



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

INGENIERO QUÍMICO

TRABAJO DE TITULACIÓN

Optimización de la extracción de compuestos fenólicos de café
utilizando metodología de superficie de respuesta

Autor (a): Abad Abad, Manuel Bolívar

Director (a): Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny

LOJA - ECUADOR
2021



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2021

Aprobación del director del trabajo de titulación

Loja, 1 de septiembre de 2021

Magíster

Natalí Elizabeth Solano Cueva

Coordinadora de Titulación

Ciudad. -

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado: Optimización de la extracción de compuestos fenólicos de café utilizando metodología de superficie de respuesta realizado por Manuel Bolívar Abad Abad, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, PhD.

C.I: 1103596167

Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, Manuel Bolívar Abad Abad, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: Optimización de la extracción de compuestos fenólicos de café utilizando metodología de superficie de respuesta, de la Titulación Ingeniería Química, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo 1. Marco teórico, Capítulo 2. Metodología, Capítulo 3. Resultados y discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo el PhD. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, director del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación con la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Autor: Manuel Bolívar Abad Abad

C.I.: 1900861871

Dedicatoria

Siempre me he sentido maravillado por la familia que tengo, se han preocupado de mí desde el momento en que llegué a este mundo, me han formado para saber cómo luchar y salir victorioso ante las adversidades de la vida, es por ello, que el presente trabajo va dedicado a mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, quien con sus enseñanzas y su buen ejemplo me han permitido lograr cumplir mi proyecto de tesis.

A mis profesores, por su arduo trabajo a mi lado y por darme la fuerza necesaria para poder formarme en el ámbito educativo y personal.

A mis compañeros, amigos y demás personas cercanas que de una u otra forma han sido parte de este proceso.

Agradecimiento

Mi agradecimiento se dirige a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto y me ha permitido contar con mi familia, a Dios, al que en todo momento está conmigo apoyándome a mejorar mis errores y siendo el guía del destino de mi vida.

La vida está plagada de retos, y uno de ellos es la Universidad. Tras verme inmerso dentro de ella, me he dado cuenta de que más allá de ser un reto, es una base para mi vida y mi futuro. Por lo cual, mi agradecimiento eterno a la Universidad Técnica Particular de Loja, después de años de esfuerzo, sacrificios, dedicación y grandes alegrías llegó el día en que miraría hacia atrás el camino recorrido por tus pasillos y aulas, y me detendría para agradecerle mi Alma Mater.

A mi tutor del Trabajo de Titulación, el Dr. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, sin usted, sin sus virtudes, paciencia y constancia este trabajo no se hubiese logrado realizar. Sus consejos siempre fueron útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para realizar lo que hoy he alcanzado a obtener, usted formó parte importante de esta pequeña historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Muchas gracias por sus palabras de aliento, cuando más las necesite; por estar allí cuando mis horas de trabajo se hacían confusas.

Gracias a todos.

Índice de contenidos

Carátula.....	I
Aprobación del director del trabajo de titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de contenidos	VII
Índice de figuras.....	IX
Índice de ecuaciones	IX
Lista de abreviaturas	X
Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Capítulo uno.....	5
1 Marco teórico	5
1.1 Café.....	5
1.1.1 <i>Historia del café</i>	5
1.1.2 <i>Café en Ecuador</i>	5
1.1.3 <i>El Cafeto</i>	6
1.2 El café y su relación con la salud humana.....	6
1.2.1 <i>Enfermedad cardiovascular</i>	7
1.2.2 <i>Diabetes Mellitus</i>	8
1.2.3 <i>Cáncer</i>	8
1.3 Química del café	8
1.3.1 <i>Compuestos fenólicos y su clasificación</i>	9
1.3.2 <i>Compuestos fenólicos presentes en el café</i>	10
1.4 Análisis de compuestos fenólicos del café	12
1.4.1 <i>Métodos de extracción</i>	12
1.4.2 <i>Técnicas analíticas para cuantificar compuestos fenólicos</i>	13
1.5 Metodología de superficie de respuesta	14
Capítulo dos	16
2 Metodología y Materiales.....	16
2.1 Muestra	16
2.1.1 <i>Obtención de la muestra</i>	16
2.1.2 <i>Preparación de la muestra</i>	16
2.2 Diseño experimental	16
2.3 Proceso de extracción de compuestos fenólicos.....	17
2.3.1 <i>Extracción asistida por ultrasonido</i>	17
2.4 Determinaciones analíticas	17

2.4.1	<i>Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	17
2.4.2	<i>Preparación del estándar de ácido gálico</i>	18
2.5	Análisis estadístico	19
Capítulo tres		21
3	Resultados y discusión	21
3.1	Influencia de los parámetros de extracción	21
3.1.1	<i>Concentración de solvente</i>	21
3.1.2	<i>Tiempo y temperatura de extracción</i>	23
3.2	Linealidad del método	23
3.3	Optimización mediante metodología de superficie de respuesta.	25
3.3.1	<i>Análisis estadístico</i>	26
3.3.2	<i>Ecuación de regresión</i>	28
3.3.3	<i>Optimización del proceso</i>	28
Conclusiones		33
Recomendaciones		34
Referencias		35
Apéndice		46

Índice de tablas

Tabla 1 Promedio de la composición química de los granos de café en base seca.....	9
Tabla 2 Clasificación de los compuestos fenólicos según su estructura química básica enunciada por Harborne	10
Tabla 3 Factores y niveles de diseño para la optimización de las condiciones de extracción de TPC16	
Tabla 4 Datos de la solución madre de ácido gálico	19
Tabla 5 Datos de la preparación de los estándares de ácido gálico.....	19
Tabla 6 Contenido total de fenoles en función de la temperatura, tiempo y porcentaje de EtOH	21
Tabla 7 Concentraciones y absorbancias de las soluciones del estándar de ácido gálico	24
Tabla 8 P-valor para cada variable e interacción en la cuantificación de compuestos fenólicos	26
Tabla 9 Variables óptimas de extracción.....	29

