

Determinación de ácidos clorogénicos, cafeína, actividad antioxidante, y evaluación sensorial en dos variedades de café tostado (*Coffea arabica*) de Puerto Rico sembrado a dos alturas diferentes

Por

Andrés Sebastián Salinas Trujillo

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

En

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

Recinto Universitario de Mayagüez

Facultad de Ciencias Agrícolas

2017

Aprobado por:

Fernando Pérez, Ph.D
Miembro, comité graduado

Fecha

José Dumas, Ph.D
Miembro, comité graduado

Fecha

María de L. Plaza Delestre, Ph.D
Presidente, comité graduado

Fecha

Kenneth Hughes, Ph.D
Representante, Estudios Graduados

Fecha

Fernando Pérez, Ph.D
Coordinador, programa CITA

Fecha

Derechos de Autor Reservados ©

Andrés Sebastián Salinas Trujillo

2017

ABSTRACT

Coffee is the beverage prepared from seeds or grains processed from red fruits obtained from plants of the genus *Coffea*. Coffee is one of the most popular drinks in the world, third in consumption after water and tea. It occupies the fifth line among the agricultural enterprises of Puerto Rico, representing in its contribution to the economy the main business and way of life for much of the population of the island's central zone. The quality and chemical composition in the final product may vary due to processing conditions and geographical factors. For this reason, the effect of the factors of altitude (upper and lower) and variety (Caturra and Bourbon) on the chlorogenic acids profile, caffeine, antioxidant activity, as well as the degree of bitterness, were evaluated. The chlorogenic acids and caffeine content were determined simultaneously using the LC-DAD/MS/MS technique. The antioxidant activity was evaluated using the ORAC and DPPH methodologies, while the evaluation of the bitter attribute was carried out by a group of trained panelists. The results for caffeine showed that its content is significantly higher in samples from the upper zone, but there was no significant difference with variety. In regards to chlorogenic acids, 5-CQA was the predominant one followed by 4-CQA, 3-CQA, 3,4-CQA and 3,5-CQA, the sum of which was significantly higher in the upper zone and for Caturra. In both ORAC and DPPH, a higher antioxidant activity was observed in samples from the upper zone, although Caturra showed higher ORAC than Bourbon, but the opposite was for DPPH. Finally, the attribute of bitterness, which is mainly due to caffeine and chlorogenic acids, was significantly higher for upper zone, which confirmed the results mentioned above.

RESUMEN

El café es la bebida preparada a partir de las semillas o granos procesados a partir de frutos rojos obtenidos de plantas del género botánico *Coffea*. El café es una de las bebidas más populares del mundo, tercera en consumo luego del agua y el té. Este ocupa el quinto renglón entre las empresas agropecuarias de Puerto Rico, representando en su aportación a la economía el principal negocio y modo de vida para gran parte de la población de la zona central de la isla. La calidad y composición química en el producto final puede variar por las condiciones de procesamiento y factores geográficos. Es por esto que se evaluó el efecto de los factores altitud (alta y baja) y variedad (Caturra y Borbón) en la composición de ácidos clorogénicos, cafeína, actividad antioxidante, además en el grado de amargo. El contenido de ácidos clorogénicos y cafeína se determinó simultáneamente usando la técnica LC-DAD/MS/MS, la actividad antioxidante fue evaluada por medio de las metodologías ORAC y DPPH. La evaluación del atributo de amargo fue llevada a cabo por parte de un grupo de panelistas entrenados. Los resultados para cafeína mostraron que su contenido es significativamente mayor en muestras sembradas en zona alta, sin embargo no hubo diferencia significativa entre variedades. En términos de los ácidos clorogénicos, se encontró que 5-CQA fue el predominante seguido de 4-CQA, 3-CQA, 3,4-CQA y 3,5-CQA, siendo la suma de estos significativamente mayor en zona alta y para la variedad Caturra. Tanto en ORAC y DPPH, se presentó una actividad antioxidante significativamente mayor en las muestras provenientes de zona alta, aunque Caturra presentó mayor ORAC que Borbón, mientras lo opuesto se presentó para DPPH. Por último, el atributo de amargo, debido principalmente a la cafeína y los ácidos clorogénicos, fue significativamente mayor en la zona alta, lo que confirma los resultados antes mencionados.

*La consecución de esta meta solo fue posible gracias a
Díos, que siempre nos bendice, pero sobre todo porque
fue muy bondadoso conmigo al regalarme tres seres en
mi vida que me lo brindan todo, mi amada esposa
Vicky y los frutos de nuestro amor, Chris y Gaby.
Por ustedes y para ustedes!!!*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco muy especialmente a la Dra. María Plaza, por acogerme como su estudiante, brindarme todos los materiales y facilidades para el desarrollo de este proyecto. También le agradezco la amistad y confianza brindada durante estos años.

Agradezco a los Profesores miembros del comité graduado por todos sus aportes durante el proyecto, sus enseñanzas y revisiones al documento escrito. Al Dr. José Dumas por suministrar las muestras, estándares y toda la información requerida. Al Dr. Fernando Pérez por su ayuda en el área de análisis sensorial.

Agradezco al Dr. Kenneth Hughes, representante de la Oficina de Estudios Graduados por sus aportes a este proyecto.

Agradezco a mi esposa Vicky y a nuestros hijos Chris y Gaby, por que han estado conmigo en todo momento, son mi mayor inspiración, y quienes me impulsan a seguir adelante.

En la distancia agradezco a mi madre y hermanos por siempre brindarme todo su cariño y apoyo.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Ivellisse Padilla, por que ha sido más que una jefe, no solo por abrirme un espacio en el departamento de química como instructor de laboratorio, sino en su familia.

Parte de este trabajo no hubiera podido ser posible, sin mis panelistas, quienes se pusieron a total disposición para sacrificar su tiempo y dejarse amargar la vida con las soluciones de cafeína. A ellos agradezco su incondicional colaboración.

Agradezco al personal de CITA por su colaboración brindada cuando fue requerida.

Agradezco a mis amigos Susieling, Efraín Salas, Bessie Rios, por brindar una amistad incondicional y siempre estar para mi familia.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	iii
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	ix
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 El café.....	3
2.2 Procesamiento del café.....	5
2.2.1 Cosecha del café	5
2.2.2 Beneficiado en seco	6
2.2.3 Beneficiado en húmedo y beneficiado ecológico	7
2.2.4 Tostado del café	10
2.3 Composición química del café	13
2.3.1 Café verde	14
2.3.2 Café tostado	14
2.3.3 Compuestos fenólicos y actividad biológica.....	16
2.4 Medición de la actividad antioxidante	20
2.4.1 Ensayo de capacidad de secuestro de radicales oxígeno (ORAC).....	22
2.4.2 Ensayo de capacidad de secuestro de radicales usando el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	22
2.5 Percepción del sabor y análisis sensorial	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos generales	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1 Origen y obtención de las muestras.....	27
4.2 Preparación de los extractos acuosos de café.....	28
4.3 Determinación simultánea de cafeína y ácidos clorogénicos por LC-DAD/MS/MS.....	29
4.3.1 Limpieza de extractos	29
4.3.2 Optimización de la técnica cromatográfica.....	30
4.3.3 Análisis cromatográfico usando LC-DAD/MS/MS.....	30
4.4 Determinación de actividad antioxidante	32

4.4.1	Ensayo de DPPH.....	32
4.4.2	Ensayo ORAC.....	33
4.5	Evaluación sensorial.....	35
4.5.1	Selección y adiestramiento de panelistas.....	35
4.5.2	Evaluación del atributo de amargo en las muestras	38
4.6	Análisis estadístico.....	38
5.	DISCUSIÓN DE RESULTOS	40
5.1	Optimización de la técnica cromatográfica.....	40
5.2	Determinación de cafeína.....	44
5.3	Determinación de ácidos clorogénicos.....	46
5.4	Actividad antioxidante	48
5.4.1	Ensayo ORAC.....	48
5.4.2	Ensayo DPPH.....	51
5.5	Análisis sensorial (grado de amargo).....	54
5.5.1	Selección y adiestramiento de panelistas.....	54
5.5.2	Evaluación sensorial de las muestras.....	58
6.	CONCLUSIONES.....	61
7.	RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS.....	62
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
9.	ANEXOS.....	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de ensayos para medir capacidad antioxidante	21
Tabla 2. Parámetros utilizados durante la cuantificación de cafeína y ácidos clorogénicos usando el modo MRM.....	32
Tabla 3. Concentraciones de cafeína adicionadas al café colado en pruebas triángulo.....	38
Tabla 4. Límites de detección y cuantificación para los ácidos clorogénicos y cafeína.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes del fruto de café	5
Figura 2. Principales ácidos clorogénicos en café tostado.....	19
Figura 3.Reacción entre el radical DPPH' y un compuesto antioxidante.....	23
Figura 4. Separación cromatográfica usando la columna Dionex C18.....	40
Figura 5. Separación cromatográfica usando la columna Zorbax XDB C18.	41
Figura 6. Separación cromatográfica usando la columna µBondapak C18.....	42
Figura 7. Cromatogramas de extractos acuosos de café con diferentes columnas	43
Figura 8. Contenido de cafeína en las muestras de café evaluadas..	45
Figura 9. Contenido de ácidos clorogénicos en las muestras de café.	48
Figura 10. Capacidad antioxidante ORAC en las muestras de café evaluadas.....	49
Figura 11. Capacidad antioxidante DPPH en las muestras de café evaluadas.....	52
Figura 12. Respuestas y rendimiento de panelistas en las pruebas triángulo.	55
Figura 13. Respuestas y rendimiento de panelistas en las pruebas de valoración.	57
Figura 14. Resultados de las pruebas triángulo de muestras de café con la adición de cafeína. ..	58
Figura 15. Resultados de la valoración del grado de amargo de las muestras de café..	59

1. JUSTIFICACIÓN

El café es la bebida preparada a partir de los granos de frutos maduros obtenidos de plantas del género botánico *Coffea* (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). El café es uno de los principales productos en la economía mundial siendo superado por el petróleo en el “ranking” de comercio internacional (Borrelli, Visconti, Mennella, Anese, & Fogliano, 2002). De igual manera el café es una de las bebidas más populares del mundo, tercera en consumo luego del agua y el té (Fujioka & Shibamoto, 2008; Mills, Oruna-Concha, Mottram, Gibson, & Spencer, 2013). En el ámbito local, el café ocupa el quinto renglón entre las empresas agropecuarias de Puerto Rico, representando en su aportación a la economía el principal negocio y modo de vida para gran parte de la población de la zona central de la Isla, aportando cerca del 15% entre la categoría de cosechas al ingreso bruto agrícola de Puerto Rico (Flores, 2011).

El consumo de café es principalmente motivado y preferido sobre otras bebidas por su agradable sabor y aroma, además de las sensaciones positivas que este produce. Las especies de café más usadas para la elaboración de bebidas y derivados son *Coffea arábica* (*arábica*) y *Coffea canephora* (*robusta*), siendo la última la de menor calidad sensorial, sin embargo, su mayor ventaja radica en que permite una mayor extracción de sólidos solubles, lo cual favorece su uso en la elaboración de mezclas y la industria del café soluble (Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011).

Además de las excelentes propiedades sensoriales que ofrece el café al consumidor, su consumo regular lo ha hecho destacar sobre otras bebidas por brindar efectos beneficiosos sobre varios aspectos de la salud, tales como, respuestas psicoactivas (alerta y estado de ánimo), condiciones neurológicas (reducción del riesgo de enfermedad de Parkinson), desordenes metabólicos (diabetes, cálculos biliares), incremento en el rendimiento en actividades físicas y

función hepática (Dórea & da Costa, 2007; Uthus, 2006; Wang & Ho, 2009). Tales efectos beneficiosos que provee el consumo de café son atribuidos principalmente a su capacidad antioxidante y al contenido de compuestos fenólicos, entre los que destaca el ácido clorogénico, del cual el isómero ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) ha mostrado una efectiva capacidad antioxidante (Vignoli, Viegas, Bassoli, & Benassi, 2013). Otros compuestos presentes en el café con actividad antioxidante incluyen cafeína, trigonelina, ácidos cinámicos, y productos de la reacción de Maillard que se presentan durante el proceso de tostado del café, tales como melanoidinas, y compuestos volátiles heterocíclicos, por ejemplo, el hidroximetilfurfural (HMF) (Sacchetti, Di Mattia, Pittia, & Mastrocola, 2009; Vignoli et al., 2013).

Por otro lado, además de los efectos benéficos a la salud que proporcionan los compuestos fenólicos, estos son responsables de la astringencia y el amargo del café. El sabor constituye el criterio más importante para la evaluación de calidad del café, y además, uno de los principales factores que motiva la preferencia del consumidor. Convencionalmente la evaluación de calidad del café se basa en el método sensorial denominado “prueba de taza”, que usa un panel de expertos, cuya respuesta puede llegar a ser subjetiva y no unánime (Consonni, Cagliani, & Cogliati, 2012). Por tanto, se requiere la implementación de herramientas analíticas objetivas que permitan la determinación de la composición química de manera segura y confiable, dada la composición compleja de metabolitos que intervienen en el desarrollo del sabor en los granos de café tras el proceso de tostado (Farah, Monteiro, Calado, Franca, & Trugo, 2006). Teniendo en cuenta que la composición química en el producto final puede variar por las condiciones de tostado, las condiciones de procesamiento, el tipo de granos de café usado y factores geográficos, resulta pertinente evaluar el contenido de estos compuestos en variedades de café de Puerto Rico y correlacionarlas con los atributos de sabor antes mencionados bajo condiciones de

procesamiento controladas, además de conocer el aporte en compuestos beneficiosos a la salud por su actividad antioxidante.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El café

Los orígenes del café se sitúan en Etiopía, donde fue cultivado por primera vez para preparar una bebida (Belitz et al., 2009; Flament, 2002). Luego fue exportado en el siglo quince al otro lado del mar Rojo para llegar a Adén, ubicada en Yemen, antes de pasar a Constantinopla un siglo después, donde se estableció el primer local de consumo de café. Un siglo después el café fue introducido en Europa occidental, específicamente en Londres y Francia, donde al comienzo no gozó de aceptación por parte de los gobernantes, pues los sitios para su consumo se consideraban que promovían una conducta rebelde (Flament, 2002). Luego de la introducción en Europa, el café se convirtió en el centro del comercio, pero la edad dorada llegó a su fin hacia el siglo dieciocho, cuando las plantaciones de café se extendieron a otras regiones, como Indonesia y las Indias occidentales (Flament, 2002).

El café es un árbol o arbusto perteneciente a la familia *Rubiaceae* que se caracteriza por crecer entre 3-12 metros en altura, dependiendo de la especie, y son podados para mantenerlos a una altura de 2-2.5 metros y así facilitar su cosecha (Belitz et al., 2009). La primera especie de café cultivada fue llamada *Coffea arábica*, la cual crece bien en terrenos montañosos, bien irrigados y drenados (Flament, 2002). Hoy en día son también importantes las especies *Coffea canephora* variedad robusta, principalmente producida en África, y la especie *C. libérica*. Estas tres especies son las que proveen la mayor producción de café a nivel mundial, con *C. arábica* y

C. canaephora representando las dos especies más relevantes y ampliamente cultivadas. A enero de 2017 la especie *arábica* representó un 64 % de las exportaciones totales de café a nivel mundial, mientras que la especie *robusta* representó un 36 % de este renglón (ICO, 2017). Sin embargo, la especie *arábica* se caracteriza por su calidad superior y exquisito sabor con un marcado perfil floral/frutoso (Cagliani, Pellegrino, Giugno, & Consonni, 2013; Cheong et al., 2013). Se conocen alrededor de 80 variedades de las tres especies de café antes mencionadas. De la especie *Coffea arábica* las más importantes son *typica*, *bourbon*, *maragogips* y *moca*, y de *Coffea canephora* son *robusta* (la más común), *uganda* y *Quillón* (Belitz et al., 2009).

Los frutos de café o bayas que son cultivados en regiones tropicales a altitudes de 600-1200 m sobre el nivel del mar, tal como se muestra en la **Figura 1**, se caracterizan por poseer una cubierta verde exterior, o cáscara, llamada exocarpo, que, cuando madura, se vuelve rojo-violeta o rojo intenso, e incluso algunas variedades alcanzan una coloración amarilla a naranja. Bajo esta se encuentra una capa de pulpa, seguida por el mesocarpo mucilaginoso (mucílago) firmemente unida a una capa rígida llamada pergamino (endocarpo), la cual envuelve el grano interno de la fruta (endoesperma). Este último se compone de dos semillas cubiertas por una membrana llamada piel plateada, que se encuentran separadas una de la otra por medio del pergamino (Belitz et al., 2009; Esquivel & Jiménez, 2012; Evangelista, Miguel, Silva, Pinheiro, & Schwan, 2015).

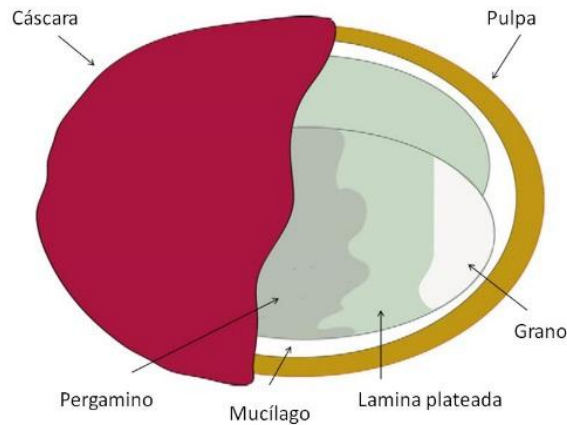


Figura 1. Partes del fruto de café (Esquivel & Jiménez, 2012)

2.2 Procesamiento del café

En la producción de granos de café para el consumo final se distinguen dos etapas principales. La primera, es el procesamiento o beneficiado para obtener café verde o pergamino a partir de café cereza. La segunda, es el tueste del café. El beneficiado del café puede ser llevado a cabo por dos métodos, el seco o el húmedo. La selección de uno u otro depende primordialmente de la variedad y la región entre otros factores.

2.2.1 Cosecha del café

El café es comercializado internacionalmente como café verde maduro, luego de ser cosechado en la época de diciembre a febrero en la región del norte del Ecuador al trópico de Cáncer, y de mayo hasta agosto, del sur del Ecuador al trópico de Capricornio. Una vez los frutos han alcanzado la maduración, la recolección se hace manual, bien sea arrancando cada fruto maduro, o por tiras de cada una de las ramas del arbusto. La recolección también se puede hacer barriendo los frutos caídos bajo los arbustos (Belitz, 2009; Esquivel & Jiménez, 2012). Luego de

la recolección de los frutos, estos son trasladados a facilidades donde se les remueve la pulpa fresca, bien sea por el método en seco (natural o mecánico) o en húmedo.

La recolección del café juega un papel importante en la calidad de la bebida final, por ejemplo; los granos negros y perforados por la broca ocasionan aroma y sabor acre en la bebida; la recolección de granos sobre madurados y verdes puede llevar a la generación del defecto fermento, el cual consiste en producir aroma, acidez y sabor agrio similar a la cebolla. Por otro lado, la astringencia es ocasionada por granos inmaduros (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2016; Puerta, 1999).

2.2.2 Beneficiado en seco

El beneficiado en seco, que es el método más viejo, simple y económico produce cafés denominados no lavados o naturales. Este consiste en extender los frutos y secarlos bien sea al sol o en secadores eléctricos, hasta que el grano se separa por encogimiento de la capa de pergamino que lo rodea (Belitz et al., 2009; Esquivel & Jiménez, 2012; Puerta, 1999; Silva, Batista, Abreu, Dias, & Schwan, 2008). Este método envuelve fermentación natural microbiana de los frutos enteros por un periodo de 10 a 25 días de exposición al sol, tiempo durante el cual son esparcidos sobre una superficie (ej: suelo, concreto, asfalto) en capas de aproximadamente 10 cm de espesor, en la noche son recogidos y en el día esparcidos nuevamente (Evangelista et al., 2015; Silva et al., 2008). Una variante es realizar el proceso de pelado mecánicamente. En cualquiera de los casos el material orgánico que rodea el grano (piel, pulpa, mucílago y pergamino) es retirado, y en la medida de lo posible, también se remueve la cubierta plateada del grano (Belitz, 2009; Esquivel & Jiménez, 2012).

La importancia del secado radica en que es un proceso de conservación de la calidad microbiológica y química del café durante su almacenamiento y transporte. En el secado el

contenido y la actividad de agua deben llegar a niveles inferiores al 12 % y 0.67, respectivamente, para evitar la proliferación de hongos que deterioran el producto (Puerta, 1999). En este proceso, la operación de secado es el paso más importante por que incide directamente en la calidad final del café, ya que frutos sobre secados serán más frágiles y producirán muchos granos rotos durante el descascarado. Por otro lado, los frutos que no se sequeen correctamente serán vulnerables al deterioro por ataque microbiano (Duarte, Pereira, & Farah, 2010)

El procesamiento en seco es usado generalmente para la variedad Robusta, y se prefiere principalmente en regiones donde las precipitaciones son escasas y se cuenta con largos períodos de sol disponibles (González-Ríos et al., 2007b). Tal es el caso de Brasil, donde se procesa por vía seca 85-95% de café *arábica*, al igual que la mayor parte del café producido en Etiopía, Haití, Indonesia y Paraguay, y una parte del producido en la India y Ecuador (Evangelista et al., 2015; Silva et al., 2008).

2.2.3 Beneficiado en húmedo y beneficiado ecológico

El beneficiado en húmedo es un proceso más sofisticado que produce granos de calidad superior, denominados usualmente como “café lavados” o “café pergamino”. Es usado principalmente para la especie *arábica* en regiones como Colombia, América Central y Hawái (Silva et al., 2008).

En éste, los granos son inicialmente sumergidos en agua, lo que permite la separación de frutos dañados o inmaduros de los frutos maduros y en buen estado (los cuales se hundirán) (Esquivel & Jiménez, 2012). Posteriormente la cáscara y la mayor parte de la pulpa son removidas mecánicamente comprimiendo los frutos suavemente en agua empleando una despulpadora, la cual consiste de un cilindro giratorio o disco y una placa, además de una malla.

El exceso de pulpa y el mucílago son removidos por medio de fermentación en tanques de concreto por espacio de 6-72 horas (dependiendo de la temperatura ambiental) (Belitz et al., 2009; Duarte et al., 2010; Evangelista et al., 2015). Los granos resultantes de la etapa de despulpado permanecen rodeados por el pergamino, el cual se retira después de subsecuentes pasos de lavado, secado y pelado (Duarte et al., 2010). La cubierta plateada se puede quitar opcionalmente por una máquina de pulido para producir granos de café de alta calidad (Belitz et al., 2009).

La fermentación que permite la hidrólisis del mucílago, el cual dificulta el secado de los granos, es llevada a cabo por enzimas presentes en el tejido del café y por enzimas producidas por microorganismos endógenos de la cáscara del fruto. La población de estos tiene una influencia directa en la calidad final del grano, pues usan los diferentes compuestos presentes en la pulpa y mucílago como nutrientes durante la fermentación, secretando ácidos orgánicos y otros metabolitos que pueden afectar la calidad sensorial final de la bebida (Avallone, Guyot, Brillouet, Olguin, & Guiraud, 2001; Belitz et al., 2009; Esquivel & Jiménez, 2012; Evangelista et al., 2015).

La biodiversidad microbiana presente en las frutas y los granos de café depende entre otros factores, de la variedad de café, método de fermentación, composición de la fruta y los factores ambientales de la región en la que se cultivan como la humedad, la temperatura, y la población en el suelo (Evangelista et al., 2015; Vilela, Pereira, Silva, Batista, & Schwan, 2010). Avallone et al (2001) reportaron que la microflora responsable de la fermentación del café y la eliminación del mucílago está compuesta principalmente por bacterias aeróbicas, especialmente bacillos Gram-negativos, dentro de los que aparecen con mayor frecuencia cepas de los géneros *Klebsiella* y *Erwinia*. En un estudio adicional desarrollado en dos regiones de Brazil, Evangelista

y colaboradores (2015), encontraron que las levaduras predominantes en la fermentación fueron *Meyerozyma caribbica* y *Hanseniaspora uvarum*, en una de ellas. En la otra región, *Torulaspora delbrueckii* fue la levadura predominante. En cuanto a las bacterias, las especies *Staphylococcus warneri* y *Erwinia persicina* predominaron en la primera, mientras, *Enterobacter asburiae* y *Leuconostoc mesenteroides* predominaron en la otra. Simultáneamente se determinó que el ácido láctico fue el ácido orgánico predominante durante la fermentación. La presencia de este y otros ácidos orgánicos, provocan cambios en el pH, alterando la microbiota presente en el tanque. Adicionalmente, la difusión de ácidos producidos durante la fermentación hacia los granos afectan la calidad y sabor de la bebida final.

Debido a que en el método húmedo se usan grandes cantidades de agua y no hay control de los desperdicios en la etapa de fermentación, se desarrolló en Colombia la tecnología BECOLSUB (beneficio ecológico del café y aprovechamiento de sus sub-productos) como alternativa amigable con el medio ambiente (Puerta, 1999; Roa et al., 1997; Rodríguez, Sanz, Oliveros, & Ramírez, 2015; Sanz, Oliveros, Ramírez, López, & Velásquez, 2011). En este proceso se obtiene una reducción en el consumo de agua mayor al 95% y un control en la contaminación de las aguas de más del 90% sin afectar la calidad intrínseca del producto (Sanz et al., 2011). La tecnología consiste básicamente en la remoción mecánica de pulpa sin el uso de agua y el mucílago es retirado mecánicamente consumiendo cerca de 1 litro de agua por cada kilogramo de café pergamino seco. La mezcla de pulpa y mucílago residual se combinan y transportan usando un tornillo sinfín hasta un lecho donde son transformados biológicamente para aprovecharse como biomasa (Puerta, 1999; Roa et al., 1997; Sanz et al., 2011).

Aunque el beneficiado ecológico tenga un mayor impacto favorable tanto económicamente, cómo ambientalmente, se ha mostrado que cafés verdes-maduros procesados de esta manera

presentan una menor calidad aromática en comparación con cafés beneficiados por el método en húmedo tradicional (González-Ríos et al., 2007b). El mismo resultado se obtuvo en café tostado beneficiado ecológicamente, el cual presentó notas aromáticas neutrales, contrario a los tratados por el método húmedo tradicional, que presentaron notas a caramelo, frutales y florales, confirmando la importancia de la remoción microbiana del mucílago (González-Ríos et al., 2007a).

