Chile: Universidad de los Lagos.
- Vermerris W. y Nicholson R. (2006). Biosynthesis of Phenolic Compounds. En *Phenolic compounds Biochemistry*. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. pp. 63-150.

Votavova, L., Voldrich, M., Sevcik, R., Cizkova, H., Mlejnecka, J., Stolar, M. y Fleisman, T. (2009). Changes on the antioxidant capacity of robusta coffee during roasting. *Czech Journal of Food Science*, núm. 27, pp. S49-S52.

Wang, H.-Y.; Qian, H. and Yao, W.-R (2011). *Food Chem.*

Wrolstand, E. (2000). "Colorants", en *Food Chemistry and Applications*, Ed. por G.L. Christen y J.S. Smith. Science Technology System, West Sacramento, California.

Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, G. y Shibamoto, T. (2004). "Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, núm. 52, pp. 592–596.

Zuriaga, M. (2011). *Estudio del café como sustancia tintórea natural para el refuerzo y consolidación de obra textil* [Tesis de máster]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, CRBC.

CAPÍTULO 11 ANEXOS

Anexo No. 1 Reveladores para cromatografía en capa fina

En la Tabla 18 se muestra un resumen de reveladores y criterios de detección de algunos metabolitos secundarios, usados en el análisis fitoquímicos usando cromatografía en capa fina.

Tabla 18. Reveladores para cromatografía en capa fina

Metabolito secundario	Revelador	Tratamiento	Manchas características
<i>Flavonoides</i>	AlCl_3	Irradiar con luz UV-vis a 366 nm	Fluorescencia amarilla y azules a luz UV a 366 nm
	Reactivo citrobórico	Asperjar la placa, calentar a 100°C por 5 minutos e irradiar con luz UV-vis a 366 nm	Fluorescencia amarilla y azules a luz UV a 366 nm
<i>Saponinas, terpenoides e isoprenoides</i>	Vainillina/ H_2SO_4	Primero asperjar la cromatoplaca con disolución A y después con disolución B y calentar a 100°C	Coloración azul o azul violeta, algunas pueden dar coloración amarilla.
	Reactivo de Liebermann-Buchard	Asperjar la cromatoplaca y calentar a 100°C	Manchas azul-verdosas se trataría de saponinas esteroídicas o rojas, rosas y violetas sí se trataría de la presencia de saponinas triterpénicas
	p-anisaldehído/ H_2SO_4	Asperjar la cromatoplaca y calentar a 100°C	
<i>Alcaloides</i>	Dragendorff	Asperjar la cromatoplaca y observar el resultado	Manchas de color marrón o anaranjado intenso
<i>Fenoles/ taninos</i>	Cloruro férrico al 10% agua destilada	Generalmente no requiere calor, o calentar suavemente	Color azul negruzco en caso se trate de taninos pirogalotaninos o color verde en casos se trate de taninos condensados
<i>Cumarinas y antroquinonas</i>	Reactivo de Borntrager	Calentar suavemente hasta que el color aparezca	Rojo en el visible para antroquinonas

Anexo No. 2 Determinación de Fenoles Totales

Se realizó una disolución de carbonato de sodio anhidro 20% p/v pesando 20 g de carbonato de sodio anhidro y disolviéndolos en 80 mL de agua destilada hirviendo, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, después de 24 horas se filtró y aforó a 100 mL con agua destilada; para la curva patrón se preparó una disolución patrón de ácido gálico 0.1 mg/mL, para la cual se pesaron 0.005 g de ácido gálico, se disolvió en 1 mL de etanol y se aforó a 50 mL con agua destilada; para la realización de la curva patrón se realizaron diferentes diluciones de la disolución patrón de ácido gálico y se siguió la Tabla 19:

Tabla 19. Procedimiento para la realización de la curva patrón de Fenoles Totales.

No. De tubo	Ácido Gálico (mg/mL)	Ácido Gálico (uL)	Agua destilada (uL)	Reactivo Folín-Ciocalteu (uL)	Agitar y dejar reposar	Na ₂ CO ₃ (uL)	Agua destilada (uL)	Agitar y dejar reposar	Leer en espectro
Bco	0	0	200	100	8 min	200	1500	60 min	765 nm
1	0.02	40	160						
2	0.04	80	120						
3	0.06	120	80						
4	0.08	160	40						
5	0.10	200	0						

Se adicionaron en los tubos de ensaye la disolución de ácido gálico, el agua destilada (para obtener las concentraciones deseadas de ácido gálico) y el reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogeneizó y se dejó reposar 8 minutos en la obscuridad, posteriormente se le agregó la disolución de carbonato de sodio, el agua destilada y se homogeneizo, se dejó reposar 30 minutos a 40 °C, o una hora a temperatura ambiente en la obscuridad y por último se leyó la absorbancia a una longitud de 765 nm.