Índice de figuras

Figura 1 Fruto del café y su estructura	6
Figura 2 Estructura del ácido clorogénico.....	11
Figura 3 Estructura química de los principales ácidos clorogénicos	11
Figura 4 Cavitación acústica.	12
Figura 5 Representación gráfica de las burbujas de cavitación.	13
Figura 6 Principales partes de un espectrofotómetro	14
Figura 7 Diseño de Box-Behnken de tres variables.....	15
Figura 8 Diagrama de extracción de los compuestos fenólicos asistida por ultrasonido	17
Figura 9 Esquema para el análisis de compuestos fenólicos totales presentes en el café.....	18
Figura 10 Contenido total de fenoles con respecto a la concentración de EtOH	22
Figura 11 Curva del estándar de ácido gálico.....	25
Figura 12 Diagrama de Pareto.....	27
Figura 13 Influencia de la temperatura, tiempo de extracción y concentración de EtOH.....	28
Figura 14 Influencia de la temperatura, tiempo de extracción y concentración de EtOH.....	30
Figura 15 Influencia de la temperatura, tiempo y % EtOH sobre TPC	31

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Concentración de solución stock de ácido gálico.....	18
Ecuación 2 Concentración de la solución de trabajo.....	19
Ecuación 3 Ecuación de regresión cuadrática para el contenido total de fenoles	28
Ecuación 4 Ecuaciones de la curva de calibración del estándar de ácido gálico	46
Ecuación 5 Ecuación para calcular x (concentración).....	47

Lista de abreviaturas

CCD	→	Diseño compuesto central
CGA	→	Ácido Clorogénico
DM	→	Diabetes Mellitus
ECV	→	Enfermedad Cardiovascular
EtOH	→	Etanol
GC	→	Cromatografía de gases
HTA	→	Hipertensión Arterial
OMS	→	Organización Mundial de la Salud
RSM	→	Metodología de Superficie de Respuesta
TPC	→	Contenido total de fenoles
UAE	→	Extracción asistida por ultrasonido

Resumen

La presente investigación describe la extracción de compuestos fenólicos de café utilizando la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y como solventes se utilizó EtOH y agua. Las condiciones óptimas se determinaron utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM), se utilizó el diseño experimental de Box-Behnken codificado en tres niveles (-1, 0, +1) y tres variables independientes: temperatura (25, 47.5, 70 °C), concentración de EtOH (0, 50, 100 %) y tiempo de extracción de (5, 102.5, 200 min). Los datos se analizaron utilizando el software estadístico MINITAB 16, las condiciones óptimas para la extracción de TPC fueron: tiempo de extracción de 160.6 min, temperatura de 46.4 °C y concentración de EtOH de 36.4 % en el que se obtiene un valor máximo de TPC de 3675 mg EAG/100 g.

Palabras claves: café, contenido total de fenoles, extracción asistida por ultrasonido.

Abstract

The following research describes the extraction of phenolic compounds from coffee by using ultrasound-assisted extraction (UAE) and as solvents EtOH and water were used. The optimal conditions were determined by using the response surface methodology (RSM), the Box-Behnken experimental design coded at three levels (1, 0, +1) and three independent variables: temperature (25, 47.5, 70 °C), EtOH concentration (0, 50, 100%) and extraction time of (5, 102.5, 200 min). The data were analyzed by using MINITAB 16 statistical software, the optimum conditions for TPC extraction were: extraction time of 160,6 minutes, temperature of 46.4 and EtOH concentration of 36.4 % in which a maximum TPC value of 3675 mg EAG/100 g is obtained.

Keywords: coffee, total phenol content, ultrasound-assisted extraction.

Introducción

El café desde hace más de dos siglos y hasta la actualidad es considerado como una de las bebidas más populares a nivel mundial por su deseable sabor y aroma como también por sus propiedades estimulantes que presenta en su composición, además, es considerado el segundo producto industrial más grande del mundo (Mussatto, Machado, Martins, & Teixeira, 2011; Sunarharum, Williams, & Smyth, 2014).

Ecuador posee una gran capacidad de producción cafetalera debido a la variedad de ecosistemas presentes, las variedades más cultivadas y comercializadas a nivel nacional son *Coffea arábico L.* y *Coffea Canephora P.*, la primera especie es considerada la de mayor calidad a nivel nacional debido a sus propiedades organolépticas que presenta y su producción se concentra en las provincias de Manabí (Especialmente Jipijapa), Loja, Galápagos y en las estribaciones de la cordillera Occidental de los Andes (Jácome & Garrido, 2017).

En los últimos años se ha evidenciado un incremento en el consumo del café debido al contenido en sustancias bioactivas y propiedades nutraceuticas presentes en su composición ofreciendo protección contra enfermedades neurodegenerativas, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad hepática, cáncer entre otras enfermedades que afectan la salud del ser humano (Messina et al., 2015; Zengin et al., 2020). Este efecto protector se debe a la presencia de los compuestos fenólicos, cafeína, los compuestos formados en la reacción de Maillard (melanoidinas) y ligninas que poseen propiedades antioxidantes, anticancerígenas o antimicrobianas. Debido a estas propiedades los compuestos fenólicos han recibido un alto interés ya que pueden utilizarse en alimentos y en la prevención de enfermedades antes mencionadas (Ferruzzi, 2010; Valdés et al., 2015).

En la actualidad, existen múltiples estudios de extracción de compuestos fenólicos por ultrasonido (Arauzo et al., 2020; Medina-Torres, Ayora-Talavera, Espinosa-Andrews, Sánchez-Contreras, & Pacheco, 2017) e identificación de compuestos fenólicos basados en la técnica analítica de espectrofotometría UV-VIS que debido a su versatilidad, simplicidad,

velocidad y precisión se puede evaluar con facilidad los atributos que presenta el café (Neo, Ariffin, Tan, & Tan, 2008). Sin embargo, el proceso de extracción por ultrasonido se ve afectado por una variedad de parámetros que interfieren potencialmente en la calidad del extracto, motivo por el cual es necesario optimizar este método de extracción con la finalidad de maximizar el rendimiento de los compuestos fenólicos.