2.2.4 Tostado del café

Los granos de café verde-maduro obtenidos al final de las etapas de beneficiado presentan unas características organolépticas no adecuadas, en particular un olor muy poco agradable, asociándose a los descriptores de herbal, césped y tierra. Para lograr obtener el color, aroma y sabor agradables, deseados en la bebida final, los granos deben ser tratados térmicamente en un proceso denominado tostado o torrefacción (Esquivel & Jiménez, 2012). El proceso del tostado del café es llevado a cabo por calentamiento controlado desde temperatura ambiente hasta cerca de 240 °C en un lapso de 10 a 15 minutos (Belitz et al., 2009; Lyman, Benck, Dell, Merle, & Murray-Wijelath, 2003). Este tratamiento provoca profundos cambios físicos y químicos en los granos, además del característico sabor obtenido por la combinación de numerosos productos químicos generados.

Entre los cambios físicos que ocurren, están que los granos con una excepcional dureza cambian su estructura aumentando de volumen (50-80%), volviéndose más frágiles y suaves. El aumento en volumen se debe a que durante el calentamiento la pared celular de los granos de café cambia de un estado inicial vítreo a uno elástico, soportando presiones de hasta 16 Bares, lo cual es posible porque esta es gruesa y carece de espacios intracelulares, viéndose como una agregación de unidades de microreactores (Baggenstoss, Poisson, Kaegi, Perren, & Escher,

2008). Otro cambio físico importante es el color, el cual de un verde se torna a un color marrón o incluso negro. La pérdida de peso de los granos verdes alcanza valores de 11-20%. Adicionalmente, la gravedad específica disminuye de 1.126-1.172 a 0.570-0.694, por lo que los granos tostados flotan en el agua (Belitz et al., 2009; Hećimović et al., 2011).

En el tostado se presenta la transferencia de calor por contacto, conducción, convección y radiación, siendo convección el más efectivo y apropiado para un tueste homogéneo. Además, permite el transcurso de las cuatro etapas importantes: secado, desarrollo, descomposición y el tostado completo (Baggenstoss et al., 2008; Belitz et al., 2009). A continuación se describen cada una de estas fases.

Los cambios iniciales ocurren en la etapa de secado por encima de 50 °C, cuando las proteínas del tejido se desnaturalizan y el grano pierde agua por evaporación de la misma (Belitz et al., 2009). En este punto también se presentan reacciones hidrolíticas involucrando los monosacáridos presentes en los granos verdes, dándose un incremento de glucosa, fructosa, galactosa y manosa, en especial de glucosa a consecuencia de la hidrólisis de la celulosa presente en la estructura celular de los granos, favorecida en parte por el ambiente ligeramente ácido del grano (Lyman et al., 2003).

Por encima de 100 °C inicia la etapa de desarrollo, en la cual, el agua débilmente enlazada a las moléculas orgánicas comienza a evaporarse. Al alcanzarse una presión de vapor cercana a 30 psi (por sus siglas en inglés), parte de la pared de celulosa debilitada comienza a agrietarse, dando el primer crujido desde el tostador por parte de los granos, los cuales actúan como pequeñas ollas a presión, liberando el exceso de presión (Lyman et al., 2003). Simultáneamente comienza a presentarse el oscurecimiento, debido a reacciones de pirólisis de compuestos orgánicos, tales como proteínas, carbohidratos, polisacáridos, entre otros, acompañado por

hinchazón y una destilación seca (Belitz et al., 2009). En esta etapa también se presentan reacciones de Maillard o reacción de oscurecimiento no enzimática (Somporn, Kamtuo, Theerakulpisut, & Siriamornpun, 2011). La primera de ellas, consiste en la interacción entre el grupo carbonilo de un monosacárido reductor con el grupo amino libre de un aminoácido, un péptido, o incluso una proteína, favoreciéndose por la alta temperatura y por la baja actividad de agua de los granos (BeMiller & Whistler, 1996; Flament, 2002; Lyman et al., 2003; Vignoli et al., 2013). Los productos finales de esta reacción son heterociclos nitrogenados y melanoidinas. Estas últimas son macromoléculas responsables del color café, cuya estructura y composición es aún desconocida (Andriot, Le Quéré & Guichard, 2004; BeMiller & Whistler, 1996; Flament, 2002; Lyman et al., 2003). A medida que la temperatura supera los 160 °C se inicia otra reacción importante, la degradación de Strecker, en la cual ocurre la condensación de compuestos dicarbonílicos (formados de la oxidación de moléculas de azúcares) con aminoácidos, produciendo aminocetonas, aldehídos y productos volátiles, tales como, agua, CO₂ y CO. Otro cambio que ocurre con el aumento en la temperatura es el aumento en el volumen del grano.

La etapa de descomposición se da a temperaturas de 180-200 °C, en la cual continúa ocurriendo la hidrólisis de la celulosa, haciendo a los granos más débiles y quebradizos. En este punto se presenta el segundo sonido de crujido como consecuencia de que la presión de CO₂ formado en la degradación de Strecker supera la fuerza de la pared celulósica del grano, como consecuencia los granos revientan, liberándose el aroma a café y un humo color azul (Belitz et al., 2009; Lyman et al., 2003).

Ya en la última etapa, la del tostado final, a medida que la temperatura pasa de 200 °C, y como consecuencia de la pérdida de CO₂, las moléculas de azúcar en exceso comienzan a oxidarse (o caramelizarse), produciendo aldehídos lineales, cetonas y ácidos (Lyman et al.,

2003). Incluso, a medida que la temperatura sigue en aumento comienza la degradación termal de muchas moléculas orgánicas, entre ellas, el ácido pirúvico que se forma, se degrada a acetaldehído, el ácido cafeíco se puede oxidar para formar diversos hidroxibenzaldehídos, y el ácido quínico puede sufrir deshidratación y formar ácidos fenólicos, que imparten sabor amargo (Lyman et al., 2003). Cuando se ha conseguido la caramelización óptima, la humedad de los granos cae a su nivel más bajo, de 1.5-3.5%, completándose así el tostado (Belitz et al., 2009).

El tostado del café requiere habilidad y experiencia para alcanzar uniformidad en color y conseguir el desarrollo de un aroma óptimo. Este proceso requiere control de tiempo y temperatura para que se presenten las reacciones químicas necesarias sin que los granos se quemem comprometiendo el sabor de la bebida (Belitz et al., 2009). El grado de tueste de café es controlado por tiempo y temperatura, y se suele evaluar cualitativamente midiendo su color; permitiendo clasificarlo como tostado claro, medio u oscuro (Somporn et al., 2011; Vignoli et al., 2013).

2.3 Composición química del café

La composición y las características de los granos de café, además de depender de la especie, condiciones de cultivo de las plantas (tales como sombra, poda, suelo, exposición al sol, régimen de lluvias y temperatura), grado de madurez al momento de la cosecha, y la manera en que se realice la cosecha, también depende del método de procesamiento, bien sea en seco o en húmedo. Si se selecciona el método en húmedo, el paso de fermentación para retirar el mucílago resulta crítico (Esquivel & Jiménez, 2012b; Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011). A continuación se describe la composición química del café verde y como esta se afecta con la torrefacción.

2.3.1 Café verde

Sin importar si la especie es *arábica* o *robusta*, los principales componentes en café verde son los polisacáridos insolubles (fibra dietaria), con mayor predominancia de celulosa (41-43% en *arábica*; 32–40% *robusta* expresados en % de sólidos), y en menor alcance hemicelulosa (5-10% en *arábica*; 3-4% *robusta*). Luego, los compuestos más abundantes corresponden a los lípidos, pero con mayor abundancia en *arábica* (15-18%) que en *robusta* (8-12%), siendo los triacilgliceroles los lípidos más representativos (Toci, Neto, Torres, & Farah, 2013). Siguiendo los lípidos en abundancia, están los carbohidratos solubles con 9.0-12.5% en *arábica* y 6.0-11.5% en *robusta*. El siguiente grupo de componentes representativos en café verde son los ácidos clorogénicos, siendo en este caso *robusta* la de mayor contenido en dicho componente, con 7.1-12.1% en comparación con 6.7-9.2% en *arábica*. Entre los ácidos clorogénicos, el más abundante es el 5-cafeoilquínico, presente en *arábica* en un 3.0-5.6%, mientras en *robusta* alcanza valores de 4.4-6.6%. Comparable al nivel de ácidos clorogénicos, se encuentran los compuestos nitrogenados, representados mayoritariamente por proteínas 8.5-12.0%, seguido por la cafeína y trigonelina, mientras los aminoácidos están en menor proporción. Otro grupo de sustancias químicas importantes son los minerales, que alcanzan valores entre 3.0- 5.4% (Belitz et al., 2009).

2.3.2 Café tostado

Como ocurre con el café verde, la composición del café tostado cambia significativamente dependiendo de la variedad y grado de tueste. El proceso de tostado causa cambios en la composición química y actividad biológica del café, así componentes como los polisacáridos insolubles, tales como celulosa, son degradados a fragmentos solubles. La sacarosa presente en el

café crudo es descompuesta hasta concentraciones de 0.4-2.8%. El contenido de carbohidratos totales llega a ser de 38% (en % de sólidos) y de 42% (en % de sólidos) para *arábica* y *robusta*, respectivamente (Belitz et al., 2009).

La fracción lipídica es bien estable y supera el proceso de tostado con cambios muy pequeños. Los ácidos linoleico y palmítico son los más abundantes. El contenido total de lípidos en la especie *arábica* es de 17%, mientras que en *robusta* llega a 11%. Los diterpenos presentes como cafestol y kahweol son degradados por el tostado. El 16-O-metilcafestol, que sólo se encuentra en *robusta*, resiste el proceso de tostado, por lo que este compuesto permite detectar mezclas de *robusta* y *arábica* (Belitz et al., 2009).

Las proteínas que presentan un contenido de 10% tanto en café tostado producido a partir de *arábica* como *robusta*, sufren cambios significativos por el calentamiento en presencia de carbohidratos. Los aminoácidos sufren una disminución del 30%, en especial, arginina, ácido aspártico, lisina, serina, treonina y metionina, mientras que aminoácidos estables, como alanina, ácido glutámico y leucina se mantienen. Es importante el hecho que aminoácidos libres se presentan solo a nivel trazas en el café tostado (Belitz et al., 2009).

En cuanto a los minerales, permanecen casi estables con 4.5% en *arábica* y 4.7% en *robusta*. Los cationes predominantes en las cenizas son potasio, calcio y magnesio, en tanto que los aniones predominantes son sulfato y fosfato (Belitz et al., 2009)).

Respecto a los compuestos de aroma, se han identificado cerca de 850 volátiles formando una mezcla muy compleja, de los cuales alrededor de 40 contribuyen al aroma, asociados principalmente con los descriptores dulce/caramelo, tierra, sulfuroso/tostado y ahumado/fenólico. Por su parte los compuestos responsables del sabor, tales como los ácidos clorogénicos (ACG) son de los componentes que más se pierden en el tostado debido a su alta

inestabilidad termal alcanzándose valores de 2.7-3.1% en *arábica* y *robusta*, respectivamente, (Belitz et al., 2009; Mills et al., 2013).

Una de las principales características de la bebida de café es su significativo aporte en compuestos con actividad antioxidante. Aunque compuestos fenólicos antioxidantes, tales como el ácido clorogénico, son parcialmente degradados durante el tostado, la capacidad antioxidante puede mantenerse o incluso mejorarse gracias a la formación de compuestos con actividad antioxidante a partir de la reacción de Maillard. Las melanoidinas, que alcanzan valores de hasta 23% para ambas especies en cuestión, han sido reportados como los compuestos responsables de la actividad antioxidante de la fracción de alto peso molecular aislada de café tostado (Sacchetti, Di Mattia, Pittia, & Mastrocola, 2009; Vignoli et al., 2011). Simultáneamente, la cafeína, un importante compuesto con actividad biológica sufre una ligera disminución durante el tostado, llegando a valores de 1.3% y 2.4% para *arábica* y *robusta*, respectivamente (Belitz et al., 2009).

2.3.3 Compuestos fenólicos y actividad biológica

La amplia popularidad que goza la bebida preparada por infusión de café tostado, tercera después del té y el agua, no es sólo por su agradable aroma y sabor, sino por sus propiedades fisiológicas y psicoactivas sobre la salud. Tales efectos son asociados con el hecho de que el café es rico en sustancias biológicamente activas tales como, ácido nicotínico, trigonelina, ácido quinolínico, ácido tánico, ácido pirogálico, y metilxantinas, particularmente cafeína. También, es importante la presencia de polifenoles, tales como los flavonoides y los de la familia de los ácidos hidroxicinámicos, específicamente ácido clorogénico, cafeico, cumárico, ferúlico y sinápico (Dórea & da Costa, 2007; Mills et al., 2013; Wang & Ho, 2009).

En general, los compuestos fenólicos son constituyentes ubicuos de muchas plantas superiores. Estos están distribuidos dentro de un rango amplio de alimentos de origen vegetal consumidos masivamente, tales como, cereales, vegetales, frutas, leguminosas, y en bebidas de origen vegetal, tales como vino, té, cerveza y café (Farah & Donangelo, 2006). Los compuestos fenólicos que son metabolitos secundarios producidos por las plantas como mecanismos de defensa ante situaciones de estrés, como por ejemplo, radiación ultravioleta o agresión por patógenos, se pueden agrupar en diferentes clases, de acuerdo a su estructura química básica (número y tipo de anillos de fenol), y en diferentes sub-clases según las substituciones específicas en la estructura básica, asociación con carbohidratos y formas polimerizadas (Farah & Donangelo, 2006; Wang & Ho, 2009).

Los miles de compuestos fenólicos conocidos hasta el momento se pueden agrupar en dos grandes clases: en flavonoides y compuestos no flavonoides. Los flavonoides son derivados de benzo- γ -pirona y estructuralmente están formados por anillos de fenol y de pirano. Existen siete clases principales de flavonoides: los flavonoles (kaempferol, quercitina y mirecitina), flavonas (apigenina y luteolina), flavanonas (Naringenina y hesperetina), flavanoles (catequinas y galocatequinas), antocianidinas (pelargonidina, cianidina y malvidina), taninos condensados o proantocianidinas (procianidina trimerica y prodelfinidinas) y las isoflavonas (daidzeina, genisteina y gliciteina). Por otro lado, dentro de los compuestos fenólicos no flavonoides se encuentran: los ácidos fenólicos de tipo benzoico (ácido gálico, ácido procatechuico y ácido *p*-hidroxibenzoico), y de tipo hidroxicinámico (ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico), además de los taninos hidrolizables (pentagaloilglucosa), estilbenos (resveratrol), y lignanos (secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol y pinoresinol) (Adriana Farah & Donangelo, 2006; Wang & Ho, 2009).

Los beneficios a la salud que provee el consumo de alimentos ricos en flavonoides y polifenoles, que han despertado gran interés entre la comunidad científica y los mismos consumidores, incluyen contribución en la prevención contra enfermedades crónicas degenerativas, las cuales incluyen, cataratas, enfermedades neurodegenerativas, y diabetes mellitus, además de cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del corazón, inhibición de lesión arteriosclerótica, reducción de colesterol en sangre y osteoporosis (Farah & Donangelo, 2006; Hodgson & Croft, 2010; Scalbert, Johnson, & Saltmarsh, 2005). Aunque muchos estudios epidemiológicos tienden a confirmar los efectos protectores del consumo de polifenoles contra enfermedades cardiovasculares, en contraste, el efecto protector de polifenoles contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, se deriva de experimentos *in vitro* o con animales, que a menudo se llevan a cabo con dosis mucho más altas que aquellas a las que los seres humanos están expuestos a través de la dieta (Scalbert et al., 2005)

Los flavonoides junto con los ácidos clorogénicos constituyen los principales compuestos fenólicos en el café (Wang & Ho, 2009). Mientras en la pulpa los principales compuestos fenólicos son los taninos condensados, en las semillas los compuestos fenólicos se distribuyen predominantemente como ácidos clorogénicos (Farah & Donangelo, 2006). Los ácidos clorogénicos, químicamente, se describen como ésteres de una a tres moléculas de ácidos *trans*-cinámicos, tales como, cafeíco, ferúlico y p-cumárico, con una molécula de ácido quínico (Monteiro & Farah, 2012).

En la **Figura 2** se muestran los ácidos clorogénicos más abundantes del café, los cuales forman parte de tres grupos de isómeros principales: los ácidos cafeoilquínicos, los ácidos feruloilquínicos y los ácidos dicafeoilquínicos. De estas familias, la más abundante es la de los ácidos cafeoilquínicos, alcanzando proporciones entre 65-85%, con el isómero 5-CQA como el

más abundante. Los otros tipos de isómeros representan en proporción entre un 3-20% cada uno, respectivamente (Fujioka & Shibamoto, 2008; Mullen et al., 2011; Trugo & Nogueira, 2003).

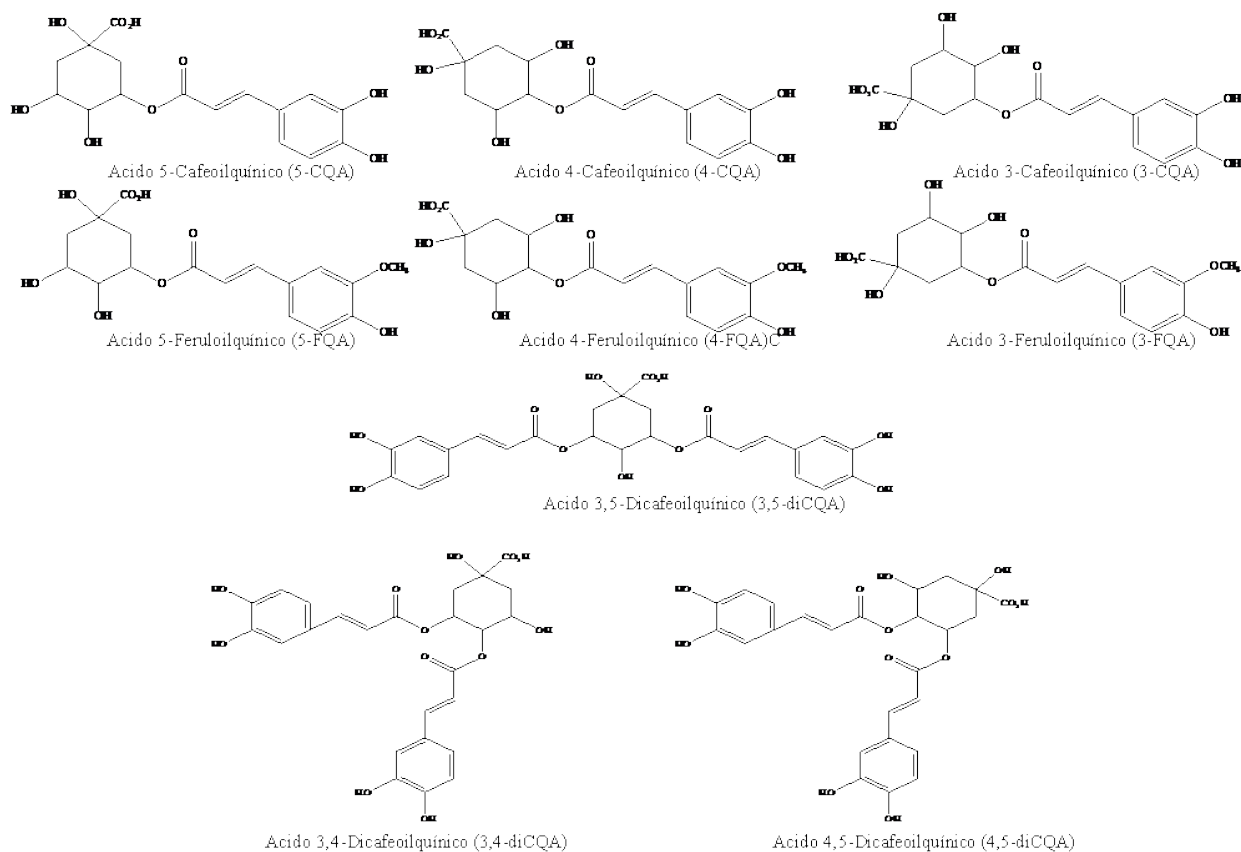


Figura 2. Principales ácidos clorogénicos en café tostado (autoría personal)

Otros compuestos fenólicos que se encuentran en la semilla del café incluyen: taninos, lignanos, y antocianidinas. Estos se encuentran en menor cantidad que los ácidos clorogénicos (Farah & Donangelo, 2006). Los ácidos clorogénicos se caracterizan por tener varias propiedades beneficiosas para la salud, la cual se explica en gran medida por su potente actividad antioxidante. Además, se han mostrado actividades antivirales, hepatoprotectoras y antiespasmódicos. De hecho, particularmente el isómero ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA) ha mostrado ser un excelente antioxidante en ensayos *in vitro* y *ex vivo* (Vignoli et al., 2013). El

contenido de ácidos clorogénicos varía por las condiciones de cultivo, de procesamiento y grado de maduración. Durante el proceso de tostado, el contenido de estos compuestos disminuye debido a que son inestables a altas temperaturas. Entre especies se ha reportado que *robusta* tiene mayor capacidad antioxidante que *arábica* cuando el café es tostado (Vignoli et al., 2013). Por esta razón se buscan nuevos cultivares de la especie *C. arábica*, con buenas propiedades sensoriales y que posean altos contenidos de ácidos clorogénicos.

Otro compuesto en el café con importante actividad antioxidante, es la cafeína (1,3,7-metilxantina), el compuesto más estudiado del café. Químicamente, esta se describe como un alcaloide del grupo xantina ampliamente distribuido entre muchas bebidas y alimentos, incluyendo además de las diferentes variedades de café, hojas de té (*Camellia sinensis*), semillas de guaraná (*Paullinia cupana*), hojas de mate (*Llex paraguariensis*), semillas de nuez de cola (*Cola nitida*, *Cola acuminata*) y granos de cocoa (*Theobroma cacao*) (Tello, Viguera, & Calvo, 2011).

2.4 Medición de la actividad antioxidante

Dado al creciente interés en la población en general, la industria y la ciencia de alimentos en conocer la capacidad antioxidante de diferentes alimentos, se han desarrollado diferentes metodologías para lograr satisfacer esta necesidad. Sin embargo, ninguna de estas se considera un método estándar. Esto es debido en parte a la complejidad en la composición de los alimentos, a las interacciones sinérgicas entre los compuestos antioxidantes, la carencia de un método validado, el uso de diferentes condiciones de ensayo y a que los resultados no son comparables.

Como muestra la **Tabla 1**, los principales ensayos para medir capacidad antioxidante se agrupan en dos categorías: la primera, ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos

de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés); la segunda, ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones (ET, por sus siglas en inglés) (Huang, Ou, & Prior, 2005). La mayoría de los ensayos basados en transferencia de hidrógeno se componen de un generador de radicales libres sintético de tipo azo (generalmente AAPH), una molécula de prueba oxidable y un antioxidante, que permiten monitorear la cinética de reacciones competitivas y llevar a cabo la cuantificación a partir de las curvas cinéticas (Huang et al., 2005). Por otro lado, los métodos de transferencia de electrones involucran un proceso redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. Los dos tipos de ensayos tienen en común que miden la capacidad de secuestro de radicales (u oxidantes), en lugar de la capacidad antioxidante preventiva de una muestra. Debido a que en el presente estudio se usó un método de medición de capacidad antioxidante de cada tipo, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay) y DPPH', estos se describen a continuación.

Tabla 1. Clasificación de ensayos para medir capacidad antioxidante

Tipo de ensayo	Ensayo
Reacciones de Transferencia de átomo de hidrógeno (HAT)	ORAC (Capacidad de secuestro de radicales oxígeno)
	TRAP (Parámetro antioxidante de captura de radicales totales)
	Ensayo de blanqueo de crocina
	IOU (Consumo de oxígeno inhibido)
	Inhibición de oxidación de ácido linoleico
Reacciones de Transferencia de Electrones (ET)	Inhibición de oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad)
	TEAC (Capacidad antioxidante de Trolox equivalente)
	FRAP (Parámetro antioxidante de reducción del ion férrico)
	DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
	Capacidad de reducción de cobre (II)
	Ensayo de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu

2.4.1 Ensayo de capacidad de secuestro de radicales oxígeno (ORAC)

Este ensayo fue desarrollado por Cao et al. (1993) usando inicialmente β -ficoeritrina (B-PE, una proteína fluorescente) como molécula de prueba. A medida que la fluorescencia de B-PE decae indica el grado en el que la molécula se degrada por reacción con el radical peroxilo. Posteriormente, Ou et al. (2001) modificaron la B-PE por fluoresceína, ya que la primera presentaba ciertas desventajas, tales como: falta de uniformidad entre lotes al ser aislada del organismo *Porphyridium cruentum*, y presencia de interacciones no específicas con polifenoles, al punto de perder fluorescencia aun en ausencia del radical (Huang et al., 2005).

En sí, el método consiste en mezclar la muestra, o el control, o el estándar, con la solución de fluoresceína, los cuales se incuban a 37 °C antes de adicionar la solución del radical AAPH para iniciar la reacción (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Prior, 2002; Huang et al., 2005). Una vez la reacción se inicia se mide la intensidad de la fluorescencia cada minuto por 35 minutos. Todo el proceso es llevado a cabo bajo condiciones fisiológicas (37 °C y pH 7.40).

Como el método fue concebido inicialmente, se consumía mucho tiempo y labor del analista, limitando el análisis de altos volúmenes de muestras. Huang et al (2002) implementaron el uso de un lector de fluorescencia de microplato con capacidad para 96 muestras, permitiendo analizar por lo menos 130 muestras por día. Esta optimización, no solo libera tiempo de análisis, sino que elimina en gran proporción el error humano en varias etapas de preparación de muestra.

2.4.2 Ensayo de capacidad de secuestro de radicales usando el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Entre los diversos métodos que se han desarrollado para medir la actividad antioxidante basados en diferentes mecanismos de reacción químicos o biológicos, la metodología usando el

radical DPPH constituye una de las más empleadas. Este ensayo que fue desarrollado inicialmente por Brand-Williams et al. (1995). Consiste en monitorear el descenso en la absorbancia del radical estable DPPH $\cdot$ cuando reacciona con compuestos antioxidantes aislados o extraídos. La capacidad de eliminar el radical estable DPPH $\cdot$ es una medida directa de la actividad antioxidante. En su forma radical, el DPPH, el cual presenta un color violeta, absorbe a 515 nm, pero al reducirse por un antioxidante (AH), su absorbancia desaparece y se torna al correspondiente compuesto amarillo, **Figura 3** (Musa, Abdullah, Kuswandi, & Hidayat, 2013). Típicamente el ensayo es llevado a cabo en metanol, y el monitoreo de la reacción se da por espacio de 30 minutos o hasta alcanzar una lectura estable a 515 nm (Huang et al., 2005).