$$\text{Ácido gálico (mg/ml)} = \left(\frac{(D \cdot O + b)}{m} \right) \times FD$$

Donde:

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD = factor de dilución

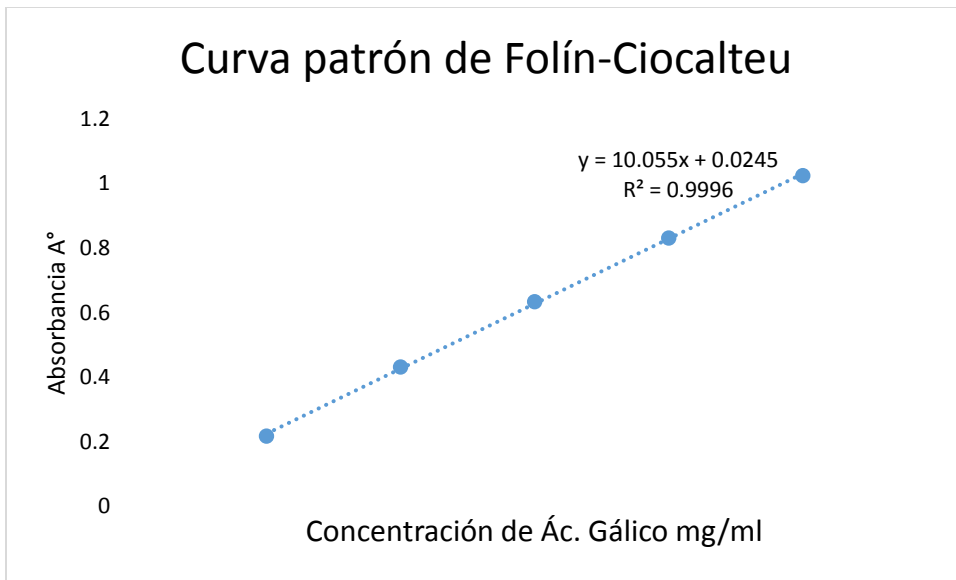


Figura 30. Curva patrón de Ácido Gálico.

Anexo No. 3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

1. Se preparó una disolución del radical DPPH* (0.025 g/L) en metanol y se protegió con papel aluminio.
2. Se tomaron 3.9 mL de la disolución DPPH* y se colocaron en un tubo de ensayo cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz.
3. Posteriormente se agregaron al tubo de ensayo 0.1 mL de la muestra (extracto), se realizó lo mismo con todas las muestras.
4. Después se agitaron vigorosamente los tubos de ensayo utilizando un Vortex Thermolyne Maxi Mix II y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante un lapso de tiempo de 30 minutos.
5. Así mismo se preparó un blanco con 3.9 mL de disolución DPPH*
6. Transcurridos los 30 minutos se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm, calibrando el espectrofotómetro con metanol.
7. Por último se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula mostrada a continuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab = absorbancia del blanco a 515 nm

Am = absorbancia de la muestra a 515 nm

Para la curva patrón se realizó el mismo procedimiento usando como antioxidante TROLOX (12 μ M-1.2mM).

Anexo No. 4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

1. Se preparó una disolución stock de ABTS 7mM en metanol y se protegió de la luz con papel aluminio.
2. Además se preparó una disolución de persulfato de potasio 140 mM en agua.
3. Para la formación de los radicales se mezclaron 5 mL de la disolución ABTS con 88 μ L de la disolución de persulfato de potasio y se dejaron reposar 12 horas.
4. Transcurrido el tiempo de reposo se diluyó la disolución hasta obtener una absorbancia de 0.74 a una longitud de onda de 734 nm.
5. Se tomaron 3.0 mL de la disolución ABTS y se colocaron en un tubo de ensaye cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz.
6. Posteriormente se agregaron al tubo de ensaye 0.1 mL del extracto y se agitaron en un Vortex Thermolyne Maxi Mix II.
7. Después de agitarlos se mantuvieron los tubos en la oscuridad a temperatura ambiente por 10 minutos.
8. Se preparó un blanco con 3.0 mL de disolución ABTS
9. Consecuentemente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, calibrando el espectrofotómetro con metanol.
10. Se obtuvo el porcentaje de inhibición, el cual fue calculado con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab = absorbancia del blanco a 515 nm

Am = absorbancia de la muestra a 515 nm

Para la curva patrón se realizó el mismo procedimiento usando como antioxidante TROLOX (1mM-0.01mM)