Los objetivos planteados en la presente investigación fueron, determinar el contenido de fenoles totales presentes en el café y desarrollar un diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta.

El presente Trabajo Final de Titulación está organizado en capítulos en los que se presenta una descripción del trabajo realizado, en el capítulo uno se presenta el contenido teórico acerca del tema de investigación; en el capítulo dos se describe la metodología empleada en el desarrollo de la presente investigación; en el capítulo tres se realiza un análisis de resultados a profundidad y discusión de los mismos con datos bibliográficos y finalmente se describe las conclusiones y recomendaciones para nuevos estudios en el futuro.

Capítulo uno

1 Marco teórico

1.1 Café

1.1.1 Historia del café

El árbol de café tiene sus inicios antes del siglo IX en el continente africano, específicamente en las regiones montañosas de Etiopía, provincia de Kaffa; descubierto por un pastor yemení que observó un comportamiento extraño en su rebaño, tras ingerir los frutos rojos de café las cabras permanecían sin dormir, lo que provocó curiosidad en el joven y arrancó varios frutos y los llevó a un convento para mostrarle al superior, realizaron infusiones concluyendo que el fruto de café producía ese efecto en el rebaño (Clarke, 2012; Flament, 2001).

Los árabes tenían una rigurosa política de no exportar granos fértiles de café, impidiendo que no se pueda cultivar en otras partes; en el año 1616 los holandeses lograron extraer las semillas y las cultivaron en invernaderos, el café alcanzó su completa aceptabilidad en el siglo XVIII, consolidándose posteriormente en América del sur (Morris, 2018; Weinberg & Bealer, 2004).

1.1.2 Café en Ecuador

En el país se cultivan y comercializan mayoritariamente dos especies de café: *Coffea arábica* L (Café de altura) y *Coffea canephora* P (Café de tierras bajas). El *Coffea arábica* L fue la primera variedad que ingresó en el Ecuador en tiempos de la colonia y es considerado el de mejor calidad a nivel nacional, su producción se concentra en las provincias de Manabí (especialmente en Jipijapa), Loja y en las estribaciones de la Cordillera Occidental de los Andes. El *Coffea canephora* P ingresó a mediados del siglo XX, se propagó por las zonas tropicales y húmedas de la región Costa y en los años 70s se extendió a la región Amazónica (Barrezueta-Unda, Blacio, & Abad, 2018; Jácome & Garrido, 2017).

En Ecuador, el café involucra muchas etnias y pueblos de 23 provincias que se dedican a cultivarlo, posee una gran importancia en el aspecto económico, ya que es una fuente de divisas e ingresos para los agricultores (Ponce Vaca, Orellana Suárez, Acuña Velásquez,

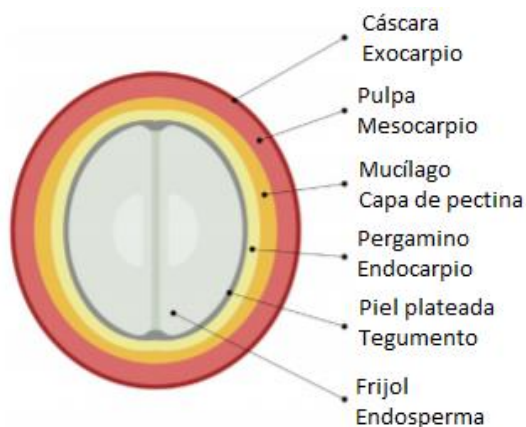
Alfonso Alemán, & Fuentes Figueroa, 2018). Según la FAO (2019) en el Ecuador se cosechó 31924 hectáreas de café con una producción de 8141 toneladas a un rendimiento de 1587 hg/ha para el año 2019.

1.1.3 **El Cafeto**

El cafeto, es un arbusto de hoja perenne, de producción anual entre los meses de junio a agosto, y pertenece al género *Coffea*, familia de las rubiáceas. Estas plantas tropicales pueden alcanzar una altura de hasta 10 metros, presentan hojas opuestas de color verde brillante con márgenes lisos, sus flores son hermafroditas de color blanco que crecen en las axilas de las hojas y a partir de ellas, dan origen a los frutos. El fruto del cafeto es una drupa poliesperma, carnoso, de color verde al inicio, pero en estado de madurez se torna de un color rojizo o amarillo tomando el nombre de “cereza” (Esquivel & Jimenez, 2012; Ferreira, Shuler, Guimarães, & Farah, 2019). En la (Figura 1) se presenta el fruto de café y su estructura.

Figura 1

Fruto del café y su estructura



Nota: Tomado de de Melo Pereira et al. (2020).

1.2 **El café y su relación con la salud humana**

El café es una de las bebidas no alcohólicas más consumidas a nivel mundial, su consumo principalmente se da por su papel a nivel cultural y tradicional (Pérez-Hernández, Chávez-Quiroz, Medina-Juárez, & Meza, 2013). Su alto consumo ha estimulado el desarrollo de múltiples estudios sobre el contenido de sustancias bioactivas y propiedades

nutraceúticas, en el que se ha demostrado efectos positivos de los diferentes compuestos del café en nuestro organismo (de Melo Pereira et al., 2020; Ranheim & Halvorsen, 2005; Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011).

Algunos compuestos constituyentes del café como son los ácidos fenólicos, cafeína, los compuestos formados durante la reacción de Maillard (melanoidinas) y ligninas se ha evidenciado que poseen propiedades antioxidantes (Ramalakshmi, Rao, Takano-Ishikawa, & Goto, 2009; Votavová et al., 2009). Debido a estas propiedades los compuestos fenólicos han recibido un alto interés ya que pueden utilizarse de diferentes maneras en los alimentos y en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, e incluso, neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Boudet, 2007; Grosso, Godos, Galvano, & Giovannucci, 2017; Ramić et al., 2015; van Dam, Hu, & Willett, 2020).