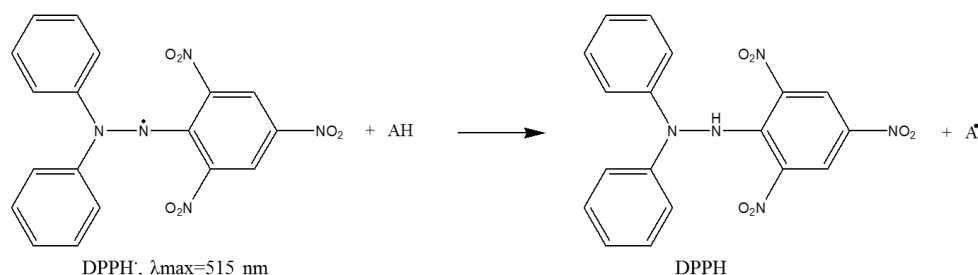


Figura 3.Reacción entre el radical DPPH $\cdot$ y un compuesto antioxidante (autoría personal)

Esta metodología se destaca en particular por ser simple, llevarse a cabo bajo condiciones ambientales y no requerir preparaciones especiales ni instrumentos sofisticados, tales como, cromatógrafos de gases o de líquidos. Sin embargo, la mayor desventaja radica en que se deben preparar diariamente grandes cantidades de solución de DPPH $\cdot$ fresco. Para intentar buscar una solución, Deng et al. (2011) encontraron que el radical sufre una mayor descomposición al ser retirado del refrigerador luego de ser almacenado para llevarlo a temperatura ambiente. En el mismo estudio se logró determinar que el radical es estable a temperatura de 25 °C hasta por dos

horas, concluyendo que la temperatura tiene mayor efecto que el tiempo en la estabilidad de la concentración de DPPH' en solución.

Para superar los problemas de la preparación de la solución de DPPH', Musa et al. (2013) reportaron un nuevo método basado en DPPH' en seco. En este, implementaron el uso de un colorímetro con capacidad para leer microplatos de 96 celdas, en las cuales depositaban la solución fresca de DPPH' y luego la secaban con flujo de nitrógeno. Los investigadores obtuvieron que este método es comparable al procedimiento clásico, con excelente sensibilidad, permite manejar menores cantidades de solvente y se puede analizar un mayor volumen de muestras al implementar el uso del microplato.

2.5 Percepción del sabor y análisis sensorial

La calidad sensorial del café usualmente se evalúa por medio de la técnica de catación también denominada prueba de taza. Esta evaluación constituye el criterio aceptado internacionalmente entre compradores y vendedores para llevar a cabo transacciones del grano. Este método es ejecutado por parte de catadores expertos que son entrenados para llevar a cabo la calificación de los parámetros de sabor y aroma de café molido y la bebida preparada por infusión de este, junto con el juzgamiento visual de granos de café verde y tostados (Farah et al., 2006; Lara, 2005; Sunarharum, Williams, & Smyth, 2014).

La técnica de catación consiste en presentar al evaluador los granos de café para evaluar su aroma. Luego de ello se da a lugar la adición de agua en ebullición, para evaluar el aroma de la bebida y posteriormente su sabor. De este parámetro usualmente se valora el cuerpo, amargo, dulce, acidez y carácter ("Buen café," 2002; SCAA, 2015).

Dado que la prueba de taza del café requiere que sea llevada a cabo por parte de individuos expertos, su juzgamiento sobre los parámetros de interés no deja de resultar subjetivo y propenso al error causado por la diferencia en percepción entre los expertos. Esta falta de objetividad parte del hecho de que cada individuo forma una opinión diferente con base a factores fisiológicos y psicológicos apoyados en un desarrollo de habilidades tanto naturales como empíricas (Meilgaard, Carr, & Civille, 1999a).

La calidad de taza tiene una marcada influencia por los ácidos clorogénicos, los cuales s juegan un papel importante en la formación del sabor del café, contribuyen con acidez, astringencia y sabor amargo a la bebida final (Farah & Donangelo, 2006). Por otro lado, se conoce que los cafés procesados en húmedo (cafés lavados) presentan una mejor calidad, menos cuerpo, mayor acidez y más aroma que los cafés tratados por el método en seco, mientras que los cafés beneficiados ecológicamente presentan un cuerpo intermedio entre los lavados y tratados en seco (Duarte et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Determinar si hay diferencia significativas en el contenido de diferentes ácidos clorogénicos, cafeína, actividad antioxidante y grado de amargo entre muestras de café tostado de dos variedades de la especie *arábica* sembradas a dos altitudes diferentes.

3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar una técnica para la determinación simultánea de cinco ácidos clorogénicos y cafeína en las muestras de café.
- Determinar si hay diferencias significativas en el contenido de ácidos clorogénicos entre las distintas muestras bajo estudio.
- Determinar si hay diferencias significativas en el contenido de cafeína entre las diferentes muestras bajo estudio.
- Entrenar un panel sensorial para evaluar el atributo de amargo, y establecer si hay correlación entre este y el contenido de ácidos clorogénicos y cafeína.
- Medir la actividad antioxidante por los métodos de ORAC y DPPH de extractos de café, y determinar si hay diferencia significativa entre las distintas muestras evaluadas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Origen y obtención de las muestras

Para llevar a cabo esta investigación fueron objeto de estudio muestras de café de las variedades Borbón y Caturra, ambas pertenecientes a la especie *arábica*. Las mismas fueron obtenidas en diferentes fincas ubicadas en los municipios de Adjuntas, San Sebastián y Jayuya del área central cafetalera de Puerto Rico. Las muestras fueron clasificadas de acuerdo a la localización de cada una de las fincas donde se recolectaron, diferenciadas por su ubicación en una de dos regiones, zona alta (1,800-2,000 metros sobre el nivel del mar) y zona baja (500-1,100 metros sobre el nivel del mar). Estas fincas tenían el café sembrado a pleno sol, llevaban planes adecuados de fertilización y permitían la cosecha del fruto de café completamente maduro.

Donde fuera posible, de cada finca se cosechó un almud (28 libras) de café cereza de arboles de cada variedad. Los arboles presentaban en promedio entre 7 y 11 años de edad. El café cereza fue transportado con hielo hasta las facilidades del beneficiado de la Estación Experimental Agrícola en Adjuntas, perteneciente al Recinto Universitario de Mayagüez. Posteriormente, el café fue despulpado usando un beneficio ecológico, secado al sol, para finalmente escoger el café libre de daño. Subsecuentemente, las muestras fueron transportadas hasta el Laboratorio de Plaguicidas del Departamento de Ciencias Agroambientales de la Universidad de Puerto Rico en Río Piedras, donde se almacenaron por 30 días en cámaras con gel de sílice, para controlar la humedad y evitar el sabor herbaceo del café.

Cada muestra se dividió en dos sub-muestras de aproximadamente 250 g cada una, la primera para el análisis de café verde-maduro, y la segunda, la de interés en esta investigación,

fue tostada al grado número 54 (tueste medio). Las muestras de café tostado fueron almacenadas al vacío dentro de bolsas plásticas y transportadas hasta el laboratorio de Investigación de Química de Alimentos a cargo de la Dra. María Plaza del Departamento de Ciencias Agroambientales. Este laboratorio está ubicado en el Centro de Innovación y Tecnología Agroindustrial de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez. Las muestras se almacenaron a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento previo de preparar los extractos para los análisis químicos, de actividad antioxidante, y evaluación sensorial.

4.2 Preparación de los extractos acuosos de café

Para la determinación de cafeína, ácidos clorogénicos y actividad antioxidante, se prepararon extractos acuosos a partir de las muestras de café tostado. Para ello el café en grano tal como se recibió, fue inicialmente molido usando un molino de café Cusinart® modelo DBM-8, hasta obtener un tamaño de partícula, tal que, del 70-75 % pasara por un tamiz No. 20, según la recomendación de la Sociedad Americana de Cafés Especiales (SCAA, por sus siglas en inglés) (SCAA, 2015).

Siguiendo el protocolo de Fujioka y Shibamoto (2008), muestras en triplicado de $3.5\text{ g} \pm 0.1\text{ g}$ de cada café molido fueron sometidas a extracción con 125.0 mL de agua en ebullición por 10 minutos, con agitación periódica. Luego de este periodo, se llevó a cabo una filtración por gravedad usando filtros de café, recogiendo el extracto acuoso de café (sobrenadante) en tubos de centrifuga de 50 mL.

4.3 Determinación simultánea de cafeína y ácidos clorogénicos por LC-DAD/MS/MS

La determinación simultánea de cafeína y los ácidos clorogénicos: 3-cafeoilquinico (3-CQA), 4-cafeoilquinico (4-CQA), 5-cafeoilquinico (5-CQA), 3,4-dicafeoilquinico (3,4-diCQA) y 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQA), fue llevada a cabo sobre los extractos acuosos de café obtenidos de acuerdo a la sección 4.2 por medio de un instrumento de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés). Previo al análisis cromatográfico los extractos acuosos fueron sometidos a un proceso de limpieza para eliminar material polimérico.

4.3.1 Limpieza de extractos

Para eliminar material polimérico de los extractos acuosos de café se siguió el procedimiento reportado por Fujioka y Shibamoto (2008). Para ello, estos fueron tratados con los reactivos de Carrez I y II, los cuales consisten, en una solución de ferrocianuro de potasio trihidratado y una de sulfato de zinc heptahidratado, respectivamente. Para eliminar el material polimérico, se combinó una alícuota de 3.00 mL de extracto, con 100 μ L de cada uno de los reactivos de Carrez I y II, y 800 μ L de metanol en un tubo de centrifuga. Esto fue mezclado por 10 segundos usando un agitador tipo “vortex” (VWR) y se dejó reposar por 10 minutos. El precipitado obtenido de este proceso, fue separado por centrifugación a 3000 x g por 10 minutos, usando una centrifuga Eppendorf modelo 5702 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante obtenido fue diluido 10 veces en agua grado HPLC y a su vez filtrado a través de un filtro de politetrafluoretileno (PTFE, por sus siglas en inglés) de 0.25 μ m.

4.3.2 Optimización de la técnica cromatográfica

La determinación simultánea de ácidos clorogénicos y cafeína fue llevada a cabo usando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent serie 1260 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). El mismo, está compuesto de: (1) un desgasificador de fase móvil, (2) una bomba binaria, (3) un inyector automatizado mantenido a 4 °C, (4) un compartimento de columna, (5) un detector de ultravioleta con arreglo de diodos (DAD) y (6) un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo 6410a (MS/MS). Este instrumento es controlado por medio del software Mass Hunter Workstation versión B.04.01.

Con el fin de obtener la mejor separación posible de los compuestos de interés, fue necesario optimizar las condiciones cromatográficas en fase reversa. Esto incluyó la evaluación de diferentes columnas de fase estacionaria C18 y la composición de la fase móvil. Se probaron las siguientes columnas: Dionex C18 (4.6 mm x 250 mm x 5 µm), Zorbax XDB C18 (4.6 mm x 150 mm x 5 µm), µBondapak C18 (3.9 mm x 150 mm x 10 µm) y Poroshell 120 C18 (3.0 mm x 50 mm x 2.7 µm). Con cada columna se probaron diferentes composiciones de fase móvil, tanto en modo isocrático, como modo gradiente, hasta conseguir la mejor separación en el menor tiempo de análisis posible. Los solventes ensayados para la fase móvil fueron ácido fórmico al 0.1% en agua, ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1% en metanol. El flujo se mantuvo constante en 0.9 mL/min. El transcurso de la optimización fue seguido con base en el cromatograma registrado a 276 nm.

4.3.3 Análisis cromatográfico usando LC-DAD/MS/MS

Para la separación cromatográfica de acuerdo a la optimización, se utilizó una columna Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 50 mm 2.7 µm) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA,

USA). La fase móvil consistió de dos solventes: ácido fórmico 0.1% en agua grado HPLC (A) y ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo (B). Para la separación de los compuestos se utilizó el siguiente gradiente: 0 minutos (2 %B), 5 minutos (5 %B), 8 minutos (6 %B), 11 minutos (12 %B), 13 minutos (18 %B), 15 minutos (24 %B), 16 minutos (27 %B), 17 minutos (30 %B), 17.5 minutos (35 %B), 18 minutos (2 %B). La velocidad de flujo de la fase móvil se estableció en 0.9 mL/min. Se usó un volumen de inyección de 1 µL. La temperatura de la columna se mantuvo en 35 °C. El detector de arreglo de diodos se programó a una longitud de onda de 276 nm para monitorear la cafeína y 325 nm para los ácidos clorogénicos.

El espectrómetro de masas equipado con una interface de ionización de “electrospray” (ESI, por sus siglas en inglés) fue operado en modo positivo para la detección de cafeína, y en modo negativo para los ácidos clorogénicos. La temperatura y flujo del nitrógeno se establecieron en 325 °C y 13 L/min, respectivamente, la presión del nebulizador fue de 60 psi, el voltaje de capilaridad negativa se configuró en 4000 V, mientras la de capilaridad positiva en 3500 V. Adicionalmente, con el fin de establecer los parámetros óptimos para la detección y cuantificación usando el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM, por sus siglas en inglés), los parámetros de voltaje del fragmentador y energía de colisión del espectrómetro de masas fueron optimizados para cada uno de los compuestos de interés usando sus respectivos estándares. La **Tabla 2** muestra los parámetros obtenidos de la optimización, junto con los precursores y fragmentos que fueron monitoreados en cada caso.

Tabla 2. Parámetros utilizados durante la cuantificación de cafeína y ácidos clorogénicos usando el modo MRM.

Compuesto	Masa molecular (g/mol)	Precursor (g/mol)	Fragmento (g/mol)	Voltaje del fragmentador (V)	Energía de colisión
Cafeína	194.2	195.1 [M+H]	138.0	123	16
3-CQA	354.1	353.1 [M-H]	191.0	102	8
4-CQA	354.1	353.1 [M-H]	173.0	113	8
5-CQA	354.1	353.1 [M-H]	191.0	118	12
3,4-diCQA	516.13	515.1 [M-H]	352.9	128	8
3,5-diCQA	516.13	515.1 [M-H]	353.0	123	8

4.4 Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las muestras de café fue medida sobre los extractos obtenidos en la sección 4.2. Se usaron dos técnicas para medir este parámetro: (1), ensayo de eliminación de radicales libres con 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en ingles); y (2), ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). A continuación se explica cada uno de estos métodos.

4.4.1 Ensayo de DPPH

En este ensayo, el radical DPPH[•] púrpura es reducido, bien sea, por compuestos reductores o antioxidantes donadores de hidrógeno, a su forma hidracina de color amarillo pálido. El transcurso de la reacción es monitoreado por el descenso en la densidad óptica a longitudes de onda entre 515 a 520 nm (Musa et al., 2013).

Para llevar a cabo el procedimiento, se siguió la metodología reportada por Andueza et al, (2004) con modificaciones. Se preparó una solución del radical DPPH 1.0×10^{-4} M en metanol, la cual debía tener una absorbancia de 1.0 ± 0.1 a 515 nm. En tubos de ensayo se mezclaron 3.90 mL de solución de DPPH, con 100 μ L de agua destilada (como blanco), muestra o estándar. Se dejó que la reacción transcurriera por 20 minutos, tiempo al cual se leyó la absorbancia a 515 nm

en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys (Thermo Electron Scientific Instruments, Madison, WI, USA). Para calcular la capacidad de secuestro de radicales (%CSR) de las muestras y estándares se usó la siguiente ecuación:

$$\%CSR = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100$$

Donde:

A_0 = Absorbancia inicial de la solución de DPPH medida a 515 nm.

A_f = Absorbancia a 515 nm de la solución de DPPH a los 20 minutos de adicionar blanco, muestra o estándar.

Para llevar a cabo la calibración se prepararon estándares de Trolox (2-acido carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) de concentración 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 μ M. Se construyó una gráfica de %CSR contra concentración de Trolox, y la ecuación de línea obtenida por regresión lineal se usó para convertir el %CSR en equivalentes de Trolox en μ mol/g de muestra (Zambrano, 2013).

4.4.2 Ensayo ORAC

La actividad antioxidante medida como capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en ingles), es también uno de los métodos más representativos de reacción de transferencia de hidrógeno. El mismo consiste en monitorear el descenso de la intensidad de fluorescencia por parte de la fluoresceína al ser atacada por una fuente de radicales peroxilo ($ROO^{\cdot}$). La actividad del agente antioxidante se mide por la habilidad del mismo en inhibir la reacción entre la fluoresceína y dichos radicales (Huang et al., 2005).

El ensayo efectuado sobre los extractos acuosos de café fue llevado a cabo con base al procedimiento automatizado reportado por Huang et al. (2002) y las modificaciones realizadas por Pérez (2011). Para ello se utilizó un lector de fluorescencia de microplato *f*Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) controlado por el software Ascent versión 2.6, configurado a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm. Inicialmente, se preparó una solución madre de Fluoresceína (Sigma-Aldrich) de 7.5×10^4 nM en solución amortiguadora de fosfato de pH 7.40 (75 mM). A partir de esta solución se preparó una solución de trabajo de 7.5×10^2 nM por dilución en el amortiguador de fosfato. Al igual que la fluoresceína, se preparó una solución del radical AAPH [2,2'-Azobis(2-amidinopropane) 2HCl] adquirido de Sigma-Aldrich, por disolución de 0.9000 g de este en 10.00 mL de amortiguador de fosfato. Adicionalmente, se prepararon estándares de Trolox de concentración 0.780, 1.560, 3.120, 6.200, 12.500, 25.000 y 50.000 μ M en amortiguador de fosfato.

El ensayo se llevó a cabo mezclando 100 μ L de fluoresceína, 50 μ L de blanco, muestra o estándar y 50 μ L del radical, en cada una de las 96 celdas de un microplato de poliestireno. Una vez preparado el plato se colocó de inmediato en el lector de fluorescencia a una temperatura de 37 °C, tomando lecturas cada 2 minutos por 70 minutos. Los valores de ORAC de blanco, muestras y estándares fueron obtenidos calculando el área bajo la curva (ABC), usando la siguiente ecuación:

$$ABC = 0.5 + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0} + \dots + 0.5 \frac{f_{35}}{f_0}$$

Donde f_0 es la lectura de fluorescencia inicial a 0 min y f_i la lectura de fluorescencia al tiempo i . El área bajo la curva neta fue obtenida sustrayendo el ABC del blanco del ABC de la muestra o estándar. Los valores finales de ORAC de las muestras (en μ M Trolox/g de muestra) son obtenidos a partir de la regresión lineal de una curva de calibración obtenida al graficar la

concentración de Trolox contra el promedio del área bajo la curva neta para cada nivel de concentración (Huang et al., 2002).

4.5 Evaluación sensorial

Para llevar a cabo la evaluación sensorial de las muestras de café en el atributo de amargo, se empleó un panel sensorial adiestrado. De manera que, esta parte consistió de dos fases, la primera de selección y adiestramiento, y la segunda la de evaluación de las muestras.

4.5.1 Selección y adiestramiento de panelistas

4.5.1.1 Selección de panelistas por medio de pruebas triángulo. Inicialmente, se convocó entre la comunidad de estudiantes, personal administrativo y profesores del programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Puerto Rico-Mayagüez un grupo de personas quienes mostraran gusto y no presentaran ninguna objeción desde el punto de vista de salud o religioso por el consumo de café. A dicha convocatoria acudieron entre 13 y 15 personas, grupo que se fue reduciendo por diferentes circunstancias.

Entre las personas que participaron continuamente del estudio se llevaron a cabo tres tipos de pruebas triángulo con soluciones estandarizadas de cafeína grado alimenticio (Spectrum Chemical), en un rango de dificultad de moderada a alta. Inicialmente, en la prueba de dificultad moderada a cada panelista se le entregaron tres soluciones de cafeína junto con un vaso con agua y una galleta de soda, para limpiar los receptores. En este nivel las concentraciones de las soluciones de cafeína fueron 0.2 y 0.8%. A cada panelista se le entregaron dos de estas muestras iguales y una diferente, identificadas con números de tres dígitos escogidos aleatoriamente.

Adicionalmente, a cada panelista se le proveyó una hoja de instrucciones en la que se le solicitaba identificar la muestra diferente. Esta prueba se repitió en dos ocasiones más. Este procedimiento fue repetido para las pruebas de mediana y alta dificultad, cambiando los pares de soluciones por concentraciones de 0.2 y 0.6%, y 0.2 y 0.4%, respectivamente. Cada persona llevó a cabo la evaluación en un cuarto dividido en cubículos individuales iluminado con luz blanca artificial. Para continuar las etapas siguientes de adiestramiento se seleccionaron los panelistas que obtuvieron 60% más de acierto en las pruebas "fáciles" y 40% o más en las pruebas "moderadamente difíciles" (Meilgaard, Civille, & Carr, 1999b). El porcentaje de acierto fue calculado para cada panelista en base a la razón del número de aciertos sobre el número total de pruebas realizadas a cada nivel.

4.5.1.2 Adiestramiento de panelistas por medio de pruebas de valoración de intensidad. Posteriormente se llevaron a cabo una serie de pruebas de valoración con diferentes niveles de cafeína, usando una escala lineal de 15 cm, donde 0 es nada amargo y 15 es más amargo. A cada panelista se le proveyeron cuatro soluciones de concentración 0.08, 0.12, 0.15 y 0.20% de cafeína. Cada una de las soluciones representaron valores de 5, 8, 10 y 15, respectivamente, en una escala lineal, conforme el método SpectrumTM (Muñoz & Civille, 1999). A los panelistas se les solicitó que degustaran cada una de las muestras tratando de recordar su concentración. Entre cada toma limpiaron sus paladares con agua y galleta.

Luego de 20 minutos, se repitió la prueba, pero esta vez presentando las mismas soluciones, identificadas con números de tres dígitos, siguiendo un diseño aleatorio, solicitando que asignaran un valor de amargo en la escala, basándose en las soluciones de concentración

conocida probadas previamente. Los panelistas fueron expuestos a la misma rutina entre 7 y 11 sesiones para un promedio de 5 horas por panelista.

Los panelistas fueron aceptados con base a su rendimiento teniendo como criterio los aciertos parciales y aciertos completos. El porcentaje de aciertos parciales fue determinado por la razón entre aciertos parciales sobre el total de pruebas aceptadas. Paralelamente, el porcentaje de aciertos completos se determinó como la razón de aciertos completos sobre el número total de pruebas válidas. Como aciertos parciales se consideraron las respuestas en las que se invirtieron dos muestras adyacentes, mientras que los completos fueron en los que se asignaron los valores en estricto orden.

4.5.1.3 Prueba de desempeño usando muestras de café. Para culminar la etapa de adiestramiento se hizo una serie de tres sesiones de pruebas triángulo usando muestras de café colado al que se le adicionó cafeína en diferentes niveles. El café se preparó empleando una cafetera Mr. Coffee TF-5 (Sunbeam Product, Inc., Boca Ratón, Fl, USA) en una proporción de 35 g de café molido por un litro de agua. En seguida, se adicionó la cantidad de cafeína indicada en la **Tabla 3** y las soluciones se almacenaron en termos manteniendo una temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de llevar a cabo la prueba. A cada panelista se le hizo entrega de tres muestras de café en vasos de poliestireno rotulados con números aleatorios de tres dígitos, dos de las muestras siendo igual en la cantidad de cafeína. Se le suministró una galleta y un vaso con agua para enjuagar el paladar entre cada toma de café y una hoja de instrucciones, en la que se le solicitaba probar cada muestra e indicar cuál era la diferente.

Tabla 3. Concentraciones de cafeína adicionadas al café colado en pruebas triángulo

Sesión	Concentración cafeína adicionada (%)	
	Muestra A	Muestra B
Primera	0.04	0.2
Segunda	0.04	0.12
Tercera	0.04	0.08

4.5.2 Evaluación del atributo de amargo en las muestras

La evaluación de amargo en las muestras objeto de la presente investigación por parte de panelistas adiestrados fue llevada a cabo por medio de una prueba de valoración, empleando una escala lineal de 15 cm, donde 0 es nada amargo, y 15 es más amargo. La evaluación se dividió en dos sesiones, una para las muestras de la variedad Borbón, y otra para la variedad Caturra. En cada una de estas, al panelista se le entregaron cuatro muestras de café colado (dos de zona alta y dos de zona baja) en vasos de poliestireno de 4 oz a una temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotulados con números aleatorios de tres dígitos. También se le proveyó un vaso con agua y una galleta de soda para limpiar el paladar. Se suministró una hoja de instrucciones en la que se les pidió que probaran y evaluaran cada una de las muestras, en términos de amargo, en estricto orden de entrega, comiendo galleta y tomando agua entre cada una. Para la evaluación utilizaría la escala lineal provista. Las muestras de café fueron preparadas siguiendo el protocolo de la **sección 4.5.1.3.**

4.6 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico para todos los resultados obtenidos fue llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con arreglo factorial, usando el paquete informático Infostat (Di Rienzo et al., 2011). El nivel de confianza utilizado fue del 95% ($\alpha=0.05$). Para la comparación

de las medias se usó la prueba de mínima diferencia significativa (LSD, por sus siglas en inglés).

Las hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_a) a probar fueron las siguientes, respectivamente:

H_0 = Hay interacción significativa entre los factores altura y variedad en cada uno de los parámetros evaluados (cafeína, ácidos clorogénicos, actividad antioxidante y grado de amargo)

H_a = No hay interacción significativa entre los factores altura y variedad en cada uno de los parámetros evaluados (cafeína, ácidos clorogénicos, actividad antioxidante y grado de amargo)

Adicionalmente, los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron calculados a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración por medio de las siguientes ecuaciones (Miller & Miller, 2005):

$$LOD = b + 3S_{y/x}$$

$$LOQ = b + 10S_{y/x}$$

Dónde,

b = intercepto

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \text{error aleatorio del intercepto}$$

$\hat{y}_i$ = son los valores de “y” sobre la línea de regresión calculada correspondientes a los valores de “x”.