1.2.1 Enfermedad cardiovascular

Según la OMS (2017), la enfermedad cardiovascular (ECV) es un conjunto de trastornos que afectan el corazón y los vasos sanguíneos. Se calcula que para el año 2015 murieron aproximadamente 17,7 millones de personas a causa de ECV, lo cual representa el 31% de las defunciones registradas en el mundo y a hipertensión arterial (HTA) es la enfermedad que presenta el mayor riesgo para ECV (Yusuf et al., 2004).

Un estudio de metaanálisis realizado por D'Elia, La Fata, Galletti, Scafì, y Strazzullo (2019) evaluaron la relación entre el consumo de café y el riesgo de desarrollar HTA, encontrando una relación no lineal entre dosis-respuesta. Mencionan que el consumo de 1-2 tazas de café al día no se asocian de forma significativa con HTA, pero si el consumo es de 3-7 tazas al día generan un efecto protector en el organismo y se confirmó para un mayor consumo. Según Crippa, Discacciati, Larsson, Wolk, y Orsini (2014) mencionan que un consumo de 3 tazas/día genera un menor riesgo de ECV y el excesivo consumo de café no se asoció con ningún riesgo elevado de ECV (Ding, Bhupathiraju, Satija, van Dam, & Hu, 2014).

1.2.2 **Diabetes Mellitus**

Según Molina y Rodríguez (2012), la diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico crónico, caracterizado por sus niveles elevados de glucosa en la sangre que predispone el desarrollo de miocardiopatía diabética y enfermedad cardiovascular aterosclerótica, se calcula que para el año 2014 alrededor de 422 millones de adultos poseían diabetes.

Múltiples estudios epidemiológicos han evaluado el efecto del consumo de café sobre el riesgo de desarrollar diabetes, en el que han encontrado una relación inversa entre el consumo de café (sin adición de azúcar) y la prevalencia de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (Lim, Park, Choi, Ahn, & Ohn, 2019; Van Dam & Feskens, 2002; Van Dam, Willett, Manson, & Hu, 2006). Según Pimentel, Zemdegs, Theodoro, y Mota (2009) el consumo moderado de café (≥ 4 tazas de café/día de 150 ml o ≥ 400 mg de cafeína/día) ha evidenciado una disminución en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y a mayores niveles de consumo de café mayor es la reducción del riesgo de desarrollar DM.

1.2.3 **Cáncer**

Según la IARC (2016), el café está categorizado dentro de los alimentos no cancerígenos, varios estudios epidemiológicos han evidenciado que el consumo de café no se asocia con mayor riesgo de desarrollar cáncer (Loomis et al., 2016; Wang et al., 2016). La ingesta de café genera un efecto protector que se ha asociado a un menor riesgo de desarrollar cáncer endometrial (Je & Giovannucci, 2012), cáncer de hígado (Inoue & Tsugane, 2019; Larsson & Wolk, 2007) y cáncer de mama (Lafranconi et al., 2018; Li et al., 2013).

1.3 **Química del café**

Los granos de café están compuestos por más de 1000 sustancias químicas distintas, en que se incluyen aminoácidos, compuestos nitrogenados, polisacáridos, azúcares, triglicéridos, ácido linoleico, diterpenos (cafestol y kawheol), ácidos volátiles y no volátiles, compuestos fenólicos (ácido clorogénico), metilxantinas (cafeína, teofilina y teobromina), sustancias volátiles (identificadas alrededor de 800 de las cuales de 60 a 80 contribuyen al aroma), vitaminas y minerales (Farah, 2019; Puerta, 2013). Existe una variación importante

en la concentración de estos componentes según la variedad del café (Tabla 1) y el grado de tostación que presente (Gotteland & De Pablo, 2007).

Tabla 1

Promedio de la composición química de los granos de café en base seca

Componente Químico	Arábica (%)	Robusta (%)
Polisacáridos	50,08	56,40
Sacarosa	8,00	4,00
Azúcares reductores	0,10	0,40
Proteínas	9,80	9,50
Aminoácidos	0,50	0,80
Cafeína	1,20	2,20
Trigonelina	1,00	0,70
Lípidos	16,20	10,00
Ácidos alifáticos	1,10	1,20
Ácidos clorogénicos	6,90	10,40
Minerales	4,20	4,40
Compuestos aromáticos	trazas	trazas

Nota: Tomado y adaptado de Puerta (2013).

1.3.1 **Compuestos fenólicos y su clasificación**

Los compuestos fenólicos están distribuidos en todo el reino vegetal, sus estructuras químicas están formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, en el que se incluyen ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Chaves-Ulate & Esquivel-Rodríguez, 2019). Se calcula que existen alrededor de 8000 compuestos fenólicos identificados. Según Harborne citado por Soler Cantero (2009), agrupó los fenoles en 10 clases dependiendo de su estructura química básica. La familia de los flavonoides, con cerca de 4000 estructuras químicas distintas es una de las más representativas y estudiadas en la actualidad. La clasificación se presenta en la (Tabla 2).

Tabla 2

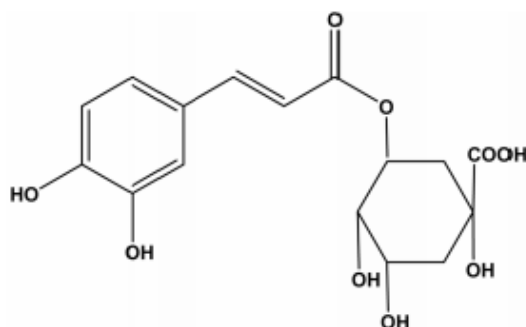
Clasificación de los compuestos fenólicos según su estructura química básica enunciada por Harborne

Número de átomos de carbono	Estructura básica	Clase
6	C ₆	Fenoles Simples, Benzoquinonas
7	C ₆ -C ₁	Ácidos Fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenona, Ácido Fenilacético
9	C ₆ -C ₃	Acidohidroxinámico, Cromonas, Coumarinas, Isocoumarinas, Polipropenos
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides, Isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós, Neolignanós
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
n	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas
	(C ₆) _n	Catecolmelanina
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Nota: Tomado y adaptado de Soler Cantero (2009).

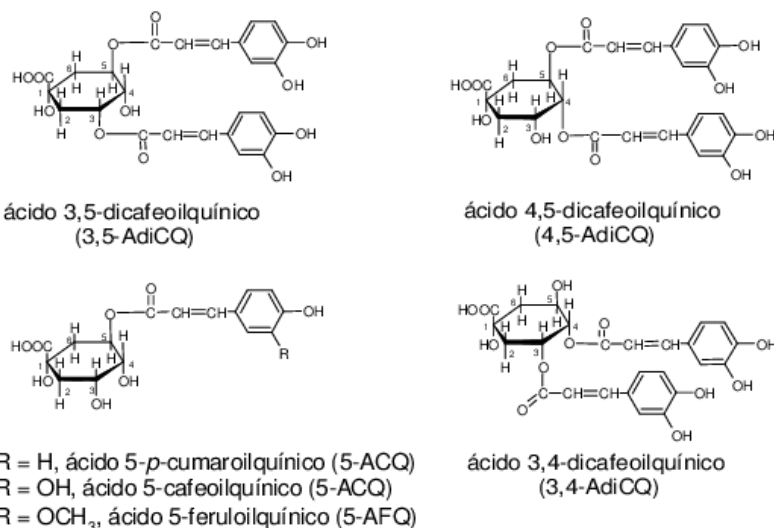
1.3.2 **Compuestos fenólicos presentes en el café**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, principales contribuyentes del sabor y aroma de la bebida de café (Patay, Bencsik, & Papp, 2016), además, poseen propiedades fisiológicas y farmacológicas que actúan como antioxidantes en el organismo. Los principales componentes de la fracción fenólica son los ácidos clorogénicos (CGA) presentes en varias formas de isómeros, los granos de café verde contienen hasta un 10% y en granos tostados comprenden una concentración de hasta un 14% (Abrahão et al., 2010; Król, Gantner, Tatarak, & Hallmann, 2020; Somporn, Kamtuo, Theerakulpisut, & Siriamornpun, 2012).

Figura 2*Estructura del ácido clorogénico*

Nota: Tomado de Stalikas (2007).

Los ácidos clorogénicos están formados por la esterificación del ácido quínico con ácido cafeico, ferúlico o *p*-cumárico. Los principales grupos de CGA que se encuentran presentes en los granos de café son los ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquinas, ácidos feruloilquínicos, ácidos *p*-cumaroilquínicos y ésteres mezclados de ácido cafeico, ferúlico y ácido quínico (Chaves-Ulate & Esquivel-Rodríguez, 2019; Farah & Donangelo, 2006; Stalikas, 2007).

Figura 3*Estructura química de los principales ácidos clorogénicos*

Nota: Principales estructuras de los ácidos clorogénicos presentes en el café.

Tomado y adaptado de Alves, do Nascimento, de Aquino, Chang, y de Morais (2007).

1.4 Análisis de compuestos fenólicos del café

1.4.1 Métodos de extracción

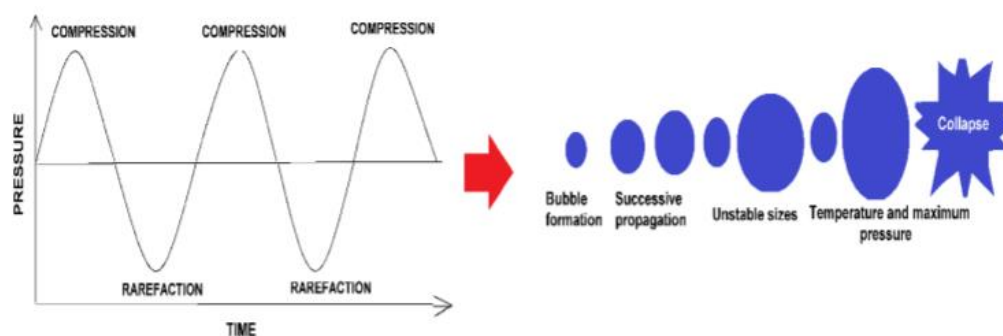
El método de extracción es muy importante en la calidad de obtención del extracto y en la identificación de los compuestos fenólicos (Marcelo-Diaz et al., 2017). La extracción depende del tipo de solvente, la estructura química de los compuestos fenólicos, temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido y método de extracción empleado (Bucić-Kojić et al., 2011; Guntero, Longo, Ciparicci, Martini, & Andreatta, 2015).

Las técnicas más importantes que mejoran el rendimiento en la extracción de compuestos de interés son: extracción asistida por ultrasonido (Dahmoune et al., 2015; Pan, Yu, Zhu, & Qiao, 2012), extracción mediante microondas (Destandau, Michel, & Elfakir, 2013; Yang & Zhai, 2010) y extracción supercrítica (Andrade et al., 2012; Liu et al., 2011).

El método utilizado en esta investigación es la extracción asistida por ultrasonido (UAE), es una técnica que reduce el tiempo de extracción, menor cantidad de disolvente y aumenta el rendimiento (Xu et al., 2017). La UAE se utiliza mayormente en la extracción de compuestos vegetales, debido a su elevada superficie de contacto entre la fase sólida y líquida, además, la cavitación acústica produce la ruptura de las paredes celulares (Figura 4), aumentando el transporte del solvente hacia el tejido vegetal y capilar facilitando la liberación de los compuestos extraíbles (Figura 5) (Da Porto, Porretto, & Decorti, 2013; Muñoz-Márquez et al., 2013).