5. DISCUSIÓN DE RESULTOS

5.1 Optimización de la técnica cromatográfica

Con el fin de desarrollar una técnica cromatográfica de LC-MS en fase reversa para el análisis simultáneo de cafeína y ácidos clorogénicos en extractos acuosos de café tostado, se comenzó por optimizar el método cromatográfico para así obtener una separación adecuada en el menor tiempo posible. Con tal fin, se probaron cuatro columnas con diferentes composiciones de fase móvil: C-18 Dionex C18, Zorbax- XDB C18, μ Bondpak C18 y Agilent Poroshell C18.

La **Figura 4** muestra la mejor separación posible obtenida usando la columna Dionex C18 en modo gradiente. De acuerdo a esta, un tiempo de análisis de 30 minutos no fue suficiente para eluir todos los compuestos de interés, pues se presentó retención de picos de los isómeros dicafeoilquínicos (3,4- y 3,5-), los cuales serían eluidos en ensayos posteriores como compuestos retenidos. Además, no hubo buena resolución entre el pico de 4-CQA y cafeína, lo que podría conducir a un solapamiento de sus señales causando interferencias.

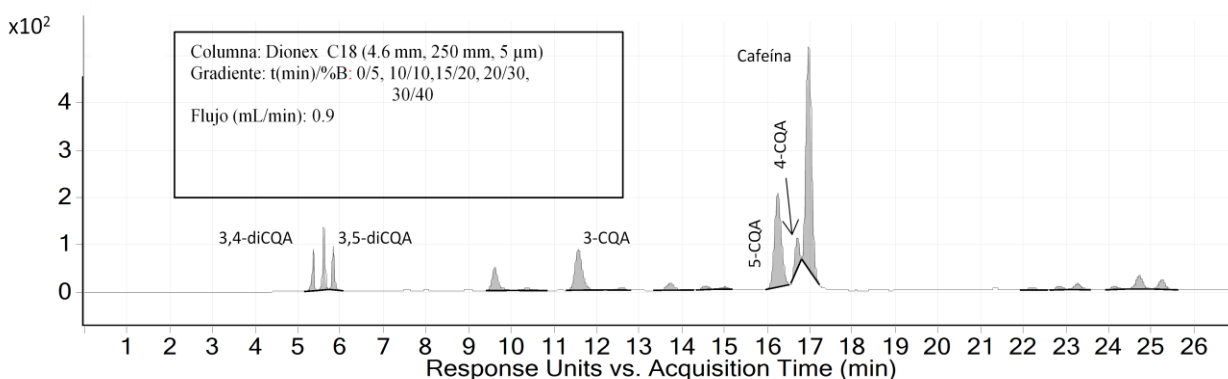


Figura 4. Separación cromatográfica usando la columna Dionex C18.

La **Figura 5** muestra la mejor separación posible obtenida usando la columna Zorbax XDB C18. Al contrario de la columna anterior fue posible eluir todos los compuestos de interés antes de 30 minutos de análisis. Sin embargo, aunque en menor medida, nuevamente se presentó una baja resolución entre los picos de 4-CQA y cafeína, lo que analíticamente no es adecuado, esto debido a que se pueden presentar interferencias al momento de llevar a cabo la cuantificación. Por el contrario, entre 3-CQA y 5-CQA se presentó una resolución apropiada. Dicha separación, fue posible luego de probar diferentes composiciones de la fase móvil tanto en modo gradiente como isocrático.

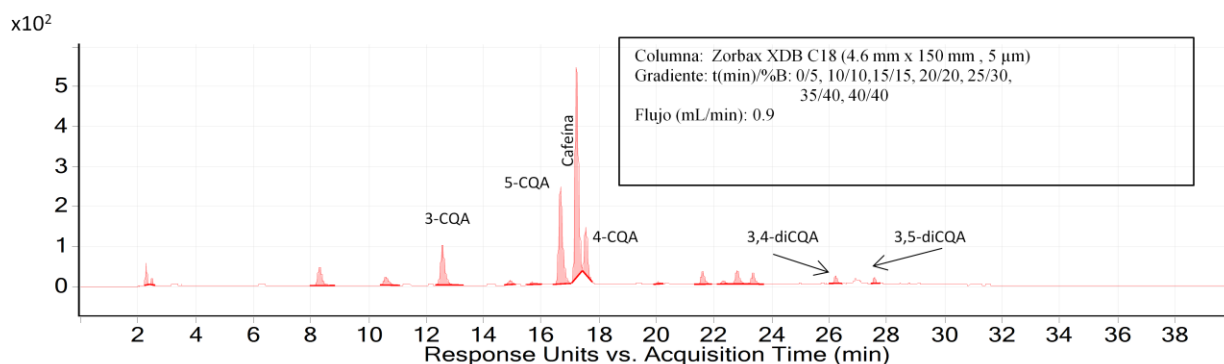


Figura 5. Separación cromatográfica usando la columna Zorbax XDB C18.

A continuación, se ensayó la columna μ Bondapak C18 con diferentes proporciones de fase móvil hasta conseguir la mejor separación posible, **Figura 6**. Aunque todos los compuestos eluyeron de la columna en un tiempo inferior de 30 minutos, se encontró que los picos de los isómeros de 4-CQA y 5-CQA se solaparon, dando como resultado un solo pico. Debido a la falta de resolución esta columna no fue considerada.

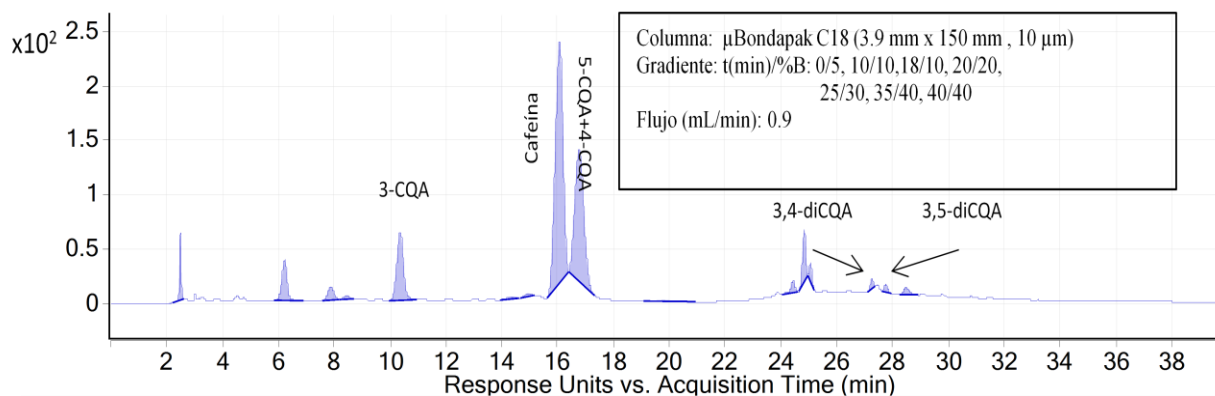


Figura 6. Separación cromatográfica usando la columna μ Bondapak C18.

Siguiendo con la optimización cromatográfica, se ensayó la columna Poroshell 120 C18, con diferentes proporciones de fase móvil. La **Figura 7** muestra la mejor separación posible obtenida luego de estos ensayos. Se destaca el hecho, que se consiguió la elución de todos los isómeros de ácidos clorogénicos, junto con la cafeína, en un tiempo de análisis menor de 20 minutos, cerca de 30% de menos tiempo en comparación con las otras columnas. Además, se consiguió una separación adecuada de todos estos, incluso superando los problemas presentados anteriormente de resolución entre cafeína, 4-CQA y 5-CQA. Esta columna mejoró la resolución, debido en parte a un menor tamaño de partícula, lo que genera un aumento en la eficiencia de la misma (Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997). Este tiempo de análisis, es mucho menor al conseguido por el método de referencia de 85 minutos a un flujo de 1.0 mL/min (Fujioka & Shibamoto, 2008). Adicionalmente, se ensayó metanol en lugar de acetonitrilo, el cual no mostró diferencias en la separación, pero produjo un aumento drástico en la presión de la bomba, por lo cual se descartó su uso para evitar desgaste significativo en el equipo bajo operación prolongada (resultados no mostrados). Dado a que se encontró buena separación con esta columna a las condiciones establecidas, se escogieron como óptimas para proseguir con los análisis de todos los extractos.

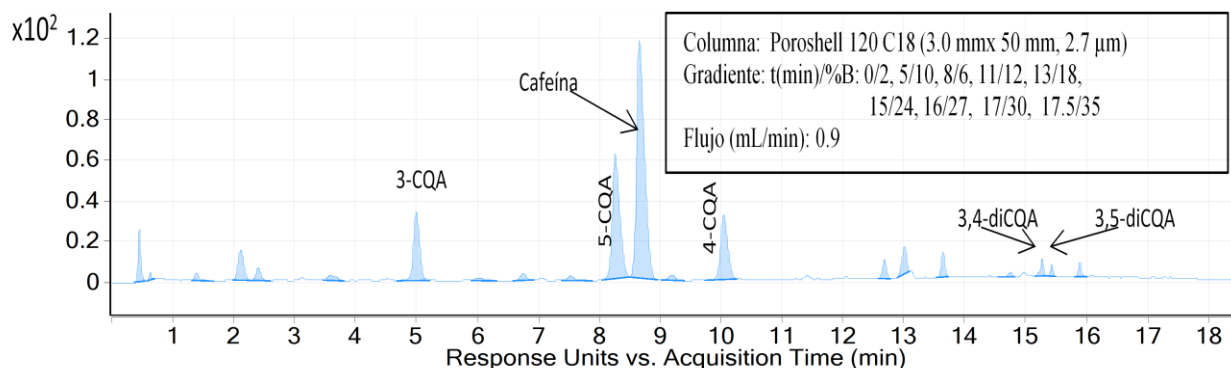


Figura 7. Cromatogramas de extractos acuosos de café con diferentes columnas

La identificación y confirmación de los compuestos de interés fue llevada a cabo por medio de la comparación cromatográfica con sus respectivos estándares, esto incluye: tiempo de retención y patrón de fragmentación (MS y MS²). Además de coincidir con los tiempos de retención de los estándares, los ácidos clorogénicos se caracterizaron por presentar espectros de UV con λ_{max} a 325 nm y la cafeína con λ_{max} a 273 nm, lo cual coincide con reportes en la literatura (Fujioka & Shibamoto, 2008; Mullen et al., 2011). Lo más importante fue el patrón de fragmentación, el cual para 3-CQA, 4-CQA y 5-CQA presentó el ión molecular (precursor) [M-H]⁻ de 353 m/z, mientras para 3,5-diCQA y 4,5-diCQA el mismo fue de 515 m/z (**Tabla 2**). La segunda fragmentación (MS²) de 3-CQA y 5-CQA presentó el ión de 191 m/z, mientras que 4-CQA presentó el fragmento de 173 m/z. Tanto 3,5- como 4,5-diCQA presentaron el ión de 353 m/z. Por otro lado, para la cafeína se encontró el ión molecular [M+H]⁺ de 195 m/z y para a MS² el ión 138 m/z. Los patrones de fragmentación encontrados para todos los compuestos comparan con reportes previos de la literatura (Mullen et al., 2011; Weimann, Sabroe, & Poulsen, 2005).

Como se mencionó en la **Sección 4.6**, se calcularon los límites de detección y cuantificación a partir de las curvas de calibración, **Tabla 4**. Para los ácidos clorogénicos analizados los límites

de detección y cuantificación variaron entre 0.0008 a 0.0039 g/100 g y 0.0027 a 0.0131 g/100 g, respectivamente. Por otro lado, para la cafeína los límites de detección y cuantificación fueron de 0.0068 g/100 g y 0.0227 g/100 g. Los límites de detección y cuantificación, implican las concentraciones de analito mínimas que pueden ser detectadas y cuantificadas, respectivamente, con confiabilidad analítica (Miller & Miller, 2005). Se espera que al cuantificar estos compuestos en las muestras de café, su concentración resulte superior al límite de cuantificación.

Tabla 4. Límites de detección y cuantificación para los ácidos clorogénicos y cafeína

Compuesto	Límite de detección (LOD) (g/100 g)	Límite de cuantificación (LOQ) (g/100 g)
Cafeína	0.0068	0.0227
Acido 3-cafeoilquinico	0.0008	0.0027
Acido 4-cafeoilquinico	0.0014	0.0046
Acido 5-cafeoilquinico	0.0013	0.0044
Acido 3,4-dicafeoilquinico	0.0037	0.0123
Acido 3,5-dicafeoilquinico	0.0039	0.0131

5.2 Determinación de cafeína

La determinación de cafeína en las muestras de café fue llevada a cabo simultáneamente a la de los ácidos clorogénicos por la técnica de LC-MS, evaluando el efecto que tienen los factores de variedad y altitud. Su importancia radica en el potencial efecto antioxidante de la cafeína (Pérez, Chávez, Medina, & Gámez, 2012), además que es un parámetro termoestable que se usa como indicador para distinguir entre especies (De Souza & Benassi, 2012).

La **Figura 8** muestra los resultados del contenido de cafeína en las muestras de café evaluadas, destacándose que se presentó interacción significativa entre los efectos de variedad y altitud ($p < \alpha = 0.05$). El contenido de cafeína varió en un rango de 0.70 a 0.78 g/100g. Se presentó un contenido significativamente mayor para la variedad Caturra sembrada en zona alta, seguida de la variedad Borbón de origen en la misma zona con una concentración de 0.75 g/100 g. Las

mismas variedades, pero sembradas en zona baja fueron significativamente menores con valores de 0.70 y 0.71 g/100g para Borbón y Caturra, respectivamente. Los valores de la variedad Borbón en zona alta son alrededor de un 45% menores a los reportados para la misma por Kitzberger y col. (2013) bajo condiciones similares de altitud, en tanto la variedad Caturra presenta valores aproximadamente 46% menores a los reportados por el mismo autor para la variedad Catuai (cruce entre Caturra y Mundo novo). Valores para la variedad Caturra son en menor medida diferentes a los reportadas por De Souza y Benassi (2012) para las variedades Catuai y Mundo novo, quien además reporta valores de 2.0 g/100 para diferentes variedades de la especie *canaephora*. Las diferencias con dichos reportes pueden deberse a que en el primero se usó una mezcla de agua y acetonitrilo para llevar a cabo la extracción de cafeína, mientras que en el segundo, se evaluó el extracto clorofórmico. Los valores de cafeína encontrados para los cafés evaluados permitirían hacer una discriminación entre especies.

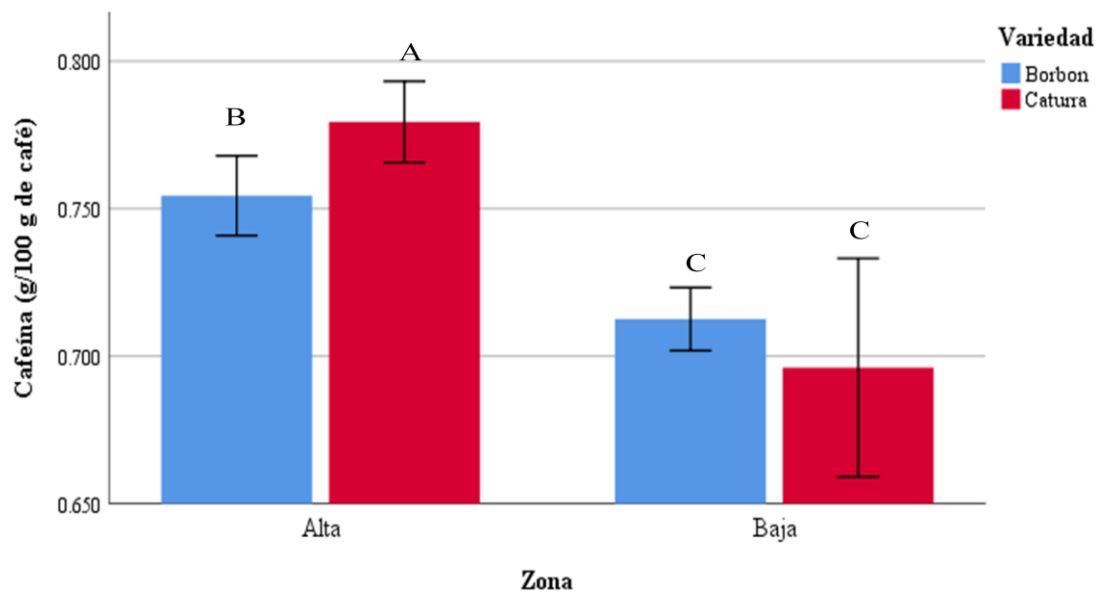


Figura 8. Contenido de cafeína en las muestras de café evaluadas. (Los resultados son expresados como media $\pm$ 2 error estándar. Medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)).

Del análisis estadístico (**Apéndice 9.13.1**) se puede notar que sin considerar el efecto de la variedad, en zona alta se presentó significativamente un mayor contenido de cafeína. Por el contrario, al evaluar el efecto de la variedad sin considerar la altitud, no se presentó diferencia significativa entre las dos variedades, lo que permite establecer que tiene un mayor efecto la altitud que la variedad en el contenido de café. La tendencia observada en términos de la zona de cultivo es comparable a la reportada por Lara (2005), Guyot y colaboradores (1996) y Decazy y colaboradores (2003) quienes establecieron una correlación positiva entre el contenido de cafeína y la altitud; lo cual se explica por el hecho de que a mayor altitud se presentan granos de café más grandes y pesados, favorecido por una disminución en la temperatura que promueve un mejor desarrollo de la cereza (Lara, 2005).

5.3 Determinación de ácidos clorogénicos

Usando la técnica de LC-MS se determinaron simultáneamente los siguientes ácidos clorogénicos: transclorogénico (3-CQA), criptoclorogénico (4-CQA), neoclorogénico (5-CQA), isoclorogénico A (3,5-diCQA) e isoclorogénico B (3,4-diCQA). Al igual que con la cafeína, se evaluó el efecto de la altitud y variedad de la cosecha en el contenido de estos sustratos en los granos de café tostado. La importancia de esta determinación está en los efectos beneficiosos a la salud de estos compuestos, y su contribución al sabor amargo de la bebida preparada.

La **Figura 9** muestra los resultados promedios de la concentración de cada uno de los ácidos antes mencionados en los granos de café, así como, la suma de estos expresada como ácidos cafeoilquínicos totales (CQT). Dichos resultados muestran que hubo interacción entre variedad y altitud para 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA 3,5-diCQA y CQT, pero no así para 3,4-diCQA (**Apéndice 9.13.2 a 9.13.7**). La concentración de 5-CQA varió de 0.55 a 0.87 g/100 g; la de 4-CQA varió de

0.29 a 0.44 g/100 g; el contenido de 3-CQA se encontró en un rango de 0.24 a 0.37 g/100 g. La concentración de 3,5-diCQA osciló entre 0.014 y 0.026 g/100 g. El ácido clorogénico 3,4-diCQA presentó valores de concentración entre 0.015 y 0.017 g/100 g. Por último, el parámetro CQT presentó un valor mínimo de 1.11 g/100 g y máximo de 1.71 g/100 g.

De la **Figura 9** se destaca que, sin importar la variedad o altitud del cultivo, el 5-CQA fue el ácido predominante, siendo aproximadamente dos veces mayor que 4-CQA y 3-CQA, y unas cuatro veces mayor que 3,5-diCQA y 3,4-diCQA (Apendice 9.1.2. Esta tendencia es similar a la reportada por otros autores, tales como, Fujioka y Shibamoto (2008), Trugo y Nogueira (2003), Monteiro y Farah (2012), quienes reportan que el contenido de ácidos clorogénicos va de menor a mayor en el siguiente orden: 3,5-diCQA≤3,4-diCQA<3-CQA<4-CQA<5-CQA.

En general para todos los parámetros, exceptuando el 3,4-diCQA, en el que no hubo interacción de altitud y variedad, el contenido de ácidos clorogénicos fue significativamente más alto ($p<\alpha=0.05$) en zona alta que en zona baja para cada una de las dos variedades evaluadas. Dicha influencia de la altura, ya visto en cafeína, ha sido previamente reportada en la literatura por Lara (2005), quien documentó que a mayor altitud se consiguen granos más grandes y pesados, lo que a su vez redundaba en una mayor acumulación de ácidos clorogénicos.

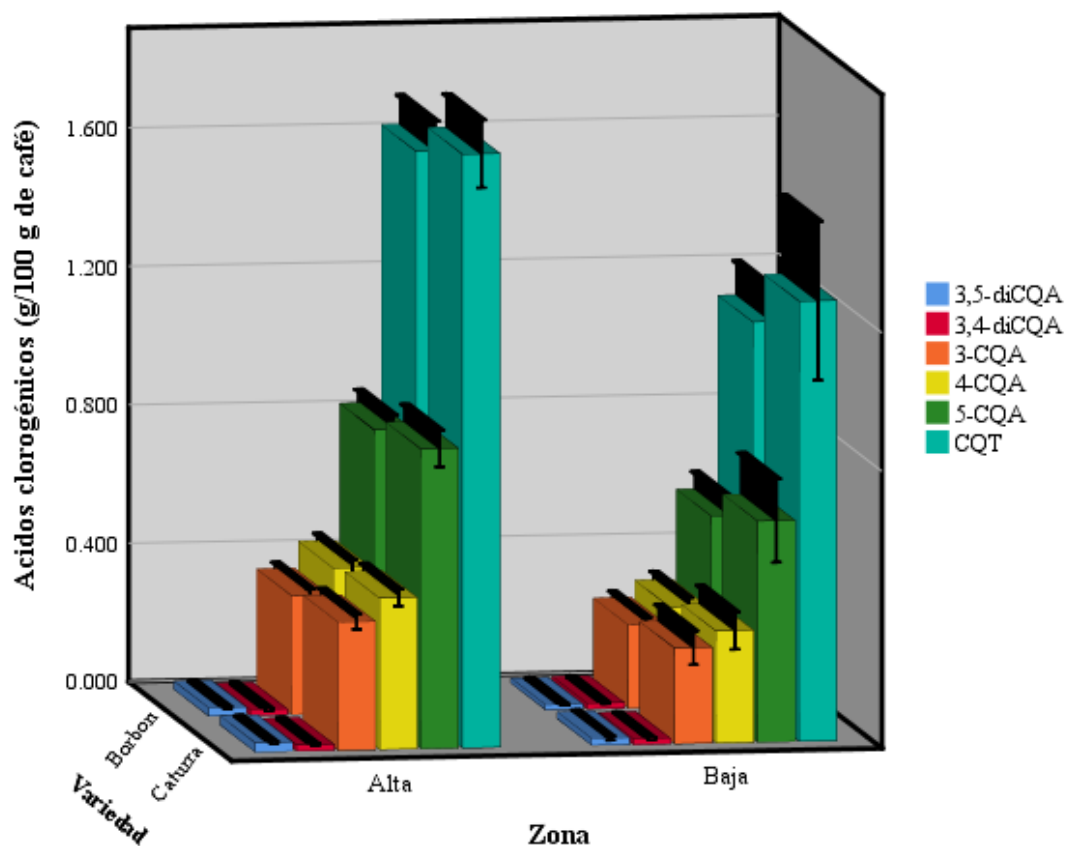


Figura 9. Contenido de ácidos clorogénicos en las muestras de café. (Los resultados son expresados como media $\pm$ 2 error estándar).

5.4 Actividad antioxidante

5.4.1 Ensayo ORAC

De acuerdo a los resultados de la determinación de actividad antioxidante por el método ORAC que se muestran en la **Figura 10**, se puede establecer que las muestras de café evaluadas presentaron actividad antioxidante y que hubo interacción variedad*altitud ($p < \alpha = 0.05$) (**Apéndice 9.13.8**). Los valores promedios encontrados variaron en un rango de 888.44 a 1189.04 $\mu\text{molTE/g}$ de café, siendo la variedad Caturra de zona alta quien presentó

significativamente la mayor actividad con 1189.04 $\mu\text{molTE/g}$ de café respecto a la variedad Borbón tanto en zona alta como zona baja con valores de 1092.00 y 888.44 $\mu\text{molTE/g}$ de café, respectivamente. En cuanto a la variedad caturra de zona baja que presentó un valor de 1123.49 $\mu\text{molTE/g}$ de café solamente resultó ser significativamente mayor a la variedad Borbón de zona baja. Evaluando el efecto de los factores altitud y variedad, resultó que a mayor altitud se presenta significativamente la mayor actividad ORAC, en tanto que la variedad Caturra presenta significativamente mayor valor ORAC.

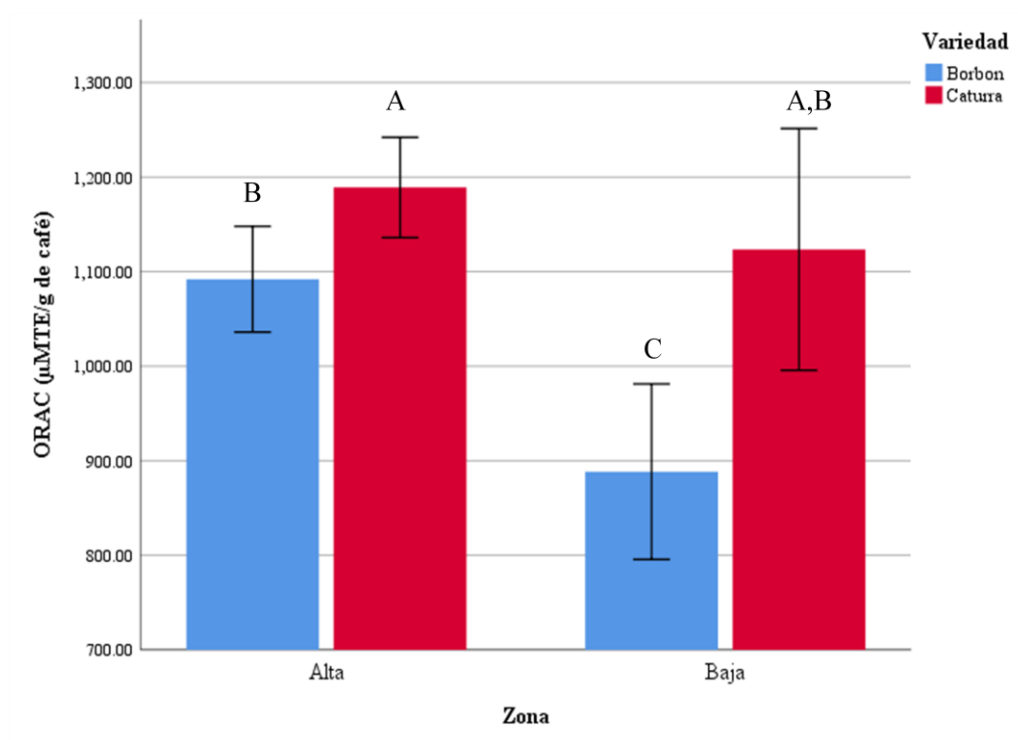


Figura 10. Capacidad antioxidante ORAC en las muestras de café evaluadas. (Los resultados son expresados como media $\pm$ 2 error estándar. Medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)).