Figura 4

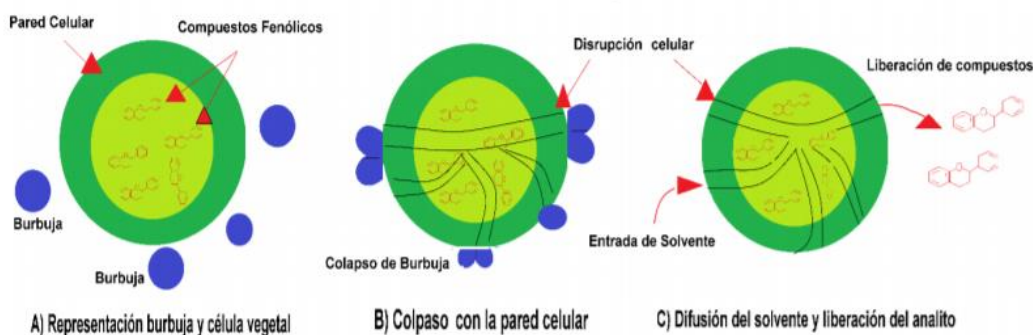
Cavitación acústica.



Nota: Tomado de Medina-Torres et al. (2017)

Figura 5

Representación gráfica de las burbujas de cavitación.



Nota: Tomado de Medina-Torres et al. (2017)

1.4.2 Técnicas analíticas para cuantificar compuestos fenólicos

Dentro de las técnicas analíticas que se utiliza para detectar, caracterizar y cuantificar compuestos fenólicos presentes en diferentes tipos de alimentos, medicamentos, plantas y subproductos de la industria alimentaria se encuentran las técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TCL), cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y las técnicas espectrofotométricas en la que se encuentra la espectrofotometría UV-visible que será la utilizada en la presente investigación (Delgado, Issaoui, & Chammem, 2019; Escarpa & Gonzalez, 2001)

1.4.2.1 Espectrofotometría UV-visible

La espectrofotometría UV-visible ha tenido un amplio impacto dentro de la ciencia y tecnología, esta se basa en el proceso de absorción de la radiación electromagnética (la radiación tiene un rango espectral de 190 a 800 nm) (Passos & Saraiva, 2019). La espectrofotometría es una técnica analítica que debido a su versatilidad, simplicidad, velocidad y precisión permite determinar la concentración de un compuesto en muy pequeñas cantidades de muestras (Germer, Zwinkels, & Tsai, 2014).

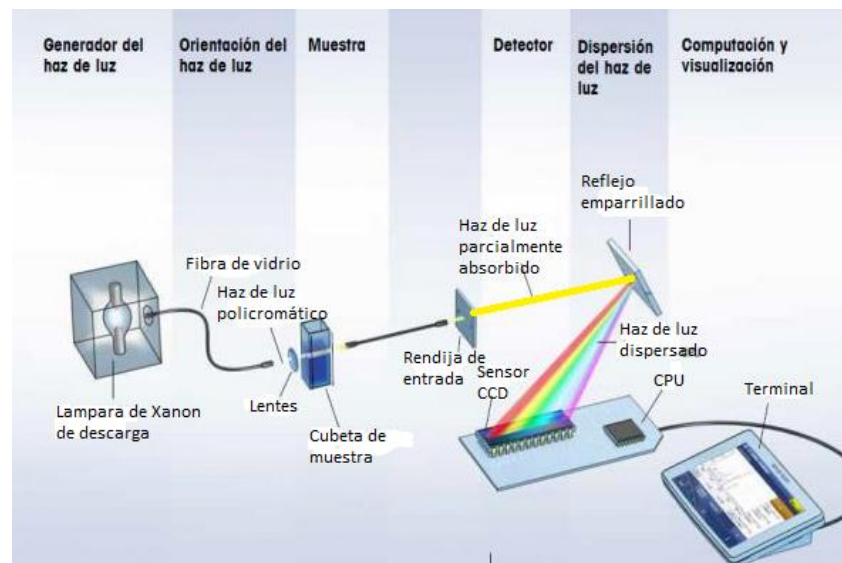
Según la ley de Lambert-Beer describe que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito a determinar (a mayor número de moléculas mayor

interacción con la luz) y a la distancia que recorre la luz a través de la muestra durante el proceso de irradiación (Passos & Saraiva, 2019).

La medición de la absorbancia se realiza en un equipo llamado espectrofotómetro, pueden variar en su diseño, principalmente en la incorporación de ordenadores para el análisis de datos. El espectrofotómetro consta de una fuente de luz, un sistema óptico, un compartimiento de muestras, un detector y un sistema de lectura de datos (Figura 6).

Figura 6

Principales partes de un espectrofotómetro



Nota: Tomado y adaptado de Rodríguez (2018).

1.5 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una técnica de optimización basada en planteamientos factoriales que fue desarrollada por Box y colaboradores en los años 50, desde entonces ha sido una herramienta de gran utilidad para maximizar o minimizar variables independientes y predecir condiciones experimentales óptimas (Khuri & Mukhopadhyay, 2010).

La RSM mediante el modelado y análisis matemáticos busca desarrollar un tratamiento a los problemas en los que una respuesta de interés (y) está influenciada por variables independientes denotadas por X_1, X_2, \dots, X_n . Existe una infinidad de variables independientes que afectan la respuesta de un sistema, por lo que es necesario identificar aquellas que tienen mayor interacción en el sistema, entre las variables más comunes son:

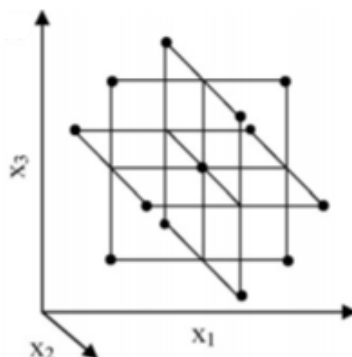
pH, temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido, entre otras (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escaleira, 2008).

La elección del diseño experimental es muy importante en una investigación, ya que está asociada con un modelo matemático que relaciona la respuesta con los factores analizados. Los diseños de primer orden más comunes son: el diseño factorial 2^k , el diseño de Plackett-Burman y el diseño simplex, y los diseños de segundo orden son: el diseño factorial 3^k , el diseño Compuesto Central (CCD), el diseño de Box-Behnken y el diseño de Doehlert (Bezerra et al., 2008; Khuri & Mukhopadhyay, 2010).

En la presente investigación se utilizará el diseño de Box-Behnken, este modelo se ha utilizado mayormente para la optimización de varios procesos químicos y físicos y en menor cantidad en química analítica. Este diseño permite la estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden del modelo matemático. Este modelo posee menos puntos de diseño, por lo que presenta una mayor eficiencia y es menos costoso de realizar que el diseño compuesto central, cabe destacar que este modelo no tiene un diseño factorial incrustado, por lo cual no es adecuado utilizarlo en experimentos secuenciales que poseen un gran número de variables. Los niveles para este diseño deben ajustarse solo en tres niveles (-1, 0, +1) (Bezerra et al., 2008; Khuri & Mukhopadhyay, 2010). En la (Figura 7) se presenta el diseño de Box-Behnken de tres factores.

Figura 7

Diseño de Box-Behnken de tres variables



Nota: Tomado y adaptado de Bezerra et al. (2008).

Capítulo dos

2 Metodología y Materiales

2.1 Muestra

2.1.1 Obtención de la muestra

En la presente investigación se trabajó con muestras de café tostado y molido que se adquirieron en un supermercado de la ciudad de Loja, específicamente de la marca Café Vélez.

2.1.2 Preparación de la muestra

Previo al análisis de las muestras de café tostado y molido estas fueron sometidas a un proceso de tamizado alcanzando un tamaño de partícula de 500 μm .

2.2 Diseño experimental

Los ensayos de extracción de compuestos fenólicos de café se realizaron a través de extracciones sólido-líquido, siguiendo el diseño factorial de Box-Behnken de tres variables independientes, codificado en tres niveles (-1, 0, +1), usando el programa estadístico MINITAB 16. Como respuesta para el diseño se evaluó el contenido total de fenoles presentes en las muestras de café. En la Tabla 3, se presentan las variables estadísticas seleccionadas y su codificación.

Tabla 3

Factores y niveles de diseño para la optimización de las condiciones de extracción de TPC

Variables independientes	Unidad	Niveles		
		-1	0	+1
Concentración de etanol	%	0	50	100
Temperatura	°C	25	47.5	70
Tiempo de extracción	min	5	102.5	200

Nota: Las condiciones para cada ensayo se describen en el Anexo 1.

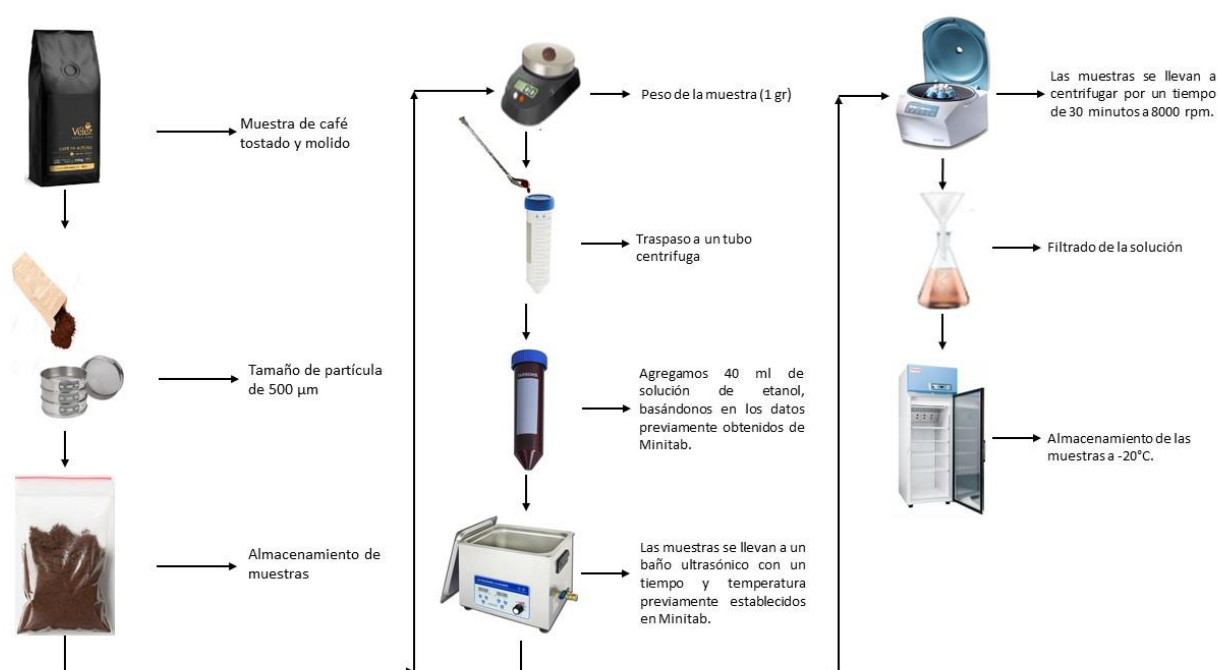
2.3 Proceso de extracción de compuestos fenólicos

2.3.1 Extracción asistida por ultrasonido

Las variables de control en la extracción asistida por ultrasonido fueron la temperatura y el tiempo de extracción, utilizando un baño ultrasónico modelo (Fisher Scientific FS60D). A continuación, en la Figura 8, se muestra una descripción gráfica del proceso de extracción de compuestos fenólicos asistida por ultrasonido.

Figura 8

Diagrama de extracción de los compuestos fenólicos asistida por ultrasonido



Nota: Para cada muestra se sigue el mismo procedimiento.