Los valores para Caturra, tanto de zona baja como alta, y Borbón de zona alta mostrados en la **Figura 10** son similares a los reportados en el estudio de Liu y Kitts (2011), quienes para extractos acuosos de café tostado a 210 °C y 240 °C obtuvieron valores de 1390 y 1120

$\mu\text{molTE/g}$ de café, respectivamente. En contraste, para café verde se presentó un valor de 2500 $\mu\text{molTE/g}$.

La tendencia lineal entre altitud y ORAC coincide con la mostrada entre ácidos clorogénicos y cafeína con este factor. Esto se puede explicar con base al estudio de Gómez-Ruiz y colaboradores (2007), quienes encontraron que los compuestos presentes naturalmente en café, tales como ácidos clorogénicos, ácido cafeíco, ácido vainilínico y ácido ferulíco mostraron los mayores valores de ORAC, en tanto que la cafeína mostró una actividad moderada contra el radical peroxilo. Por otro lado, en el estudio de José y colaboradores (2014), la cafeína mostró ser responsable del 67.1% de diferencia entre la actividad mostrada entre café descafeinado y café regular. Del mismo modo, Mullen y colaboradores (2011) encontraron una correlación estadísticamente significativa entre el contenido de ácidos clorogénicos totales en extractos y polvos de frutos de café y su habilidad para atrapar radicales como el peroxilo, hidroxilo, peroxinitrato, además de oxígeno singlete (especie reactiva de oxígeno molecular). El hecho que se presente una tendencia creciente entre los factores altitud, ORAC, ácidos clorogénicos y cafeína, se puede explicar con base al estudio de Lara (2005), quien encontró que cafés de zonas altas presentan granos de mayor tamaño y volumen, por consiguiente, esto resulta en una mayor acumulación de estos metabolitos.

Liu & Kitts (2011) encontraron que, aunque después del proceso de tueste los ácidos clorogénicos son degradados en más de un 90% en comparación al café verde, la actividad antioxidante de extractos acuosos de café tostado es influenciada principalmente por la presencia de productos de la reacción de Maillard, especialmente melanoidinas. De acuerdo a los autores, estos compuestos exhiben actividad contra los radicales peróxilo en el ensayo ORAC por la transferencia de átomos de hidrógeno a los radicales oxígeno.

Teniendo en cuenta la caracterización química realizada previamente a las muestras de café en estado verde-maduro analizadas en esta investigación (Dumas, Acín, & Flores, 2013), donde se reportan como aminoácidos libres predominantes a serina y glutamina independientemente de la variedad y altura, además de la presencia del azúcar reductor, glucosa, se espera la formación de productos de la reacción de Maillard durante la torrefacción. La formación de estos productos pudo ser comprobada por Liu & Kitts (2011) al comparar los espectros UV y de fluorescencia de extractos de café tostado, café verde y un modelo de reacción entre serina y arabinosa (azúcar reductor), encontrando una gran influencia de los espectros de estos últimos con los de café tostado. Por el contrario el espectro del café verde presentó mayor similitud al de estándares de ácidos clorogénicos.

5.4.2 Ensayo DPPH

La actividad antioxidante medida por el método del radical DPPH que fue originalmente desarrollada por Brand-Williams y colaboradores (1995), consiste en medir la reducción de la absorbancia del radical DPPH (amarillo) a 515 nm a medida que este reacciona con especies oxidantes. La **Figura 11** presenta los resultados obtenidos para las muestras de café de la variedad Borbón y Caturra a cada una de las alturas estudiadas. De acuerdo al análisis estadístico se presentó interacción Variedad*Altitud ($p < \alpha = 0.05$) (**Apéndice 9.13.9**). Los valores de DPPH para las cuatro combinaciones variaron en un rango de 1470.36 a 1757.48 $\mu\text{molTE/g}$ de café. La variedad Borbón de zona alta presentó un valor significativamente mayor, con 1757.48 $\mu\text{molTE/g}$ de café, seguido por la variedad Caturra de la misma zona con 1595.57 $\mu\text{molTE/g}$ de café. Esta última, aunque es ligeramente mayor, no presentó diferencia estadísticamente significativa con la variedad Borbón de zona baja, la cual obtuvo un valor de actividad

antioxidante de 1555.87 $\mu\text{molTE/g}$ de café. Finalmente, la variedad Caturra de zona baja presentó significativamente la menor actividad antioxidante por el método DPPH entre los tratamientos evaluados, con un valor de 1470.36 $\mu\text{molTE/g}$ de café.

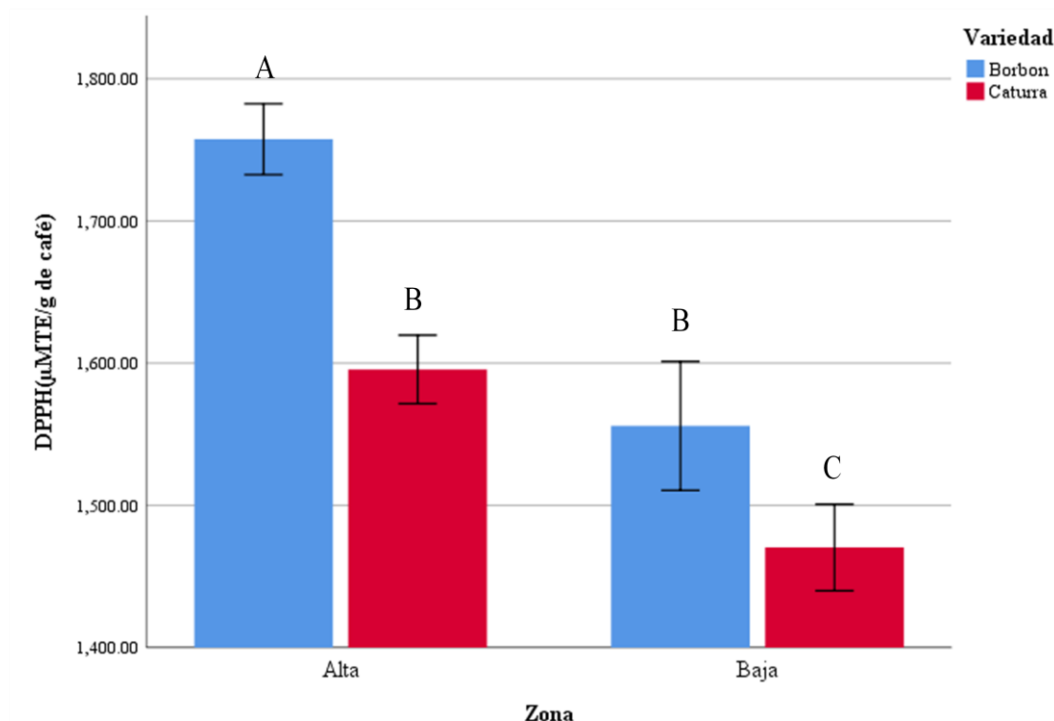


Figura 11. Capacidad antioxidante DPPH en las muestras de café evaluadas. (Los resultados son expresados como media $\pm$ 2 error estándar. Medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)).

En términos del efecto altitud, sin considerar la variedad, las muestras de zona alta mostraron una actividad DPPH significativamente mayor que su contraparte de zona baja. Esta tendencia es igual a la presentada por la actividad antioxidante determinada por el método ORAC. Sin embargo, en este caso las dos muestras de zona alta fueron mayores a las de zona baja, contrario al análisis ORAC, donde la muestra de la variedad caturra de zona baja presentó un valor de ORAC ligeramente mayor que la de la variedad Borbón.

Dicho contraste entre los resultados de DPPH y ORAC son similares a los presentados en el estudio de Kwak y colaboradores (2017), quienes obtuvieron para DPPH y ORAC diferentes superficies de respuesta para los factores de tiempo y temperatura de tostado de café. Mientras DPPH presentó una superficie de respuesta lineal, ORAC presentó una forma cuadrática. Aunque para el efecto del flujo de aire para tiempo y temperatura fueron similares para ORAC y DPPH, la superficie de respuesta de ORAC presentó un efecto cuadrático ligeramente más fuerte que DPPH para el flujo de aire. Estos autores infieren que esta discrepancia en los resultados puede ser debido a la diferencia en las rutas por las que se conducen los dos ensayos.

Roy y colaboradores (2010) igualmente encontraron una baja correlación entre ORAC y DPPH en la capacidad antioxidante total de extractos de té y catequinas individuales, sugiriendo que tal tendencia puede ser debida a la sustitución del OH en la posición 3' en el grupo pirogalol. Este hallazgo los llevó a hipotetizar que sustancias con bajo valor ORAC comparadas con aquellas en el ensayo DPPH pueden estar relacionadas con un efecto pro-oxidante debido a la generación de especies de oxígeno reactivas en un amortiguador acuoso a pH fisiológico, como lo son las condiciones de ORAC.

Más allá de los contrastes mostrados entre los resultados de los ensayos ORAC y DPPH para los resultados individuales, en términos del factor altura, hay una tendencia paralela entre los resultados de los dos ensayos, pues en ambos se presenta una actividad significativamente mayor en las muestras de zona alta. Esta tendencia también correlaciona positivamente con el mayor contenido de cafeína y ácidos clorogénicos, principalmente 5-CQA en zona alta. Como se ha mencionado previamente estos compuestos presentan actividad antioxidante (Gómez-Ruiz et al., 2007). Sin embargo, aunque el contenido de ácidos clorogénicos disminuye drásticamente durante la torrefacción, la actividad antioxidante es compensada por la formación de productos

de la reacción de Maillard, los cuales están involucrados en mecanismos de transferencia de electrones a oxidantes, como es el caso del ensayo DPPH (Liu & Kitts, 2011).

5.5 Análisis sensorial (grado de amargo)

Con el fin de realizar una evaluación sensorial para el atributo de amargo de las muestras de café objeto de esta investigación fue necesaria la selección y adiestramiento de un grupo de panelistas. Para ello inicialmente se convocó a un grupo de 14 personas de las cuales por medio de pruebas triángulo de soluciones estándares de cafeína, se seleccionó un mínimo de siete evaluadores. La selección se basó en el desempeño de los panelistas acorde a parámetros mínimos. Luego de la selección se procedió con el adiestramiento por medio de pruebas de valoración.

5.5.1 Selección y adiestramiento de panelistas

5.5.1.1 Selección de panelistas por medio de pruebas triángulo. Durante la fase de selección de panelistas para la evaluación sensorial, se presentaron voluntariamente catorce candidatos, los cuales fueron convocados por medio de correo electrónico entre estudiantes, personal docente y no docente del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UPR-RUM). Estas personas fueron sometidas a un total de 7 sesiones de pruebas triángulo con soluciones estándares de cafeína, de las cuales 3 se consideraron como fáciles, y las 4 restantes como de nivel difícil. De acuerdo a la **Figura 12** en las tres primeras pruebas (fáciles) de los catorce panelistas, trece las realizaron todas. De estos trece panelistas el 64% (9) tuvieron un porcentaje de acierto o rendimiento de 100%. Un 21% (3) de los evaluadores tuvieron un

rendimiento de 67%. Un 7% (1) de los panelistas presentó un porcentaje de acierto tan bajo como 33%.

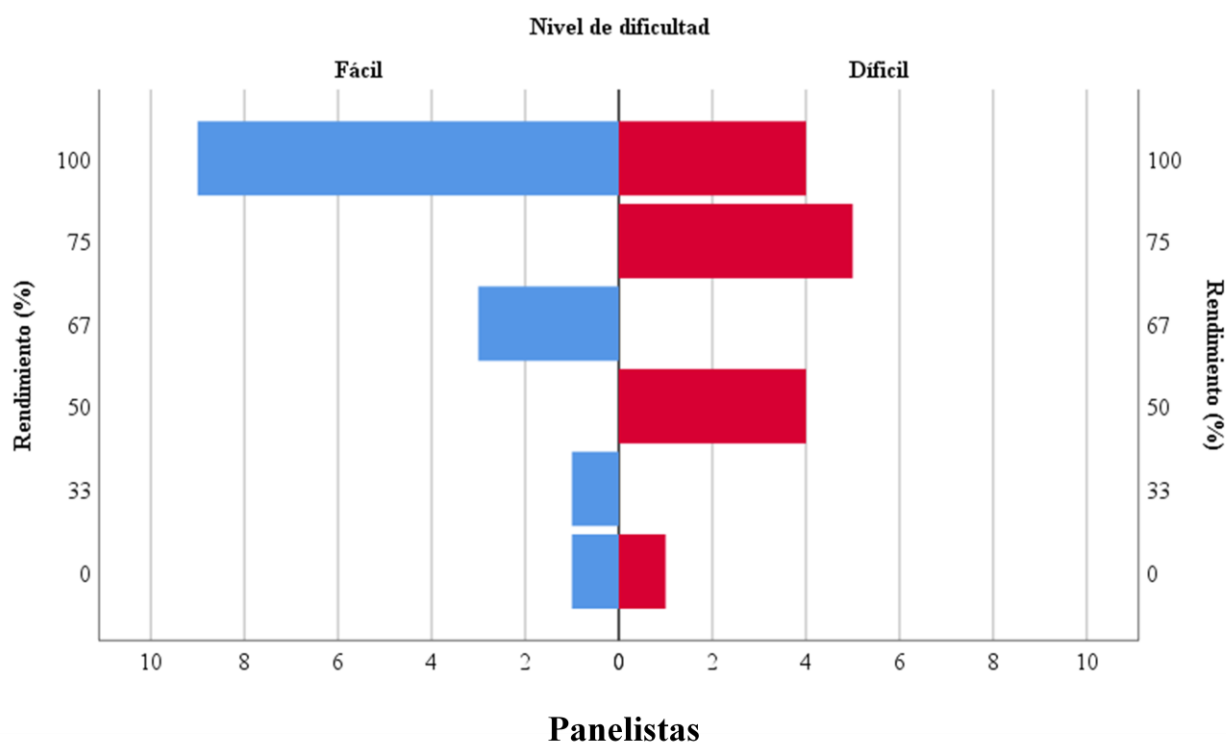


Figura 12. Respuestas y rendimiento de panelistas en las pruebas triángulo.

Del mismo modo, la **Figura 12** muestra que al pasar a las cuatro sesiones de mayor dificultad, 79% de los panelistas (11) participaron en todas, mientras el 14% (2) presentaron dos, en tanto que el panelista 14 no ofreció ninguna, por lo que se rechazó automáticamente. Se nota que al aumentar la dificultad de las pruebas decreció el porcentaje de rendimiento de acierto de los panelistas. En este caso 29% (4) de los mismos obtuvieron un rendimiento de 100%, y 36% (5) de ellos presentaron un porcentaje de acierto de 75%. Solo un 29% (4) de las personas acertaron en 50% de las pruebas.

Con base en los resultados mencionados anteriormente se decidió seleccionar a los panelistas 1 a 13 para continuar a la fase de adiestramiento. Esta selección se hace usando como criterio un 60% de rendimiento en las pruebas fáciles y un 40% de cierto en las difíciles (Meilgaard, Civille & Carr, 1999b). Sin embargo, se hizo una excepción con el panelista 4, el cual obtuvo un 33% de acierto en las sesiones fáciles, pero mejoró su rendimiento en las de mayor dificultad estando muy por encima del requisito mínimo de 40%.

5.5.1.2 Adiestramiento de panelistas por medio de pruebas de valoración de intensidad. De acuerdo a la sección anterior se seleccionaron los panelistas 1 a 13 para recibir adiestramiento en pruebas de valoración del atributo amargo. Para este proceso los panelistas fueron sometidos a sesiones en las que se les entregaban cuatro soluciones estándares de cafeína de valoración conocida, junto con las mismas soluciones pero en forma aleatoria. Las soluciones entregadas eran de valor de amargo 5, 8, 10 y 15, según el método SpectrumTM (Muñoz & Civille, 1999), dichas soluciones equivalen a concentraciones de cafeína de 0.08%, 0.12%, 0.15% y 0.20%, respectivamente. Este método permite discriminar cambios de intensidad con base al atributo de interés. Al mismo tiempo, se le proveyó a los panelistas familiarización en el uso del tipo de escala lineal que se usó en la evaluación de las muestras.

La **Figura 13** muestra los resultados consolidados a lo largo de 11 sesiones realizadas entre los panelistas. De antemano, fueron descalificados para etapas posteriores los panelistas 10 al 13, pues asistieron a menos del 60% de las sesiones, mostrando en determinado momento falta de motivación o intención de participar, lo que limitaría su consistencia en el adiestramiento. Para los demás panelistas se consideraron como criterios de buen desempeño el asignar el mismo valor a la solución desconocida con base al estándar (aciertos completos) y/o invertir dos

soluciones adyacentes (aciertos parciales) (Meilgaard, Civille & Carr, 1999b). Conforme la **Figura 13**, la mayoría de panelistas, excepto el número 5, estuvieron entre 80 y 100% de rendimiento conforme a los parámetros de aceptación establecidos, sugiriendo que los panelistas presentaron buen desempeño a lo largo del adiestramiento y son buenos candidatos para llevar a cabo la evaluación del atributo de amargo en las muestras.

Figura 13. Respuestas y rendimiento de panelistas en las pruebas de valoración.

5.5.1.3 Prueba de desempeño usando muestras de café. Previo a someter la evaluación de las muestras por parte de los panelistas adiestrados, estos llevaron a cabo una serie de pruebas triángulo usando muestras de café alteradas con la adición de cafeína, esto con el fin de verificar la capacidad de los evaluadores para determinar la diferencia en el atributo en presencia de la matriz. La **Figura 14** resume los resultados para las tres sesiones a las que fueron sometidos los

9 panelistas seleccionados y adiestrados. En general los panelistas mostraron la habilidad de distinguir diferencias en el atributo de amargo aun en presencia de café, una matriz que resulta ser compleja por la diversidad en su composición química. Un 33% (3) de los panelistas obtuvieron un rendimiento de 100%, 11% (1) de los panelistas presentaron 75% de acierto, seguidos por un 56% (5) que alcanzaron un nivel de 67% de efectividad. Conforme a los criterios de selección de panelistas de 40% y 60% en pruebas fáciles y difíciles, respectivamente, se entiende que todos los candidatos estuvieron por encima de dichos requisitos.

Figura 14. Resultados de las pruebas triángulo de muestras de café con la adición de cafeína.

5.5.2 Evaluación sensorial de las muestras

La prueba de valoración del atributo de amargo de las muestras fue llevada a cabo por parte de los panelistas adiestrados por medio de una escala lineal de 15 cm, usando como valores de

referencia los estipulados por el método SpectrumTM para soluciones estándares de cafeína. De acuerdo a la **Figura 15** se presentó interacción entre variedad y altura para el grado de amargo (**Apéndice 9.13.10**). Para los panelistas las muestras de las variedades Caturra y Borbón de zona alta con valores de 6.33 y 5.94, respectivamente, presentaron significativamente el mayor grado de amargo. Así mismo, los evaluadores asignaron significativamente el menor grado de amargo a la variedad Caturra de zona baja con un valor de 3.44, siendo casi la mitad de su par de zona alta. A la muestra Borbón a esta misma altura, se le asignó un valor intermedio de 5.39, el cual no fue significativamente diferente a los otros tres.

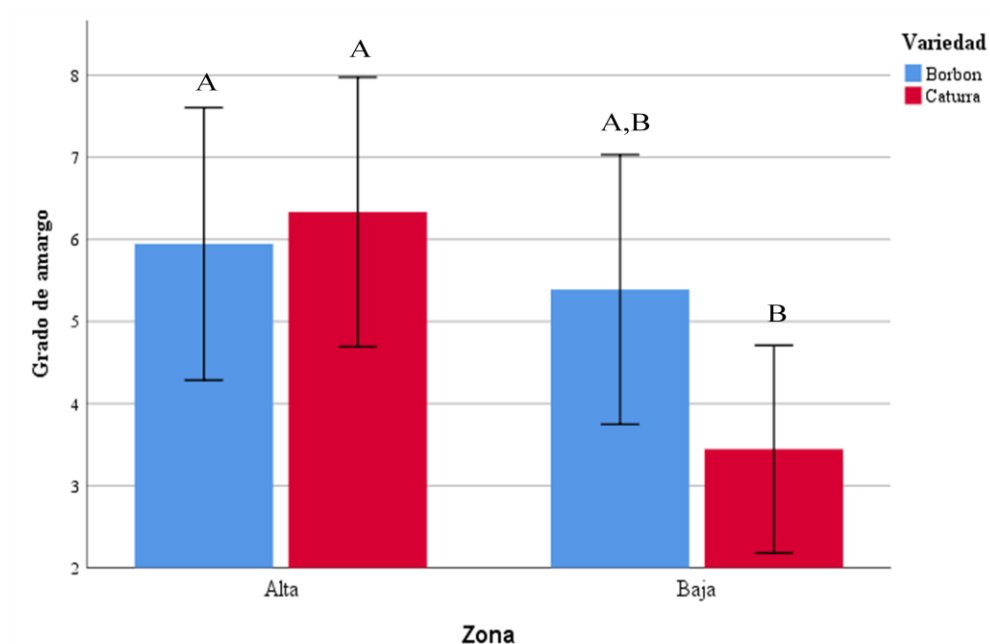


Figura 15. Resultados de la valoración del grado de amargo de las muestras de café. (Los resultados son expresados como media $\pm$ 2 error estándar. Medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)).

Aunque la valoración de amargo recibida para la muestra *Borbón* de zona baja no resultó ser significativamente diferente a las otras tres, se nota una tendencia que a mayor altura los panelistas percibieron un mayor grado de amargo. De hecho, el análisis estadístico corrobora que

para el factor altura, el grado de amargo es significativamente mayor en zona alta que en zona baja.

Este comportamiento coincide con la tendencia mostrada para el contenido de ácidos clorogénicos y cafeína, los cuales fueron significativamente mayor en zona alta. La cafeína puede aportar en un 10% al amargo percibido en la bebida, aunque esta característica sensorial puede ser difícil de distinguir incluso para un panel adiestrado. Esto debido a la astringencia causada por los compuestos fenólicos. Similarmente, los isómeros monoesteres de ácidos clorogénicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA) contribuyen al atributo de amargo, contrario a los diesteres (3,4-diCQA y 3,5-diCQA) que aportan a la astringencia (Flament, 2002).

Una tendencia similar fue obtenida entre el grado de amargo brindado por un panel adiestrado y contenido de cafeína en muestras de café *arábica* de Puerto Rico tratadas enzimáticamente y no tratadas. Las muestras que recibieron menor valoración en una escala lineal de 0 a 15, presentaron un contenido inferior de cafeína y ácidos clorogénicos (Martínez, 2007). Similarmente, Lara (2005) encontró una correlación significativa entre ácidos clorogénicos, cafeína y amargo de la bebida de café.

6. CONCLUSIONES

Se desarrolló y optimizó una metodología analítica por LC-MS para llevar a cabo la determinación simultánea de cafeína y los isómeros de ácidos clorogénicos: 5-CQA, 4-CQA, 3-CQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA. La principal ventaja radica en que el tiempo de análisis es menor de 20 minutos por muestra. Este corto tiempo de análisis provee una economía de recursos, por el bajo consumo de solventes y tiempo. Adicional se obtuvieron límites de detección y cuantificación muy inferiores a los contenidos de estos compuestos en las muestras evaluadas.

Entre las muestras de café de las variedades *Caturra* y *Borbón* sembradas a dos altitudes: una baja y una alta, se encontró que sin importar la zona de cultivo o variedad, los isómeros de ácidos clorogénicos analizados presentaron en orden decreciente el siguiente patrón en términos de composición: 5-CQA>4-CQA>3-CQA>3,5-diCQA>3,4-diCQA.

El contenido de los isómeros 5-CQA, 4-CQA, 3-CQA y 3,5-diCQA varió significativamente entre las variedades y las alturas, siendo mayor para las muestras provenientes de zona alta. Incluso, en las muestras de zona alta hubo una diferencia de casi el doble con relación a la zona baja. La altitud mostró ser el principal factor en afectar el perfil de ácidos clorogénicos.

El contenido de cafeína varió significativamente con la altura. Las muestras de zona alta presentaron un valor de cafeína significativamente mayor. Este comportamiento es comparable a los resultados obtenidos con los ácidos clorogénicos.

Se logró seleccionar un subgrupo de 9 personas por cernimiento de un grupo de 13, mediante el uso de diferentes pruebas triángulo de diferencia en atributo de amargo, las cuales mostraron un nivel de respuesta acorde a parámetros recomendados. Luego de esto, los panelistas escogidos fueron sometidos a un adiestramiento en el que mostraron igualmente un buen rendimiento en las pruebas a las que se les sometió, acorde con los parámetros estipulados.

De acuerdo a los resultados de la prueba de valoración del atributo de amargo llevada a cabo por parte de los panelistas adiestrados, se encontró que este atributo varió significativamente con la altura. En promedio los panelistas determinaron que las muestras de zona alta presentaron significativamente el mayor grado de amargo, esto sin considerar el efecto variedad. Esta tendencia coincide con la presentada por los ácidos clorogénicos y cafeína, sustratos asociados al descriptor de amargo.

Se midió la actividad antioxidante en extractos acuosos de café por dos metodologías, ORAC y DPPH. En ambas se encontró que la actividad antioxidante presentó diferencias significativas con la variedad y altitud. En general, las muestras de altura presentaron significativamente mayor actividad antioxidante medida por las dos metodologías. Este comportamiento es debido en parte al hecho que los ácidos clorogénicos y la cafeína presentan actividad antioxidante, y los mismos se encuentran en mayor cantidad en las muestras de zona alta.

7. RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS

Evaluar el efecto de la calidad del suelo y regímenes de cultivo en la composición química de cafés sembrados en zona alta.

Evaluar el efecto de la sombra en la composición química y propiedades sensoriales de cafés sembrados en zona alta.

Evaluar el efecto de diversos parámetros de tostado en la composición química de café, así como su actividad antioxidante.

Llevar a cabo la determinación analítica de otros compuestos, tales como, melanoidinas y trigonelina, las cuales se generan durante el proceso de tueste, y se ha demostrado que presentan actividad antioxidante.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Andriot, I., Le Quéré, J.-L., & Guichard, E. (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry*, 85(2), 289–294. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.007>
- Andueza, S., Cid, C., & Nicoli, M. (2004). Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and “Torrefacto” coffee. *LWT - Food Science and Technology*, 37(8), 893–897. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.004>
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J., Olguin, E., & Guiraud, J. (2001). Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation, 42, 252–256. <http://doi.org/10.1007/s002840110213>
- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., & Escher, F. (2008). Coffee roasting and aroma formation: Application of different time-temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5836–5846. <http://doi.org/10.1021/jf800327j>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (Cuarta edi). Berlin: Springer.
- BeMiller, J., & Whistler, R. (1996). Carbohydrates. In O. Fennema (Ed.), *Food Chemistry* (Tercera, pp. 157–223). New York: Marcel Dekker, Inc. [http://doi.org/10.1016/0260-8774\(88\)90055-6](http://doi.org/10.1016/0260-8774(88)90055-6)
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6527–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381145>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 30(28), 25–30.
- Buen café. (2002). Retrieved January 23, 2017, from https://www.federaciondecafeteros.org/buencafe-fnc-es/index.php/comments/como_se_realiza_el_analisis_sensorial_del_cafe_en_colombia/
- Cagliani, L. R., Pellegrino, G., Giugno, G., & Consonni, R. (2013). Quantification of Coffea arabica and Coffea canephora var. robusta in roasted and ground coffee blends. *Talanta*, 106, 169–73. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.003>
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303–311. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](http://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)
- Cheong, M. W., Tong, K. H., Ong, J. J. M., Liu, S. Q., Curran, P., & Yu, B. (2013). Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, 51(1), 388–396. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.058>
- Consonni, R., Cagliani, L. R., & Cogliati, C. (2012). NMR based geographical characterization

- of roasted coffee. *Talanta*, 88, 420–426. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.010>
- De Souza, R. M. N., & Benassi, M. T. (2012). Discrimination of commercial roasted and ground coffees according to chemical composition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(7), 1347–1354. <http://doi.org/10.1590/S0103-50532012000700020>
- Decazy, F., Avelino, J., Guyot, B., Perriot, J. ., Pineda, C., & Cilas, C. (2003). Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. *Journal of Food Science*, 68(7), 2356–2361.
- Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430–1435. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.031>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar/>
- Dórea, J. G., & da Costa, T. H. M. (2007). Is coffee a functional food? *British Journal of Nutrition*, 93(6), 773. <http://doi.org/10.1079/BJN20051370>
- Duarte, G. S., Pereira, A. A., & Farah, A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry*, 118(3), 851–855. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.042>
- Dumas, J., Acín, N., & Flores, C. (2013). *Caracterización química del café de Puerto Rico. Tercer informe de progreso Z-FIDA-8*. San Juan.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Evangelista, S. R., Miguel, M. G. da C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–12. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- Farah, A., & Donangelo, C. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23–36.
- Farah, A., Monteiro, M. ., Calado, V., Franca, A. ., & Trugo, L. . (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), 373–380. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2016). Prevenga el defecto de fermento en el café. Retrieved May 16, 2017, from <https://www.federaciondefcafeteros.org/pergamino-fnc/index.php/archives/C232>
- Flament, I. (2002). *Coffee flavor chemistry* (Primera ed). Chichester: John Wiley & Sons, LTD.
- Flores, C. (2011). Informe empresa de café 2011-2012. Retrieved November 6, 2013, from http://academic.uprm.edu/mmonroig/HTMLobj-1666/Informe_de_Empresa_de_Cafe_2011_PDF.pdf
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, 106(1), 217–221. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.091>

- Gómez-Ruiz, J. A., Leake, D. S., & Ames, J. M. (2007). In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6962–9. <http://doi.org/10.1021/jf0710985>
- González-Ríos, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J.-P., & Schorr-Galindo, S. (2007a). Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 297–307. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.12.004>
- González-Ríos, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J.-P., & Schorr-Galindo, S. (2007b). Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 289–296. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.07.009>
- Guyot, B., Gueule, D., Manez, J., Perriot, J., Giron, J., & Villain, L. (1996). Influence de l’altitude et de l’ombrage sur la qualité des cafés Arabica. *Plantations, Recherche, Développement*, 3(4), 272–283.
- Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 129(3), 991–1000. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.059>
- Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 495–502. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299710000737>
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. a, & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137457>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–56. <http://doi.org/10.1021/jf030723c>
- ICO. (2017). Monthly export statistics - January 2017. Retrieved March 20, 2017, from <http://www.ico.org/prices/m1-exports.pdf>
- José, S., Vicente, V., Queiroz, Y. S., Léa, S., Gotlieb, D., Aparecida, E., & Torres, S. (2014). Stability of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Regular and Decaffeinated Coffees. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(February), 110–118.
- Kitzberger, C., dos Santos, M., Protasio, L., & de Toledo, M. (2013). Composicao química de caés árabica de cultivares tradicionais e modernas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48(11), 1498–1506. <http://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001100011>
- Kwak, H. S., Ji, S., & Jeong, Y. (2017). The effect of air flow in coffee roasting for antioxidant activity and total polyphenol content. *Food Control*, 71, 210–216. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.047>
- Lara, L. D. (2005). *Efectos de la altitud, sombra, producción y fertilización sobre la calidad del café (Coffea arabica L. var. Caturra) producido en sistemas agroforestales de la zona cafetalera norcentral de Nicaragua*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y

Enseñanza.

- Liu, Y., & Kitts, D. D. (2011). Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*, 44(8), 2418–2424. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.037>
- Lyman, D. J., Benck, R., Dell, S., Merle, S., & Murray-Wijelath, J. (2003). FTIR-ATR analysis of brewed coffee: Effect of roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3268–3272. <http://doi.org/10.1021/jf0209793>
- Martínez, L. F. (2007). *Quality enhancement of coffee with acid and enzyme treatment*. University of Florida.
- Meilgaard, M., Civille, G., & Carr, T. (1999a). Factors Influencing Sensory Verdicts. In M. Meilgaard, T. Carr, & G. Civille (Eds.), *Sensory Evaluation Techniques* (Third). Boca Raton: CRC Press. <http://doi.org/doi:10.1201/9781439832271.ch4>
- Meilgaard, M., Civille, G., & Carr, T. (1999b). Selection and training of panel members. In M. Meilgaard, T. Carr, & G. Civille (Eds.), *Sensory Evaluation Techniques* (Third, pp. 133–158). Boca Raton: CRC Press. <http://doi.org/doi:10.1201/9781439832271.ch9>
- Miller, J., & Miller, J. (2005). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (Fifth). Harlow: Pearson Education Limited.
- Mills, C. E., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. E. (2013). The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141(4), 3335–40. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.014>
- Monteiro, M. C., & Farah, A. (2012). *Chlorogenic acids in Brazilian Coffea arabica cultivars from various consecutive crops*. *Food Chemistry* (Vol. 134). Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612003068>
- Mullen, W., Nemzer, B., Ou, B., Stalmach, a, Hunter, J., Clifford, M. N., & Combet, E. (2011). The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3754–62. <http://doi.org/10.1021/jf200122m>
- Muñoz, A. M., & Civille, G. V. (1999). The Spectrum™ descriptive analysis method. In M. Meilgaard, T. Carr, & G. Civille (Eds.), *Sensory Evaluation Techniques* (Third, pp. 354–402). Boca Raton: CRC Press. <http://doi.org/10.1520/MNL13-EB>
- Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B., & Hidayat, M. A. (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 141(4), 4102–6. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.112>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599998>
- Pérez, L. (2011). *Caracterización de compuestos bioactivos en hojas de guayaba (Psidium guajava) como un potencial de valor agregado en botánicos tropicales*. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayaguez.
- Pérez, L., Chávez, K., Medina, L., & Gámez, N. (2012). Phenolic characterization, melanoidins,

- and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), 430–435.
- Puerta, G. I. (1999). Influencia del proceso de beneficio en la calidad del café. *Cenicafé*, 50(1), 78–88.
- Roa, G., Oliveros, C. E., Sanz, J. R., Álvarez, J., Ramírez, C. A., & Álvarez, J. R. (1997). Desarrollo de la tecnología BECOLSUB para el Beneficio ecológico del café. *Avances Tecnicos Cenicafé*, 238, 1–8.
- Rodríguez, N., Sanz, J. R., Oliveros, C. E., & Ramírez, C. A. (2015). *Beneficio del café en Colombia*. Chinchiná: Cenicafé. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Roy, M., Koide, M., Rao, T., Okubo, T., Ogasawara, Y., & Juneja, L. (2010). ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(2), 109–124. <http://doi.org/10.3109/09637480903292601>
- Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., & Mastrocola, D. (2009). Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 74–80. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.005>
- Sanz, J. R., Oliveros, C. E., Ramírez, C. A., López, U., & Velásquez, J. (2011). Controle los flujos de café y agua en el módulo becolsub. *Cenicafé. Avances Técnicos*, 405(1), 1–8.
- SCAA. (2015). *Cupping Specialty Coffee. SCAA Protocols*. Specialty Coffee Association of America. Retrieved from <http://www.scaa.org/?page=resources&d=coffee-protocols>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 215S–217S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640483>
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25(8), 951–7. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.003>
- Snyder, L., Kirkland, J., & Glajch, J. (1997). *Practical HPLC Method Development* (Second Edi). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/9781118592014>
- Somporn, C., Kamtuo, A., Theerakulpisut, P., & Siriamornpun, S. (2011). Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). *International Journal of Food Science & Technology*, 46(11), 2287–2296. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02748.x>
- Sunarharum, W. B., Williams, D. J., & Smyth, H. E. (2014). Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Research International*, 62, 315–325. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.030>
- Tello, J., Viguera, M., & Calvo, L. (2011). Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 59, 53–60. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.07.018>
- Toci, A. T., Neto, V. J. M. F., Torres, A. G., & Farah, A. (2013). Changes in triacylglycerols and free fatty acids composition during storage of roasted coffee. *LWT - Food Science and*

- Technology*, 50(2), 581–590. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.007>
- Trugo, L. C., & Nogueira, M. (2003). Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Food Science and Technology (Campinas)*, 23(2), 296–299.
- Uthus, E. (2006). Coffee -- A functional food with health benefits. Retrieved September 20, 2013, from <http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=14342>
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3), 863–868. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008>
- Vignoli, J., Viegas, M., Bassoli, D., & Benassi, M. (2013). Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.006>
- Vilela, D. M., Pereira, G. V. de M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–35. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Wang, Y., & Ho, C.-T. (2009). Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8109–8114. <http://doi.org/10.1021/jf804025c>
- Weimann, A., Sabroe, M., & Poulsen, H. E. (2005). Measurement of caffeine and five of the major metabolites in urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(3), 307–316. <http://doi.org/10.1002/jms.785>
- Zambrano, E. (2013). *Contenido de antioxidantes en berenjena (Solanum melongena) y yautía (Xanthosoma violaceum) orgánica y convencional tratadas térmicamente*. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayaguez.

9. ANEXOS

9.1 Resultados de la determinación de cafeína

Zona	Variedad	Cafeína (g/100g de café)	Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)
Baja	Borbón	0.733	Baja	Borbón	0.732
Baja	Borbón	0.735	Alta	Borbón	0.814
Baja	Borbón	0.746	Alta	Borbón	0.816
Baja	Borbón	0.736	Alta	Borbón	0.798
Baja	Borbón	0.736	Alta	Borbón	0.788
Baja	Borbón	0.744	Alta	Borbón	0.798
Baja	Borbón	0.652	Alta	Borbón	0.791
Baja	Borbón	0.664	Baja	Borbón	0.701
Baja	Borbón	0.695	Baja	Borbón	0.695
Baja	Borbón	0.702	Baja	Borbón	0.712
Baja	Borbón	0.700	Baja	Borbón	0.697
Baja	Borbón	0.694	Baja	Borbón	0.699
Baja	Borbón	0.665	Baja	Borbón	0.687
Baja	Borbón	0.668	Alta	Borbón	0.815
Baja	Borbón	0.666	Alta	Borbón	0.815
Baja	Borbón	0.657	Alta	Borbón	0.823
Baja	Borbón	0.664	Alta	Borbón	0.830
Baja	Borbón	0.660	Alta	Borbón	0.766
Alta	Borbón	0.795	Alta	Borbón	0.772
Alta	Borbón	0.782	Baja	Borbón	0.768
Alta	Borbón	0.800	Baja	Borbón	0.775
Alta	Borbón	0.808	Baja	Borbón	0.770
Alta	Borbón	0.812	Baja	Borbón	0.754
Alta	Borbón	0.811	Baja	Borbón	0.768
Alta	Borbón	0.825	Baja	Borbón	0.778
Alta	Borbón	0.807	Baja	Borbón	0.724
Alta	Borbón	0.830	Baja	Borbón	0.726
Alta	Borbón	0.828	Baja	Borbón	0.742
Alta	Borbón	0.797	Baja	Borbón	0.742
Alta	Borbón	0.798	Baja	Borbón	0.723
Baja	Borbón	0.715	Baja	Borbón	0.714
Baja	Borbón	0.730	Alta	Borbón	0.765
Baja	Borbón	0.727	Alta	Borbón	0.771
Baja	Borbón	0.736	Alta	Borbón	0.718
Baja	Borbón	0.730	Alta	Borbón	0.739
Alta	Borbón	0.782	Alta	Borbón	0.721

Continuación

Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)	Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)
Alta	Borbón	0.788	Alta	Borbón	0.730
Alta	Borbón	0.825	Alta	Borbón	0.593
Alta	Borbón	0.804	Alta	Borbón	0.601
Alta	Borbón	0.765	Alta	Borbón	0.597
Alta	Borbón	0.770	Alta	Borbón	0.602
Alta	Borbón	0.753	Alta	Borbón	0.569
Alta	Borbón	0.753	Alta	Borbón	0.557
Baja	Borbón	0.779	Alta	Borbón	0.676
Baja	Borbón	0.772	Alta	Borbón	0.675
Baja	Borbón	0.741	Alta	Borbón	0.716
Baja	Borbón	0.748	Alta	Borbón	0.701
Baja	Borbón	0.745	Alta	Borbón	0.714
Baja	Borbón	0.688	Alta	Borbón	0.711
Alta	Borbón	0.766	Alta	Borbón	0.703
Alta	Borbón	0.744	Alta	Borbón	0.694
Alta	Borbón	0.734	Alta	Borbón	0.661
Alta	Borbón	0.752	Alta	Borbón	0.670
Alta	Borbón	0.729	Alta	Borbón	0.697
Alta	Borbón	0.723	Alta	Borbón	0.699
Alta	Borbón	0.723	Alta	Borbón	0.810
Alta	Borbón	0.736	Alta	Borbón	0.817
Alta	Borbón	0.741	Alta	Borbón	0.799
Alta	Borbón	0.734	Alta	Borbón	0.804
Alta	Borbón	0.704	Alta	Borbón	0.821
Alta	Borbón	0.674	Alta	Borbón	0.816
Alta	Borbón	0.763	Alta	Borbón	0.813
Alta	Borbón	0.770	Alta	Borbón	0.811
Alta	Borbón	0.769	Alta	Borbón	0.819
Alta	Borbón	0.760	Alta	Borbón	0.798
Alta	Borbón	0.738	Alta	Borbón	0.842
Alta	Borbón	0.729	Alta	Borbón	0.852
Baja	Borbón	0.645	Alta	Caturra	0.582
Baja	Borbón	0.640	Alta	Caturra	0.581
Baja	Borbón	0.659	Alta	Caturra	0.760
Baja	Borbón	0.659	Alta	Caturra	0.759
Baja	Borbón	0.681	Alta	Caturra	0.763
Baja	Borbón	0.659	Alta	Caturra	0.774
Alta	Borbón	0.746	Alta	Caturra	0.739
Alta	Borbón	0.740	Alta	Caturra	0.713
Alta	Borbón	0.747	Alta	Caturra	0.875

Continuación

Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)	Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)
Alta	Borbón	0.732	Alta	Caturra	0.876
Alta	Caturra	0.876	Alta	Caturra	0.778
Alta	Caturra	0.883	Alta	Caturra	0.783
Alta	Caturra	0.729	Baja	Caturra	0.545
Alta	Caturra	0.724	Baja	Caturra	0.580
Alta	Caturra	0.733	Baja	Caturra	0.595
Alta	Caturra	0.734	Baja	Caturra	0.603
Alta	Caturra	0.682	Baja	Caturra	0.780
Alta	Caturra	0.693	Baja	Caturra	0.782
Alta	Caturra	0.806	Baja	Caturra	0.629
Alta	Caturra	0.822	Baja	Caturra	0.619
Alta	Caturra	0.818	Baja	Caturra	0.761
Alta	Caturra	0.809	Baja	Caturra	0.763
Alta	Caturra	0.836	Baja	Caturra	0.716
Alta	Caturra	0.825	Baja	Caturra	0.680
Alta	Caturra	0.755	Alta	Caturra	0.821
Alta	Caturra	0.753	Alta	Caturra	0.827
Alta	Caturra	0.720	Alta	Caturra	0.681
Alta	Caturra	0.708	Alta	Caturra	0.687
Alta	Caturra	0.713	Alta	Caturra	0.787
Alta	Caturra	0.712	Alta	Caturra	0.776
Alta	Caturra	0.817	Baja	Caturra	0.762
Alta	Caturra	0.747	Baja	Caturra	0.754
Alta	Caturra	0.827	Baja	Caturra	0.740
Alta	Caturra	0.826	Baja	Caturra	0.741
Alta	Caturra	0.801	Baja	Caturra	0.741
Alta	Caturra	0.810	Baja	Caturra	0.739
Alta	Caturra	0.765	Alta	Caturra	0.788
Alta	Caturra	0.770	Alta	Caturra	0.792
Alta	Caturra	0.730	Alta	Caturra	0.789
Alta	Caturra	0.718	Alta	Caturra	0.788
Alta	Caturra	0.777	Alta	Caturra	0.795
Alta	Caturra	0.755	Alta	Caturra	0.801
Alta	Caturra	0.761	Alta	Caturra	0.805
Alta	Caturra	0.750	Alta	Caturra	0.804
Alta	Caturra	0.688	Alta	Caturra	0.911
Alta	Caturra	0.696	Alta	Caturra	0.916
Alta	Caturra	0.749	Alta	Caturra	0.882
Alta	Caturra	0.672	Alta	Caturra	0.884
Alta	Caturra	0.715	Alta	Caturra	0.851

Continuación

Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)	Zona	Variedad	Cafeína (g/100 g de café)
Alta	Caturra	0.670	Alta	Caturra	0.857
Alta	Caturra	0.809	Alta	Caturra	0.856
Alta	Caturra	0.835	Alta	Caturra	0.858
Alta	Caturra	0.780	Alta	Caturra	0.733
Alta	Caturra	0.777	Alta	Caturra	0.851
Alta	Caturra	0.753	Alta	Caturra	0.843
Alta	Caturra	0.750	Alta	Caturra	0.826
Alta	Caturra	0.772	Alta	Caturra	0.813
Alta	Caturra	0.780	Alta	Caturra	0.861
Alta	Caturra	0.788	Alta	Caturra	0.863

9.2 Resultados de la determinación de 3-CQA

Zona	Variedad	3-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	3-CQA (g/100 g de café)
Baja	Borbón	0.205	Alta	Borbón	0.325
Baja	Borbón	0.203	Alta	Borbón	0.357
Baja	Borbón	0.199	Alta	Borbón	0.365
Baja	Borbón	0.319	Alta	Borbón	0.311
Baja	Borbón	0.325	Alta	Borbón	0.335
Baja	Borbón	0.325	Baja	Borbón	0.192
Baja	Borbón	0.267	Baja	Borbón	0.185
Baja	Borbón	0.266	Baja	Borbón	0.171
Baja	Borbón	0.253	Alta	Borbón	0.359
Alta	Borbón	0.304	Alta	Borbón	0.333
Alta	Borbón	0.328	Alta	Borbón	0.332
Alta	Borbón	0.323	Alta	Borbón	0.268
Alta	Borbón	0.448	Alta	Borbón	0.273
Alta	Borbón	0.458	Alta	Borbón	0.249
Alta	Borbón	0.448	Alta	Borbón	0.364
Baja	Borbón	0.263	Alta	Borbón	0.367
Baja	Borbón	0.280	Alta	Borbón	0.339
Baja	Borbón	0.277	Baja	Borbón	0.213
Alta	Borbón	0.349	Baja	Borbón	0.214
Alta	Borbón	0.340	Baja	Borbón	0.204
Alta	Borbón	0.341	Alta	Borbón	0.245
Baja	Borbón	0.305	Alta	Borbón	0.222
Baja	Borbón	0.302	Alta	Borbón	0.232
Baja	Borbón	0.300	Alta	Borbón	0.256

Continuación

Zona	Variedad	3-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	3-CQA (g/100 g de café)
Alta	Borbón	0.301	Alta	Borbón	0.265
Alta	Borbón	0.302	Alta	Borbón	0.242
Alta	Borbón	0.271	Alta	Borbón	0.405
Baja	Borbón	0.177	Alta	Borbón	0.417
Baja	Borbón	0.163	Alta	Borbón	0.430
Baja	Borbón	0.166	Alta	Borbón	0.446
Baja	Borbón	0.236	Alta	Borbón	0.407
Baja	Borbón	0.242	Alta	Borbón	0.431
Baja	Borbón	0.234	Alta	Borbón	0.370
Alta	Borbón	0.347	Alta	Borbón	0.400
Alta	Borbón	0.358	Alta	Caturra	0.241
Alta	Borbón	0.396	Alta	Caturra	0.231
Alta	Borbón	0.370	Baja	Caturra	0.191
Alta	Borbón	0.402	Baja	Caturra	0.219
Alta	Caturra	0.324	Baja	Caturra	0.252
Alta	Caturra	0.406	Baja	Caturra	0.201
Alta	Caturra	0.422	Baja	Caturra	0.271
Alta	Caturra	0.367	Baja	Caturra	0.245
Alta	Caturra	0.414	Alta	Caturra	0.395
Alta	Caturra	0.430	Alta	Caturra	0.307
Alta	Caturra	0.319	Alta	Caturra	0.347
Alta	Caturra	0.302	Baja	Caturra	0.369
Alta	Caturra	0.280	Baja	Caturra	0.363
Alta	Caturra	0.278	Baja	Caturra	0.371
Alta	Caturra	0.262	Alta	Caturra	0.414
Alta	Caturra	0.271	Alta	Caturra	0.406
Alta	Caturra	0.372	Alta	Caturra	0.410
Alta	Caturra	0.350	Alta	Caturra	0.394
Alta	Caturra	0.341	Alta	Caturra	0.428
Alta	Caturra	0.328	Alta	Caturra	0.450
Alta	Caturra	0.337	Alta	Caturra	0.427
Alta	Caturra	0.322	Alta	Caturra	0.455
Alta	Caturra	0.429	Alta	Caturra	0.397
Alta	Caturra	0.385	Alta	Caturra	0.345
Alta	Caturra	0.434	Alta	Caturra	0.331
Alta	Caturra	0.478	Alta	Caturra	0.344
Alta	Caturra	0.438	Alta	Caturra	0.462
Alta	Caturra	0.444	Alta	Caturra	0.444
Alta	Caturra	0.200	Alta	Caturra	0.475

9.3 Resultados de la determinación de 4-CQA

Zona	Variedad	4-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	4-CQA (g/100 g de café)
Baja	Borbón	0.239	Baja	Borbón	0.309
Baja	Borbón	0.241	Alta	Borbón	0.371
Baja	Borbón	0.233	Alta	Borbón	0.399
Baja	Borbón	0.388	Alta	Borbón	0.379
Baja	Borbón	0.408	Alta	Borbón	0.554
Baja	Borbón	0.413	Alta	Borbón	0.552
Baja	Borbón	0.319	Alta	Borbón	0.543
Baja	Borbón	0.320	Baja	Borbón	0.317
Baja	Borbón	0.327	Alta	Borbón	0.492
Baja	Borbón	0.330	Alta	Borbón	0.512
Alta	Borbón	0.402	Alta	Borbón	0.557
Alta	Borbón	0.410	Alta	Borbón	0.505
Alta	Borbón	0.407	Alta	Borbón	0.539
Baja	Borbón	0.370	Alta	Borbón	0.455
Baja	Borbón	0.369	Alta	Borbón	0.472
Baja	Borbón	0.360	Alta	Borbón	0.458
Alta	Borbón	0.372	Alta	Borbón	0.449
Alta	Borbón	0.366	Alta	Borbón	0.449
Alta	Borbón	0.333	Alta	Borbón	0.464
Baja	Borbón	0.202	Alta	Borbón	0.395
Baja	Borbón	0.182	Alta	Borbón	0.509
Baja	Borbón	0.191	Alta	Borbón	0.514
Baja	Borbón	0.290	Alta	Borbón	0.441
Baja	Borbón	0.288	Alta	Borbón	0.495
Baja	Borbón	0.273	Alta	Borbón	0.515
Alta	Borbón	0.420	Alta	Borbón	0.364
Alta	Borbón	0.405	Alta	Borbón	0.351
Alta	Borbón	0.441	Alta	Borbón	0.345
Alta	Borbón	0.453	Alta	Borbón	0.332
Alta	Borbón	0.399	Alta	Borbón	0.311
Alta	Borbón	0.420	Alta	Borbón	0.338
Baja	Borbón	0.231	Alta	Borbón	0.446
Baja	Borbón	0.221	Alta	Borbón	0.413
Baja	Borbón	0.204	Alta	Borbón	0.405
Alta	Borbón	0.448	Alta	Borbón	0.389
Alta	Borbón	0.427	Alta	Borbón	0.404
Alta	Borbón	0.420	Alta	Borbón	0.376
Alta	Borbón	0.338	Alta	Borbón	0.488
Alta	Borbón	0.340	Alta	Borbón	0.458
Alta	Borbón	0.310	Alta	Borbón	0.502

Continuación

Zona	Variedad	4-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	4-CQA (g/100 g de café)
Alta	Borbón	0.470	Alta	Borbón	0.565
Alta	Borbón	0.466	Alta	Borbón	0.505
Alta	Borbón	0.432	Alta	Borbón	0.530
Baja	Borbón	0.261	Alta	Borbón	0.229
Baja	Borbón	0.261	Alta	Borbón	0.283
Baja	Borbón	0.258	Alta	Borbón	0.269
Alta	Borbón	0.303	Baja	Borbón	0.229
Alta	Borbón	0.286	Baja	Borbón	0.260
Alta	Borbón	0.291	Baja	Borbón	0.310
Alta	Borbón	0.329	Baja	Borbón	0.240
Alta	Borbón	0.329	Baja	Borbón	0.312
Alta	Borbón	0.292	Alta	Caturra	0.455
Alta	Borbón	0.477	Alta	Caturra	0.505
Baja	Caturra	0.283	Alta	Caturra	0.516
Alta	Caturra	0.467	Alta	Caturra	0.514
Alta	Caturra	0.369	Alta	Caturra	0.532
Alta	Caturra	0.413	Alta	Caturra	0.462
Baja	Caturra	0.429	Alta	Caturra	0.400
Baja	Caturra	0.417	Alta	Caturra	0.398
Baja	Caturra	0.426	Alta	Caturra	0.419
Alta	Caturra	0.479	Alta	Caturra	0.536
Alta	Caturra	0.478	Alta	Caturra	0.521
Alta	Caturra	0.475	Alta	Caturra	0.535

9.4 Resultados de la determinación de 5-CQA

Zona	Variedad	5-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	5-CQA (g/100 g de café)
Baja	Borbón	0.454	Alta	Borbón	0.732
Baja	Borbón	0.432	Alta	Borbón	0.678
Baja	Borbón	0.427	Baja	Borbón	0.382
Baja	Borbón	0.757	Baja	Borbón	0.351
Baja	Borbón	0.775	Baja	Borbón	0.339
Baja	Borbón	0.785	Baja	Borbón	0.553
Baja	Borbón	0.600	Baja	Borbón	0.545
Baja	Borbón	0.624	Baja	Borbón	0.521
Baja	Borbón	0.592	Alta	Borbón	0.819
Alta	Borbón	0.722	Alta	Borbón	0.757
Alta	Borbón	0.747	Alta	Borbón	0.845
Alta	Borbón	0.725	Alta	Borbón	0.899

Continuación

Zona	Variedad	5-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	5-CQA (g/100 g de café)
Alta	Borbón	1.071	Alta	Borbón	0.775
Alta	Borbón	1.079	Alta	Borbón	0.844
Alta	Borbón	1.052	Baja	Borbón	0.430
Baja	Borbón	0.618	Baja	Borbón	0.409
Baja	Borbón	0.624	Baja	Borbón	0.373
Baja	Borbón	0.627	Alta	Borbón	0.901
Alta	Borbón	0.788	Alta	Borbón	0.837
Alta	Borbón	0.767	Alta	Borbón	0.827
Alta	Borbón	0.784	Alta	Borbón	0.674
Baja	Borbón	0.699	Alta	Borbón	0.680
Baja	Borbón	0.697	Alta	Borbón	0.647
Baja	Borbón	0.692	Alta	Borbón	0.902
Alta	Borbón	0.760	Alta	Borbón	0.896
Alta	Borbón	0.831	Alta	Caturra	0.773
Baja	Borbón	0.516	Alta	Caturra	0.724
Baja	Borbón	0.502	Alta	Caturra	0.970
Baja	Borbón	0.515	Alta	Caturra	0.872
Alta	Borbón	0.609	Alta	Caturra	0.880
Alta	Borbón	0.562	Alta	Caturra	1.083
Alta	Borbón	0.600	Alta	Caturra	0.952
Alta	Borbón	0.658	Alta	Caturra	1.050
Alta	Borbón	0.650	Alta	Caturra	0.428
Alta	Borbón	0.592	Alta	Caturra	0.524
Alta	Borbón	0.910	Alta	Caturra	0.497
Alta	Borbón	0.961	Baja	Caturra	0.447
Alta	Borbón	0.984	Baja	Caturra	0.490
Alta	Borbón	1.048	Baja	Caturra	0.577
Alta	Borbón	0.945	Baja	Caturra	0.460
Alta	Borbón	1.037	Baja	Caturra	0.619
Alta	Borbón	0.866	Baja	Caturra	0.548
Alta	Borbón	0.911	Alta	Caturra	0.902
Alta	Borbón	0.845	Alta	Caturra	0.728
Alta	Borbón	0.855	Alta	Caturra	0.800
Alta	Borbón	0.818	Baja	Caturra	0.882
Alta	Borbón	0.887	Baja	Caturra	0.853
Alta	Caturra	0.753	Baja	Caturra	0.868
Alta	Caturra	0.970	Alta	Caturra	0.979
Alta	Caturra	1.018	Alta	Caturra	0.970
Alta	Caturra	0.864	Alta	Caturra	0.973
Alta	Caturra	0.993	Alta	Caturra	0.957
Alta	Caturra	1.007	Alta	Caturra	1.078

Continuación

Zona	Variedad	5-CQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	5-CQA (g/100 g de café)
Alta	Caturra	0.707	Alta	Caturra	1.072
Alta	Caturra	0.699	Alta	Caturra	1.056
Alta	Caturra	0.672	Alta	Caturra	1.110
Alta	Caturra	0.630	Alta	Caturra	0.969
Alta	Caturra	0.602	Alta	Caturra	0.854
Alta	Caturra	0.629	Alta	Caturra	0.836
Alta	Caturra	0.859	Alta	Caturra	0.874
Alta	Caturra	0.803	Alta	Caturra	1.061
Alta	Caturra	0.831	Alta	Caturra	1.074
Alta	Caturra	0.761	Alta	Caturra	1.088

9.5 Resultados de la determinación de 3,4-diCQA

Zona	Variedad	3,4-diCQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	3,4-diCQA (g/100 g de café)
Baja	Borbón	0.0110	Baja	Borbón	0.0110
Baja	Borbón	0.0110	Baja	Borbón	0.0110
Baja	Borbón	0.0100	Alta	Borbón	0.0100
Baja	Borbón	0.0200	Alta	Borbón	0.0020
Baja	Borbón	0.0220	Alta	Borbón	0.0010
Baja	Borbón	0.0220	Alta	Borbón	0.0010
Baja	Borbón	0.0160	Alta	Borbón	0.0080
Baja	Borbón	0.0160	Alta	Borbón	0.0080
Baja	Borbón	0.0150	Alta	Borbón	0.0070
Alta	Borbón	0.0170	Alta	Borbón	0.0160
Alta	Borbón	0.0180	Alta	Borbón	0.0160
Alta	Borbón	0.0180	Baja	Borbón	0.0190
Alta	Borbón	0.0390	Baja	Borbón	0.0100
Alta	Borbón	0.0420	Baja	Borbón	0.0090
Alta	Borbón	0.0360	Alta	Borbón	0.0100
Baja	Borbón	0.0190	Alta	Borbón	0.0020
Baja	Borbón	0.0070	Alta	Borbón	0.0010
Baja	Borbón	0.0080	Alta	Borbón	0.0020
Alta	Borbón	0.0080	Alta	Borbón	0.0180
Alta	Borbón	0.0170	Alta	Borbón	0.0170
Alta	Borbón	0.0190	Alta	Borbón	0.0310
Baja	Borbón	0.0180	Alta	Borbón	0.0180
Baja	Borbón	0.0130	Alta	Borbón	0.0180
Baja	Borbón	0.0140	Alta	Borbón	0.0160
Alta	Borbón	0.0120	Alta	Borbón	0.0290
Alta	Borbón	0.0140	Alta	Borbón	0.0290

Continuación

Zona	Variedad	3,4-diCQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	3,4-diCQA (g/100 g de café)
Alta	Borbón	0.0150	Alta	Borbón	0.0270
Baja	Borbón	0.0140	Alta	Borbón	0.0130
Baja	Borbón	0.0300	Alta	Borbón	0.0130
Baja	Borbón	0.0290	Alta	Borbón	0.0130
Baja	Borbón	0.0280	Alta	Borbón	0.0190
Baja	Borbón	0.0140	Alta	Borbón	0.0160
Baja	Borbón	0.0140	Alta	Caturra	0.0180
Alta	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0150	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0150	Alta	Caturra	0.0210
Alta	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0260
Alta	Borbón	0.0120	Alta	Caturra	0.0280
Alta	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0290
Baja	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0340
Alta	Caturra	0.0330	Baja	Caturra	0.0150
Alta	Caturra	0.0350	Baja	Caturra	0.0150
Alta	Caturra	0.0220	Alta	Caturra	0.0140
Alta	Caturra	0.0230	Alta	Caturra	0.0170
Alta	Caturra	0.0210	Alta	Caturra	0.0140
Alta	Caturra	0.0210	Baja	Caturra	0.0160
Alta	Caturra	0.0210	Baja	Caturra	0.0190
Alta	Caturra	0.0200	Baja	Caturra	0.0150
Alta	Caturra	0.0180	Alta	Caturra	0.0150
Alta	Caturra	0.0240	Alta	Caturra	0.0030
Alta	Caturra	0.0250	Alta	Caturra	0.0020
Alta	Caturra	0.0230	Alta	Caturra	0.0020
Alta	Caturra	0.0260	Alta	Caturra	0.0030
Alta	Caturra	0.0290	Alta	Caturra	0.0030
Alta	Caturra	0.0140	Alta	Caturra	0.0050
Alta	Caturra	0.0140	Alta	Caturra	0.0050
Alta	Caturra	0.0140	Alta	Caturra	0.0100
Alta	Caturra	0.0110	Alta	Caturra	0.0100
Alta	Caturra	0.0110	Alta	Caturra	0.0180
Baja	Caturra	0.0110	Alta	Caturra	0.0130
Baja	Caturra	0.0170	Alta	Caturra	0.0070
Baja	Caturra	0.0150	Alta	Caturra	0.0060
Baja	Caturra	0.0140	Alta	Caturra	0.0050

9.6 Resultados de la determinación de 3,5-diCQA

Zona	Variedad	3,5-diCQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	3,5-diCQA (g/100 g de café)
Baja	Borbón	0.0110	Alta	Borbón	0.0360
Baja	Borbón	0.0100	Baja	Borbón	0.0190
Baja	Borbón	0.0100	Baja	Borbón	0.0210
Baja	Borbón	0.0200	Baja	Borbón	0.0200
Baja	Borbón	0.0220	Alta	Borbón	0.0210
Baja	Borbón	0.0220	Alta	Borbón	0.0220
Baja	Borbón	0.0160	Alta	Borbón	0.0210
Baja	Borbón	0.0160	Baja	Borbón	0.0180
Baja	Borbón	0.0150	Baja	Borbón	0.0200
Alta	Borbón	0.0170	Baja	Borbón	0.0180
Alta	Borbón	0.0180	Alta	Borbón	0.0150
Alta	Borbón	0.0170	Alta	Borbón	0.0140
Alta	Borbón	0.0390	Alta	Borbón	0.0140
Alta	Borbón	0.0410	Baja	Borbón	0.0080
Baja	Borbón	0.0070	Alta	Borbón	0.0270
Baja	Borbón	0.0070	Alta	Caturra	0.0200
Baja	Borbón	0.0120	Alta	Caturra	0.0280
Baja	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0280
Baja	Borbón	0.0120	Alta	Caturra	0.0260
Alta	Borbón	0.0210	Alta	Caturra	0.0320
Alta	Borbón	0.0210	Alta	Caturra	0.0330
Alta	Borbón	0.0240	Alta	Caturra	0.0190
Alta	Borbón	0.0190	Alta	Caturra	0.0180
Alta	Borbón	0.0180	Alta	Caturra	0.0170
Alta	Borbón	0.0190	Alta	Caturra	0.0160
Baja	Borbón	0.0090	Alta	Caturra	0.0160
Baja	Borbón	0.0090	Alta	Caturra	0.0160
Baja	Borbón	0.0080	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0260	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0250	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0240	Alta	Caturra	0.0250
Alta	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0250
Alta	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0120	Alta	Caturra	0.0290
Alta	Borbón	0.0220	Alta	Caturra	0.0240
Alta	Borbón	0.0210	Alta	Caturra	0.0290
Alta	Borbón	0.0210	Alta	Caturra	0.0340
Baja	Borbón	0.0090	Alta	Caturra	0.0300
Baja	Borbón	0.0090	Alta	Caturra	0.0320
Baja	Borbón	0.0070	Alta	Caturra	0.0080

Continuación

Zona	Variedad	3,5-diCQA (g/100 g de café)	Zona	Variedad	3,5-diCQA (g/100 g de café)
Alta	Borbón	0.0130	Alta	Caturra	0.0110
Alta	Borbón	0.0120	Alta	Caturra	0.0100
Alta	Borbón	0.0110	Baja	Caturra	0.0110
Alta	Borbón	0.0160	Baja	Caturra	0.0120
Alta	Borbón	0.0180	Baja	Caturra	0.0150
Alta	Borbón	0.0150	Baja	Caturra	0.0120
Alta	Borbón	0.0330	Baja	Caturra	0.0170
Alta	Borbón	0.0360	Baja	Caturra	0.0150
Alta	Borbón	0.0370	Alta	Caturra	0.0260
Alta	Borbón	0.0400	Alta	Caturra	0.0200
Alta	Borbón	0.0380	Alta	Caturra	0.0250
Alta	Borbón	0.0410	Baja	Caturra	0.0300
Alta	Borbón	0.0280	Baja	Caturra	0.0300
Alta	Borbón	0.0280	Baja	Caturra	0.0300
Alta	Borbón	0.0260	Alta	Caturra	0.0350
Alta	Borbón	0.0260	Alta	Caturra	0.0340
Alta	Borbón	0.0270	Alta	Caturra	0.0340
Alta	Caturra	0.0290	Alta	Caturra	0.0260
Alta	Caturra	0.0320	Alta	Caturra	0.0250
Alta	Caturra	0.0330	Alta	Caturra	0.0270
Alta	Caturra	0.0350	Alta	Caturra	0.0350
Alta	Caturra	0.0380	Alta	Caturra	0.0340
Alta	Caturra	0.0310	Alta	Caturra	0.0110

9.7 Resultados de la actividad antioxidante ORAC

Zona	Variedad	ORAC (µMTE/g de café)	Zona	Variedad	ORAC (µMTE/g de café)
Baja	Borbón	509.13	Baja	Borbón	1113.58
Baja	Borbón	852.47	Baja	Borbón	1057.50
Baja	Borbón	215.82	Alta	Borbón	1064.42
Baja	Borbón	928.11	Alta	Borbón	1193.02
Baja	Borbón	727.88	Alta	Borbón	1304.53
Baja	Borbón	953.93	Alta	Borbón	1418.83
Baja	Borbón	1238.99	Alta	Borbón	969.87
Baja	Borbón	1129.30	Alta	Borbón	1092.35
Baja	Borbón	657.48	Baja	Borbón	930.36
Alta	Borbón	874.96	Baja	Borbón	963.51

Continuación

Zona	Variedad	ORAC (µMTE/g de café)	Zona	Variedad	ORAC (µMTE/g de café)
Alta	Borbón	1036.17	Baja	Borbón	959.12
Alta	Borbón	1076.88	Alta	Borbón	1028.61
Alta	Borbón	1125.20	Alta	Borbón	675.25
Alta	Borbón	1343.68	Alta	Borbón	898.07
Alta	Borbón	1524.51	Alta	Borbón	986.45
Baja	Borbón	780.62	Alta	Borbón	987.50
Baja	Borbón	1140.94	Alta	Borbón	1171.00
Baja	Borbón	908.21	Alta	Borbón	1323.14
Alta	Borbón	970.30	Alta	Borbón	878.89
Alta	Borbón	968.01	Alta	Borbón	1204.19
Alta	Borbón	762.79	Baja	Borbón	1116.49
Baja	Borbón	686.51	Baja	Borbón	509.62
Baja	Borbón	751.96	Baja	Borbón	1161.07
Baja	Borbón	713.28	Alta	Borbón	1387.10
Alta	Borbón	723.90	Alta	Borbón	1017.40
Alta	Borbón	1028.68	Alta	Borbón	1159.56
Alta	Borbón	1137.85	Alta	Borbón	1163.79
Baja	Borbón	1009.09	Alta	Borbón	1118.48
Baja	Borbón	842.28	Alta	Borbón	1218.15
Baja	Borbón	921.50	Alta	Borbón	1275.66
Baja	Borbón	1209.04	Alta	Borbón	1390.58
Alta	Borbón	982.38	Alta	Caturra	1362.41
Alta	Borbón	934.58	Alta	Caturra	1215.93
Alta	Borbón	1006.24	Alta	Caturra	1029.44
Alta	Borbón	1013.47	Alta	Caturra	1026.27
Alta	Borbón	1043.56	Alta	Caturra	1197.68
Alta	Borbón	1232.08	Baja	Caturra	1281.69
Alta	Borbón	897.78	Baja	Caturra	1020.65
Alta	Borbón	1044.59	Baja	Caturra	1501.19
Alta	Borbón	1117.73	Baja	Caturra	1226.48
Alta	Borbón	1367.92	Baja	Caturra	1157.96
Alta	Caturra	1579.41	Baja	Caturra	890.66
Alta	Caturra	1456.11	Alta	Caturra	1197.01
Alta	Caturra	1387.87	Alta	Caturra	870.41
Alta	Caturra	1474.58	Alta	Caturra	1154.29
Alta	Caturra	1176.29	Baja	Caturra	1066.38
Alta	Caturra	1473.26	Baja	Caturra	1043.33
Alta	Caturra	1385.46	Baja	Caturra	923.11
Alta	Caturra	1170.43	Alta	Caturra	1053.71
Alta	Caturra	1352.72	Alta	Caturra	1071.96

Continuación

Zona	Variedad	ORAC (μMTE/g de café)	Zona	Variedad	ORAC (μMTE/g de café)
Alta	Caturra	1336.89	Alta	Caturra	1215.53
Alta	Caturra	1168.02	Alta	Caturra	1129.73
Alta	Caturra	1156.64	Alta	Caturra	1007.99
Alta	Caturra	1385.97	Alta	Caturra	1084.79
Alta	Caturra	967.48	Alta	Caturra	1236.76
Alta	Caturra	1373.51	Alta	Caturra	1151.36
Alta	Caturra	858.97	Alta	Caturra	1139.27
Alta	Caturra	1136.85	Alta	Caturra	1006.97
Alta	Caturra	987.41	Alta	Caturra	1058.75
Alta	Caturra	1108.26	Alta	Caturra	1225.10
Alta	Caturra	1026.61	Alta	Caturra	1298.37
Alta	Caturra	1233.87	Alta	Caturra	1044.30
Alta	Caturra	1581.92	Alta	Caturra	950.42

9.8 Resultados de la actividad antioxidante DPPH

Zona	Variedad	DPPH (μMTE/g de café)	Zona	Variedad	DPPH (μMTE/g de café)
Alta	Borbón	1702.28	Alta	Borbón	1824.59
Alta	Borbón	1791.79	Alta	Borbón	1729.43
Alta	Borbón	1784.37	Alta	Borbón	1688.74
Alta	Borbón	1674.19	Alta	Borbón	1679.22
Alta	Borbón	1800.08	Alta	Borbón	1748.35
Alta	Borbón	1626.52	Baja	Borbón	1546.63
Alta	Borbón	1838.54	Baja	Borbón	1177.84
Alta	Borbón	1859.01	Baja	Borbón	1352.56
Alta	Borbón	1846.91	Baja	Borbón	1688.86
Alta	Borbón	1714.08	Baja	Borbón	1671.96
Alta	Borbón	1799.04	Baja	Borbón	1652.17
Alta	Borbón	1733.38	Baja	Borbón	1603.13
Alta	Borbón	1870.02	Baja	Borbón	1612.01
Alta	Borbón	1825.35	Baja	Borbón	1502.28
Alta	Borbón	1912.81	Baja	Borbón	1539.31
Alta	Borbón	1787.94	Baja	Borbón	1570.90
Alta	Borbón	1706.17	Baja	Borbón	1599.72
Alta	Borbón	1777.11	Baja	Borbón	1663.14
Alta	Borbón	1685.99	Baja	Borbón	1588.12
Alta	Borbón	1727.03	Baja	Borbón	1617.61
Alta	Borbón	1723.96	Baja	Borbón	1492.71

Continuación

Zona	Variedad	DPPH (µMTE/g de café)	Zona	Variedad	DPPH (µMTE/g de café)
Alta	Borbón	1715.20	Baja	Borbón	1554.46
Alta	Borbón	1708.46	Baja	Borbón	1522.97
Alta	Borbón	1661.45	Baja	Borbón	1618.59
Alta	Borbón	1772.41	Baja	Borbón	1558.34
Alta	Borbón	1799.48	Baja	Borbón	1611.04
Alta	Borbón	1874.35	Baja	Borbón	1419.79
Alta	Borbón	1681.63	Baja	Borbón	1376.18
Alta	Borbón	1453.22	Baja	Borbón	1469.61
Alta	Borbón	1818.65	Baja	Borbón	1670.77
Alta	Borbón	1799.33	Baja	Borbón	1693.15
Alta	Borbón	1750.94	Baja	Borbón	1634.76
Alta	Borbón	1808.66	Alta	Caturra	1531.11
Alta	Borbón	1677.87	Alta	Caturra	1515.51
Alta	Borbón	1668.58	Alta	Caturra	1734.00
Alta	Borbón	1828.13	Alta	Caturra	1605.89
Alta	Borbón	1703.47	Alta	Caturra	1643.27
Alta	Borbón	1800.09	Alta	Caturra	1650.96
Alta	Borbón	1837.58	Alta	Caturra	1516.04
Alta	Borbón	1870.12	Alta	Caturra	1568.96
Alta	Caturra	1469.94	Alta	Caturra	1519.55
Alta	Caturra	1570.95	Alta	Caturra	1548.30
Alta	Caturra	1553.57	Alta	Caturra	1649.49
Alta	Caturra	1581.99	Alta	Caturra	1600.66
Alta	Caturra	1643.79	Alta	Caturra	1615.17
Alta	Caturra	1716.60	Alta	Caturra	1636.99
Alta	Caturra	1634.32	Alta	Caturra	1647.74
Alta	Caturra	1570.23	Alta	Caturra	1729.89
Alta	Caturra	1575.63	Alta	Caturra	1588.69
Alta	Caturra	1589.76	Alta	Caturra	1617.04
Alta	Caturra	1623.52	Alta	Caturra	1553.07
Alta	Caturra	1601.92	Alta	Caturra	1669.86
Alta	Caturra	1617.83	Alta	Caturra	1630.00
Alta	Caturra	1686.17	Alta	Caturra	1616.03
Alta	Caturra	1720.52	Baja	Caturra	1401.31
Alta	Caturra	1763.96	Baja	Caturra	1403.52
Alta	Caturra	1443.26	Baja	Caturra	1538.80
Alta	Caturra	1377.81	Baja	Caturra	1493.68
Alta	Caturra	1406.75	Baja	Caturra	1489.67
Alta	Caturra	1547.03	Baja	Caturra	1457.09
Alta	Caturra	1573.08	Baja	Caturra	1485.74
Alta	Caturra	1552.99	Baja	Caturra	1457.69
Alta	Caturra	1590.66	Baja	Caturra	1505.77

9.9 Resultados de la selección de panelistas usando pruebas triangulo

Panelista	Nivel de dificultad					
	Fácil			Difícil		
	Pruebas	Aciertos	% Rendimiento	Pruebas	Aciertos	% Rendimiento
1	3	3	100	4	2	50
2	3	3	100	4	4	100
3	3	3	100	4	3	75
4	3	1	33	4	3	75
5	3	2	67	4	3	75
6	3	2	67	4	3	75
7	3	3	100	4	4	100
8	3	3	100	4	4	100
9	3	3	100	4	2	50
10	3	3	100	4	4	100
11	3	3	100	2	1	50
12	3	2	67	2	1	50
13	3	3	100	4	3	75
14	1	0	0	0	0	0

9.10 Resultados del adiestramiento de panelistas

Panelista	Numero de pruebas	Aciertos completos (%)	Aciertos parciales (%)	Total (%)
1	8	87.5	12.5	100.0
2	10	100.0	0.0	100.0
3	10	60.0	20.0	80.0
4	7	71.4	28.6	100.0
5	10	30.0	30.0	60.0
6	10	50.0	30.0	80.0
7	11	45.5	54.5	100.0
8	10	30.0	50.0	80.0
9	11	72.7	27.3	100.0
10	2	100.0	0.0	100.0
11	5	40.0	40.0	80.0
12	0	N/A	N/A	N/A
13	3	33.3	33.3	66.7

9.11 Resultados adiestramiento de panelistas usando café con cafeína

Panelista	Numero de pruebas	Respuestas correctas	Rendimiento (%)
1	3	3	100
2	3	2	67
3	3	3	100
4	3	2	67
5	4	3	75
6	3	2	67
7	3	2	67
8	3	3	100
9	3	2	67

9.12 Resultados de la evaluación del atributo de amargo

Zona	Variedad	Valoración	Zona	Variedad	Valoración
Baja	Borbón	2	Baja	Caturra	5
Baja	Borbón	5	Baja	Caturra	9
Baja	Borbón	15	Baja	Caturra	8
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	2
Baja	Borbón	1	Baja	Caturra	7
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	6
Baja	Borbón	2	Baja	Caturra	2
Baja	Borbón	6	Baja	Caturra	4
Baja	Borbón	3	Baja	Caturra	3
Alta	Borbón	5	Alta	Caturra	15
Alta	Borbón	5	Alta	Caturra	6
Alta	Borbón	3	Alta	Caturra	6
Alta	Borbón	3	Alta	Caturra	10
Alta	Borbón	8	Alta	Caturra	6
Alta	Borbón	6	Alta	Caturra	7
Alta	Borbón	2	Alta	Caturra	2
Alta	Borbón	3	Alta	Caturra	5
Alta	Borbón	11	Alta	Caturra	2
Baja	Borbón	10	Baja	Caturra	2
Baja	Borbón	10	Baja	Caturra	3
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	5
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	2
Baja	Borbón	8	Baja	Caturra	0
Baja	Borbón	7	Baja	Caturra	1
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	1
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	2

Continuación

Zona	Variedad	Valoración	Zona	Variedad	Valoración
Baja	Borbón	4	Baja	Caturra	0
Alta	Borbón	15	Alta	Caturra	13
Alta	Borbón	2	Alta	Caturra	6
Alta	Borbón	5	Alta	Caturra	4
Alta	Borbón	7	Alta	Caturra	5
Alta	Borbón	8	Alta	Caturra	8
Alta	Borbón	5	Alta	Caturra	7
Alta	Borbón	2	Alta	Caturra	2
Alta	Borbón	10	Alta	Caturra	5
Alta	Borbón	7	Alta	Caturra	5

9.13 Análisis de la varianza (ANOVA)

9.13.1 Análisis de la varianza de la determinación de cafeína

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cafeína	252	0.182	0.172	8.174

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.208	3	0.069	18.434	<0.0001
Zona	0.163	1	0.163	43.236	<0.0001
Variedad	0.001	1	0.001	0.216	0.6428
Zona*Variedad	0.018	1	0.018	4.746	0.0303
Error	0.933	248	0.004		
Total	1.140	251			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.01601

Error: 0.0038 gl: 248

Zona	Medias	n	E.E.
Alta	0.767	180	0.005 A
Baja	0.704	72	0.008 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.01529

Error: 0.0038 gl: 248

Variedad	Medias	n	E.E.
Caturra	0.738	108	0.008 A
Borbon	0.733	144	0.005 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.02347

Error: 0.0038 gl: 248

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.
Alta	Caturra	0.779	90	0.006 A
Alta	Borbon	0.754	90	0.006 B
Baja	Borbon	0.713	54	0.008 C
Baja	Caturra	0.696	18	0.014 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

9.13.2 Análisis de la varianza de la determinación de 3-CQA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3-CQA (g/100g)	126	0.386	0.371	19.851

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.320	3	0.107	25.529	<0.0001
Zona	0.201	1	0.201	48.017	<0.0001
Variedad	0.020	1	0.020	4.827	0.0299
Zona*Variedad	4.0E-04	1	4.0E-04	0.096	0.7576
Error	0.510	122	0.004		
Total	0.830	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.02399

Error: 0.0042 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.
Alta	0.356	90	0.007 A
Baja	0.258	36	0.012 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.02292**

Error: 0.0042 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.
Caturra	0.323	54	0.012 A
Borbon	0.292	72	0.008 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.03517**

Error: 0.0042 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.
Alta	Caturra	0.370	45	0.010 A
Alta	Borbon	0.343	45	0.010 A
Baja	Caturra	0.276	9	0.022 B
Baja	Borbon	0.240	27	0.012 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)**9.13.3 Análisis de la varianza de la determinación de 4-CQA****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4-CQA (g/100g)	126	0.392	0.377	19.467

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.456	3	0.152	26.189	<0.0001
Zona	0.313	1	0.313	53.919	<0.0001
Variedad	0.013	1	0.013	2.202	0.1404
Zona*Variedad	0.002	1	0.002	0.291	0.5904
Error	0.708	122	0.006		
Total	1.163	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.02826

Error: 0.0058 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.
Alta	0.429	90	0.008 A
Baja	0.306	36	0.015 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.02700

Error: 0.0058 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.
Caturra	0.380	54	0.014 A
Borbon	0.355	72	0.009 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.04143

Error: 0.0058 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.
Alta	Caturra	0.437	45	0.011 A
Alta	Borbon	0.421	45	0.011 A
Baja	Caturra	0.323	9	0.025 B
Baja	Borbon	0.289	27	0.015 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.13.4 Análisis de la varianza de la determinación de 5-CQA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
5-CQA (g/100g)	126	0.408	0.394	20.034

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.972	3	0.657	28.038	<0.0001
Zona	1.270	1	1.270	54.188	<0.0001
Variedad	0.097	1	0.097	4.128	0.0443
Zona*Variedad	0.009	1	0.009	0.368	0.5454
Error	2.860	122	0.023		
Total	4.832	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.05681

Error: 0.0234 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.
Alta	0.841	90	0.016 A
Baja	0.594	36	0.029 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.05428

Error: 0.0234 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.
Caturra	0.752	54	0.028 A
Borbon	0.683	72	0.019 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.08329

Error: 0.0234 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.	
Alta	Caturra	0.865	45	0.023	A
Alta	Borbon	0.817	45	0.023	A
Baja	Caturra	0.638	9	0.051	B
Baja	Borbon	0.550	27	0.029	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.13.5 Análisis de varianza de la determinación de 3,5-diCQA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3,5-diCQA (g/100g) ..	126	0.266	0.248	35.378

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.003	3	0.001	14.724	<0.0001
Zona	0.001	1	0.001	22.783	<0.0001
Variedad	3.2E-04	1	3.2E-04	5.396	0.0218
Zona*Variedad	5.1E-05	1	5.1E-05	0.858	0.3560
Error	0.007	122	5.9E-05		
Total	0.010	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.00285

Error: 0.0001 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.	
Alta	0.024	90	0.001	A
Baja	0.016	36	0.001	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.00273

Error: 0.0001 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.	
Caturra	0.022	54	0.001	A
Borbon	0.018	72	0.001	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.00418

Error: 0.0001 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.		
Alta	Caturra	0.026	45	0.001	A	
Alta	Borbon	0.023	45	0.001	A	B
Baja	Caturra	0.019	9	0.003	B	C
Baja	Borbon	0.014	27	0.001		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.13.6 Análisis de varianza de la determinación de 3,4-diCQA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Iso-Clorogénico B (g/100g) ..	126	0.006	0.000	53.075

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5.7E-05	3	1.9E-05	0.262	0.8526
Zona	1.1E-05	1	1.1E-05	0.156	0.6936
Variedad	4.6E-06	1	4.6E-06	0.064	0.8014
Zona*Variedad	1.9E-05	1	1.9E-05	0.260	0.6109
Error	0.009	122	7.2E-05		
Total	0.009	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.00316

Error: 0.0001 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.
Alta	0.016	90	0.001 A
Baja	0.015	36	0.002 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.00302

Error: 0.0001 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.
Caturra	0.016	54	0.002 A
Borbon	0.016	72	0.001 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.00463

Error: 0.0001 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.
Alta	Caturra	0.017	45	0.001 A
Baja	Borbon	0.016	27	0.002 A
Alta	Borbon	0.015	45	0.001 A
Baja	Caturra	0.015	9	0.003 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.13.7 Análisis de varianza de ácidos cafeoilquímicos totales (CQT)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ácidos cafeoilquímicos totales	126	0.40	0.38	19.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.28	3	2.43	26.89	<0.0001
Zona	4.73	1	4.73	52.41	<0.0001
Variedad	0.34	1	0.34	3.82	0.0529
Zona*Variedad	0.02	1	0.02	0.27	0.6057
Error	11.02	122	0.09		
Total	18.30	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.11150

Error: 0.0903 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.	
Alta	1.67	90	0.03	A
Baja	1.19	36	0.06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.10654

Error: 0.0903 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.	
Caturra	1.49	54	0.05	A
Borbon	1.36	72	0.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.16347

Error: 0.0903 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.	
Alta	Caturra	1.71	45	0.04	A
Alta	Borbon	1.62	45	0.04	A
Baja	Caturra	1.27	9	0.10	B
Baja	Borbon	1.11	27	0.06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.13.8 Análisis de la varianza de la actividad antioxidante ORAC

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ORAC (µMTE/g)	126	0.25	0.23	18.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1545857.05	3	515285.68	13.26	<0.0001
Zona	376039.07	1	376039.07	9.67	0.0023
Variedad	572657.11	1	572657.11	14.73	0.0002
Zona*Variedad	98905.22	1	98905.22	2.54	0.1133
Error	4742699.21	122	38874.58		
Total	6288556.26	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=73.16257

Error: 38874.5837 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.	
Alta	1140.52	90	20.78	A
Baja	1005.97	36	37.94	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=69.90265

Error: 38874.5837 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.	
Caturra	1156.27	54	36.00	A
Borbon	990.22	72	24.00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=107.25593

Error: 38874.5837 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.	
Alta	Caturra	1189.04	45	29.39	A
Baja	Caturra	1123.49	9	65.72	A B
Alta	Borbon	1092.00	45	29.39	B
Baja	Borbon	888.44	27	37.94	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

9.13.9 Análisis de varianza de la actividad antioxidante DPPH

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DPPH (µMTE/g)	126	0.54	0.53	5.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1157892.39	3	385964.13	48.44	<0.0001
Zona	554556.35	1	554556.35	69.60	<0.0001
Variedad	317860.15	1	317860.15	39.89	<0.0001
Zona*Variedad	30307.41	1	30307.41	3.80	0.0534
Error	972110.61	122	7968.12		
Total	2130003.01	125			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=33.12333

Error: 7968.1198 gl: 122

Zona	Medias	n	E.E.
Alta	1676.52	90	9.41 A
Baja	1513.12	36	17.18 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=31.64745

Error: 7968.1198 gl: 122

Variedad	Medias	n	E.E.
Borbon	1656.68	72	10.86 A
Caturra	1532.97	54	16.30 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=48.55862

Error: 7968.1198 gl: 122

Zona	Variedad	Medias	n	E.E.
Alta	Borbon	1757.48	45	13.31 A
Alta	Caturra	1595.57	45	13.31 B
Baja	Borbon	1555.87	27	17.18 B
Baja	Caturra	1470.36	9	29.75 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

9.13.10 Análisis de varianza de la evaluación sensorial del grado de amargo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Grado de amargo	72	0.11	0.07	62.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	88.78	3	29.59	2.70	0.0525
Variedad	10.89	1	10.89	0.99	0.3225
Zona	53.39	1	53.39	4.87	0.0307
Variedad*Zona	24.50	1	24.50	2.23	0.1396
Error	745.67	68	10.97		
Total	834.44	71			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.55749

Error: 10.9657 gl: 68

Variedad	Medias	n	E.E.
Caturra	4.89	36	0.55 A
Borbon	5.67	36	0.55 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.55749

Error: 10.9657 gl: 68

Zona	Medias	n	E.E.
Baja	4.42	36	0.55 A
Alta	6.14	36	0.55 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.20263

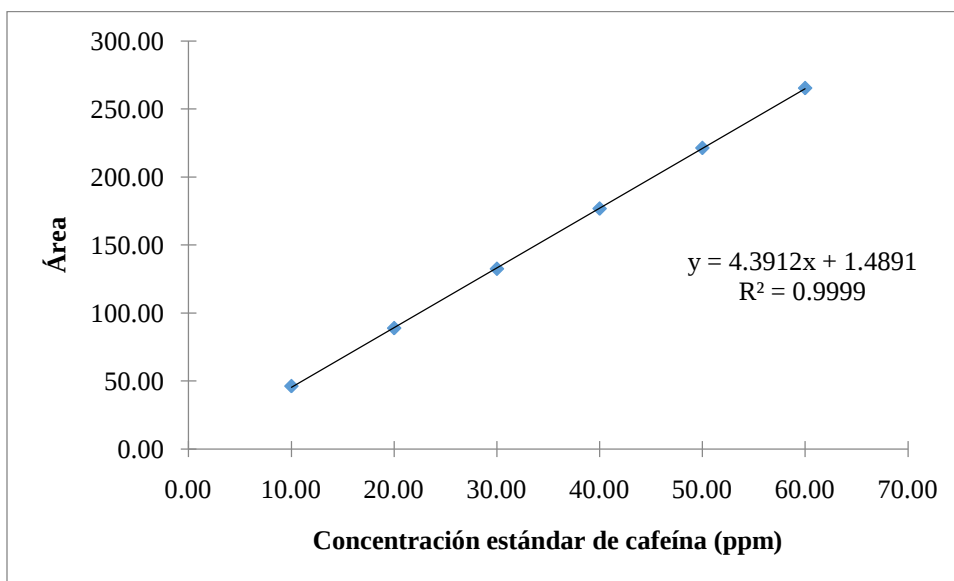
Error: 10.9657 gl: 68

Variedad	Zona	Medias	n	E.E.
Caturra	Baja	3.44	18	0.78 A
Borbon	Baja	5.39	18	0.78 A B
Borbon	Alta	5.94	18	0.78 B
Caturra	Alta	6.33	18	0.78 B

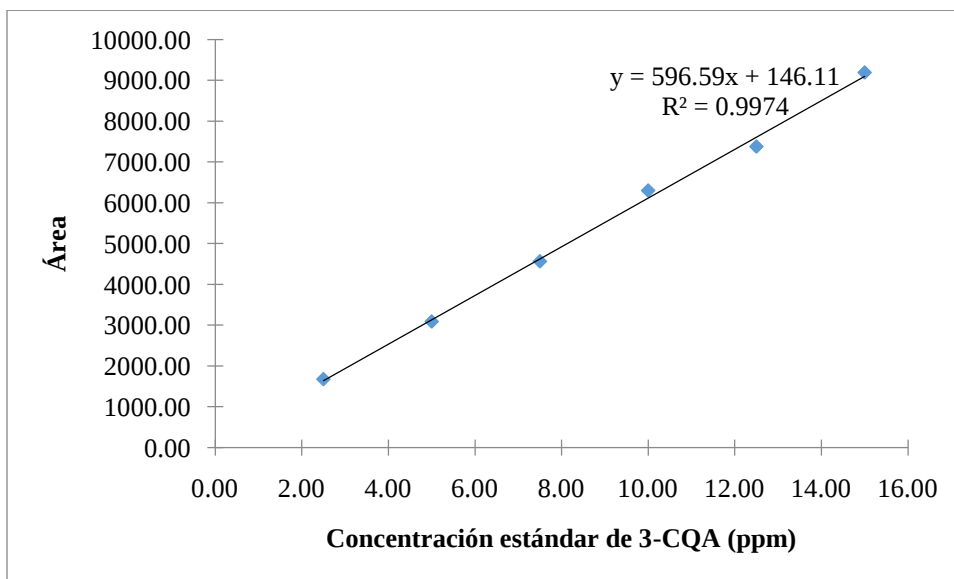
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

9.14 Curvas de calibración cafeína, ácidos clorogénicos y actividad antioxidante

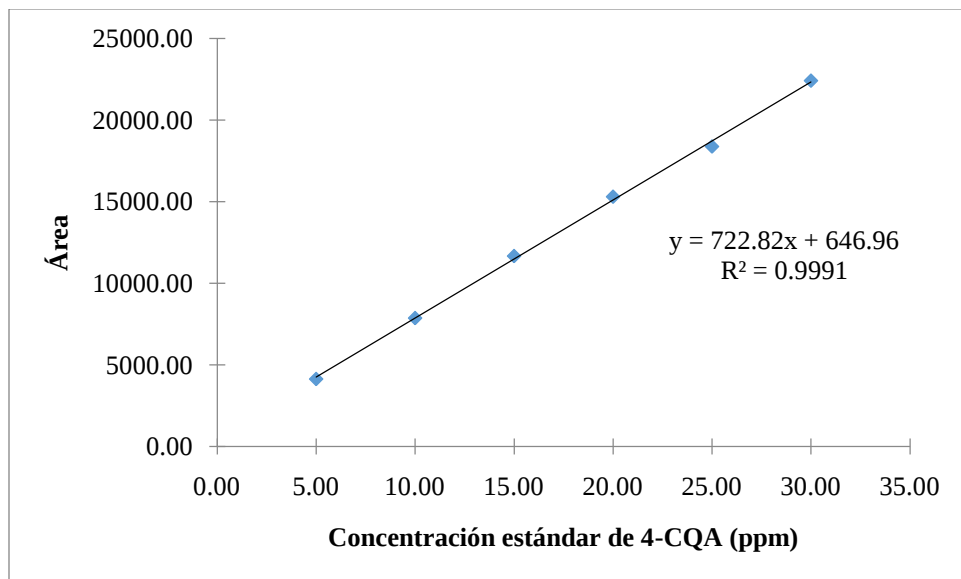
9.14.1 Curva de calibración determinación de cafeína



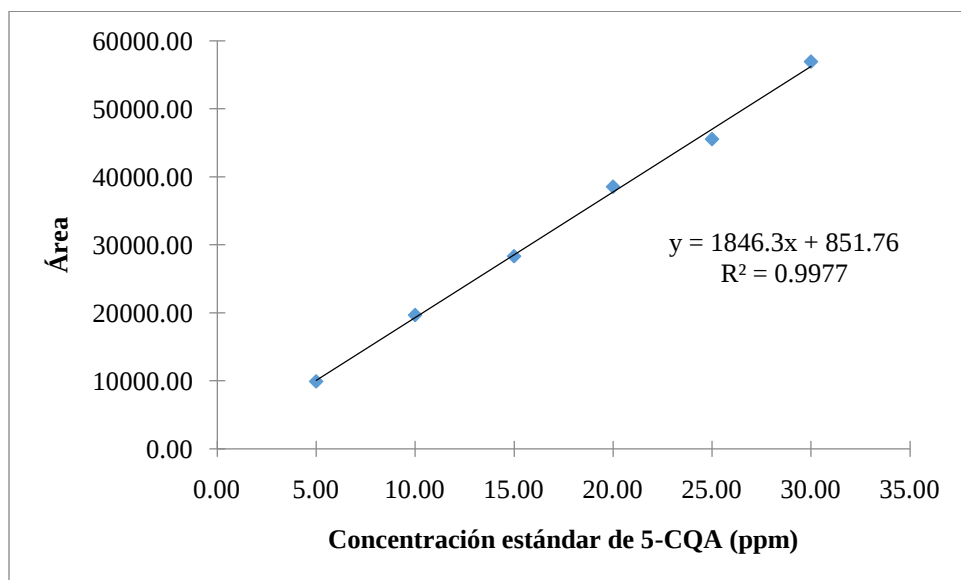
9.14.2 Curva de calibración determinación de 3-CQA



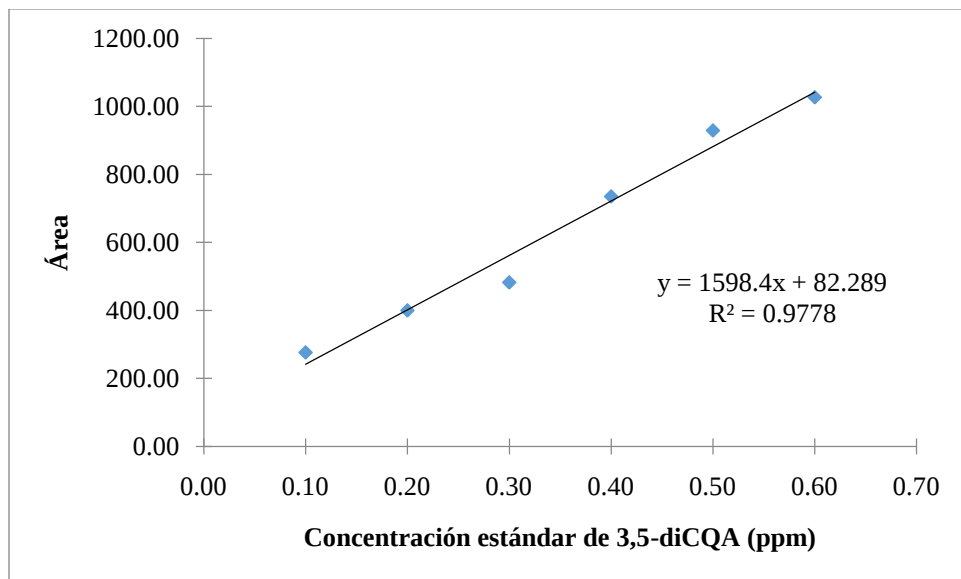
9.14.3 Curva de calibración determinación de 4-CQA



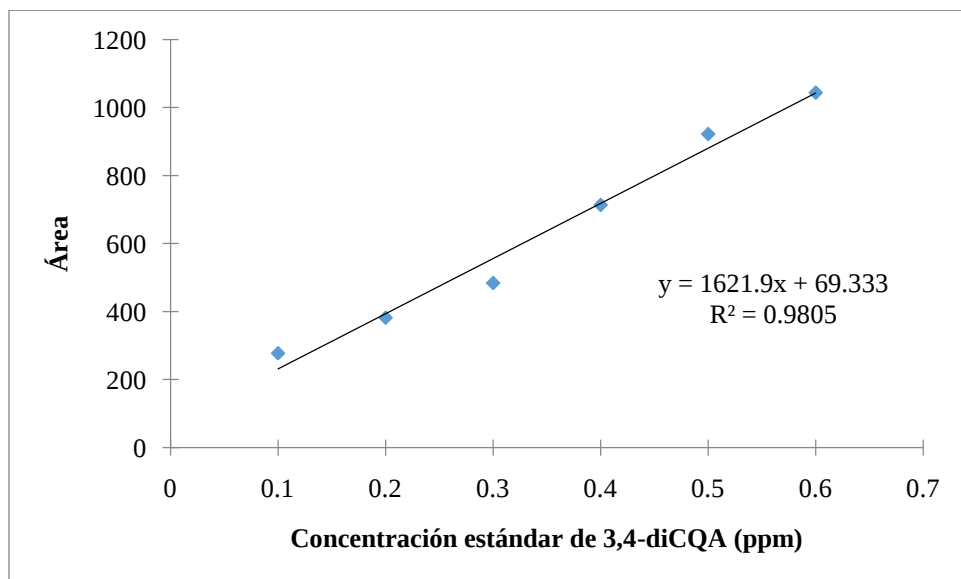
9.14.4 Curva de calibración determinación de 5-CQA



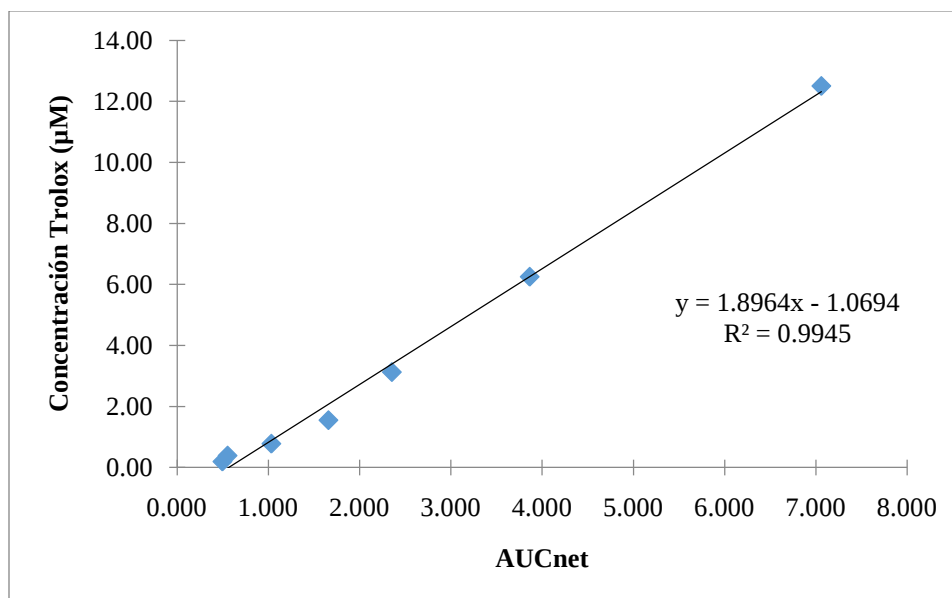
9.14.5 Curva de calibración determinación de 3,5-diCQA



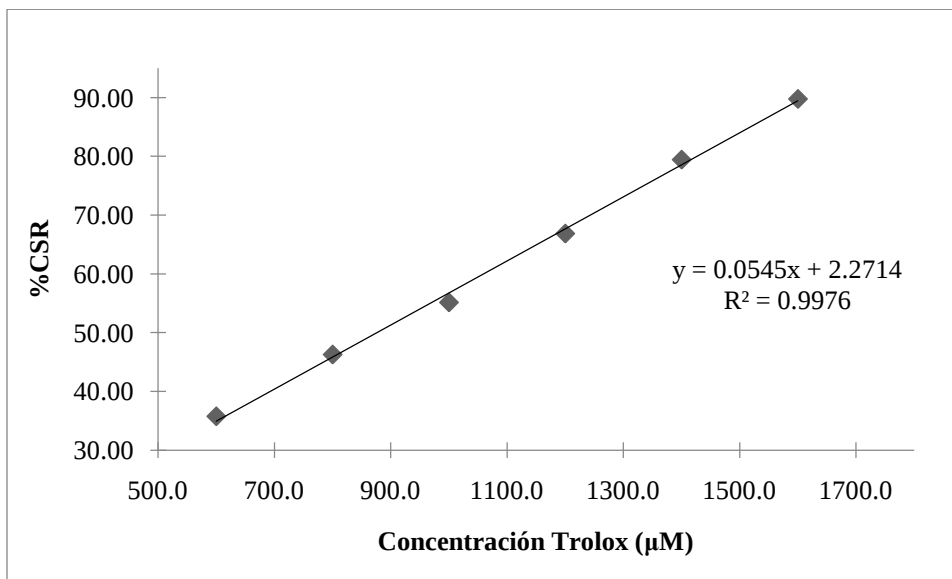
9.14.6 Curva de calibración determinación de 3,4-diCQA



9.14.7 Curva de calibración de Trolox para la actividad antioxidante ORAC



9.14.8 Curva de calibración de Trolox para la actividad antioxidante DPPH



9.15 Autorización del Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación

	Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación CPSHI/IRB 00002053 Universidad de Puerto Rico – Recinto Universitario de Mayagüez Decanato de Asuntos Académicos Call Box 9000 Mayagüez, PR 00681-9000	
---	--	---

25 de abril de 2014

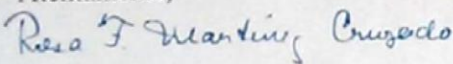
Sr. Andrés Sebastián Salinas Trujillo
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Colegio de Ciencias Agrícolas
Recinto Universitario de Mayagüez
Call Box 9000
Mayagüez, PR 00681-9000

Estimado Sr. Salinas Trujillo:

Como presidente del Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación (CPSHI), he estudiado la documentación sometida para el proyecto titulado *Cuantificación de ácidos clorogénicos y actividad antioxidante en dos variedades de café (Coffea arabica) por LC-MS y correlación con sus propiedades*.

Hemos determinado que, por limitarse la participación de los seres humanos a un estudio sensorial para establecer si hay diferencia significativa entre la percepción del amargo de diferentes cafés tostados y no se usan aditivos, su proyecto está exento bajo la cláusula 45 CFR 46.101(b)(6) de todos los requisitos de la parte 45 CFR 46. En otras palabras, no requiere de nuestra aprobación para proceder.

Agradecemos su compromiso con los más altos estándares de protección de los seres humanos en la investigación. Quedamos de usted,

Atentamente,

Rosa F. Martínez Cruzado, Ph.D.
Presidente
CPSHI/IRB
UPR - RUM

Teléfono: (787) 832 - 4040 x 6277, 3807, 3808 – Fax: (787) 831-2085 – Página Web: www.uprm.edu/cpschi
Email: cpshi@uprm.edu