2.4 Determinaciones analíticas

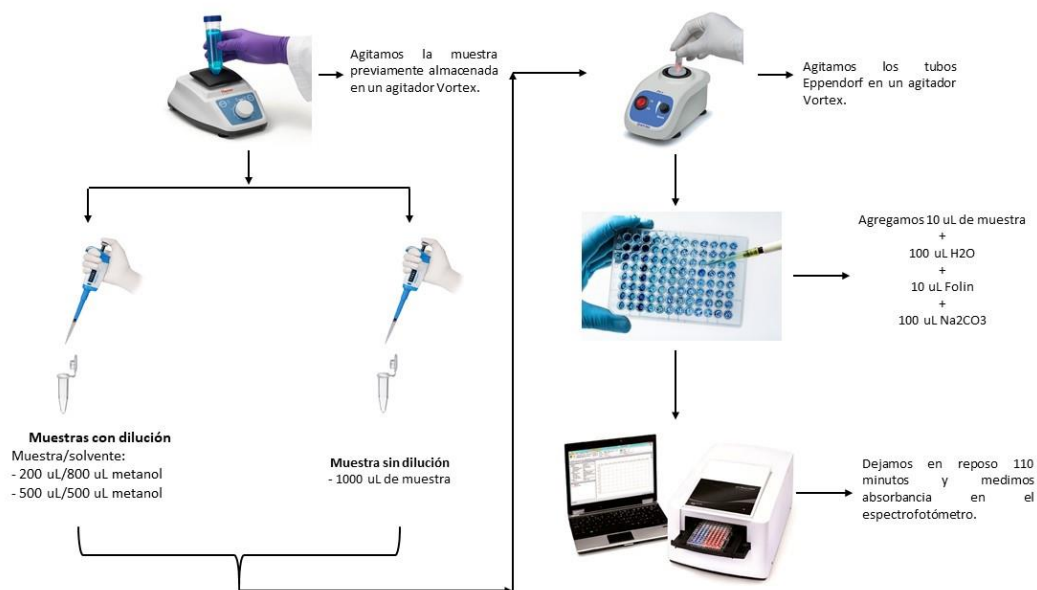
2.4.1 Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Las determinaciones del contenido total de fenoles (CTF) se realizaron por triplicado en cada uno de los extractos obtenidos. La determinación se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Ramić et al. (2015), este reactivo es un agente oxidante formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico en medio básico, lo que sufre una reducción al oxidar los compuestos fenólicos, originando un complejo de color

azul cuya absorbancia es dependiente de la concentración de los ácidos fenólicos presentes en la muestra. Se utilizó ácido gálico como estándar y finalmente, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. A continuación, en la Figura 9, se detalla el procedimiento.

Figura 9

Esquema para el análisis de compuestos fenólicos totales presentes en el café



Nota: Después de agregar la muestra, agua y el reactivo de Folin se espera 10 min y se añade Na₂CO₃ y se deja incubar en oscuridad durante 2 h. Para cada muestra se repite el mismo proceso y los extractos obtenidos se diluyen adecuadamente para poder realizar la lectura.

Para el cálculo de la concentración de compuestos fenólicos, se parte desde la ecuación de la curva de estándar de ácido gálico para obtener la concentración en µg/mL. Posteriormente haciendo una regresión se obtiene la concentración de fenoles totales, y los resultados se expresaron en mg EAG/100g de muestra en base seca (En el Apéndice 2 de detalla el procedimiento).

2.4.2 Preparación del estándar de ácido gálico

La preparación de la solución madre de ácido gálico se detalla en la Tabla 4.

Ecuación 1

Concentración de solución stock de ácido gálico

$$C_{std} = \frac{\text{pureza} * m}{V}$$

Tabla 4

Datos de la solución madre de ácido gálico

Estándar	Pureza (%)	Volumen (mL)	Concentración de solución stock (µg/mL)	w (g)
Ácido gálico	97.8%	2.5	1000	0.0025

A partir de la solución madre cuya concentración inicial es de 1000 µg/mL (ppm) de ácido gálico, se prepararon soluciones de concentraciones definidas en el rango de 5 a 300 ppm.

Ecuación 2

Concentración de la solución de trabajo

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Tabla 5

Datos de la preparación de los estándares de ácido gálico

C (µg/mL)	Vsm (µL)	V MeOH (µL)	Aforo (µL)
5	5	995	1000
25	25	995	1000
50	25	475	500
100	50	450	500
150	75	425	500
200	100	400	500
250	125	375	500
300	150	350	500

Posteriormente, 10 µL de estándar de ácido gálico de concentración conocida se hicieron reaccionar con 100 µL de agua destilada y 10 µL de Folin-Ciocalteu, se agitó durante 10 min y se agregó 100 µL Na₂CO₃ y se esperó durante 2 h en oscuridad. Luego, se midió la absorbancia a 760 nm y se obtuvo la gráfica de concentración de ácido gálico.

2.5 Análisis estadístico

Para el análisis de la variable de respuesta (contenido total de fenoles) se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM), haciendo uso del software estadístico

MINITAB 16 para generar el diseño experimental, análisis estadísticos de datos y el modelo de regresión.

Capítulo tres

3 Resultados y discusión

Con el objetivo de establecer las mejores condiciones de extracción, mediante la metodología de superficie de respuesta y utilizando el modelo de Box-Behnken se evaluaron tres variables de extracción. En la Tabla 6, se presenta el efecto de la temperatura (25, 47.5 y 70°C), el tiempo de extracción (5, 102.5 y 200 min) y la concentración de EtOH (0, 50 y 100%; v/v) sobre la concentración de fenoles totales presentes en el grano de café tostado y molido.

Tabla 6

Contenido total de fenoles en función de la temperatura, tiempo y porcentaje de EtOH

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	EtOH (%)	TPC (mg EAG/100 g)
1	70	102.5	0	1955
2	47.5	200	0	2728
3	47.5	102.5	50	3391
4	25	5	50	1539
5	47.5	200	100	946
6	47.5	5	100	522
7	25	102.5	100	478
8	70	102.5	100	1060
9	70	5	50	3276
10	25	102.5	0	2774
11	47.5	5	0	2808
12	47.5	102.5	50	3448
13	47.5	102.5	50	3578
14	70	200	50	3563
15	25	200	50	3085

3.1 Influencia de los parámetros de extracción

3.1.1 Concentración de solvente

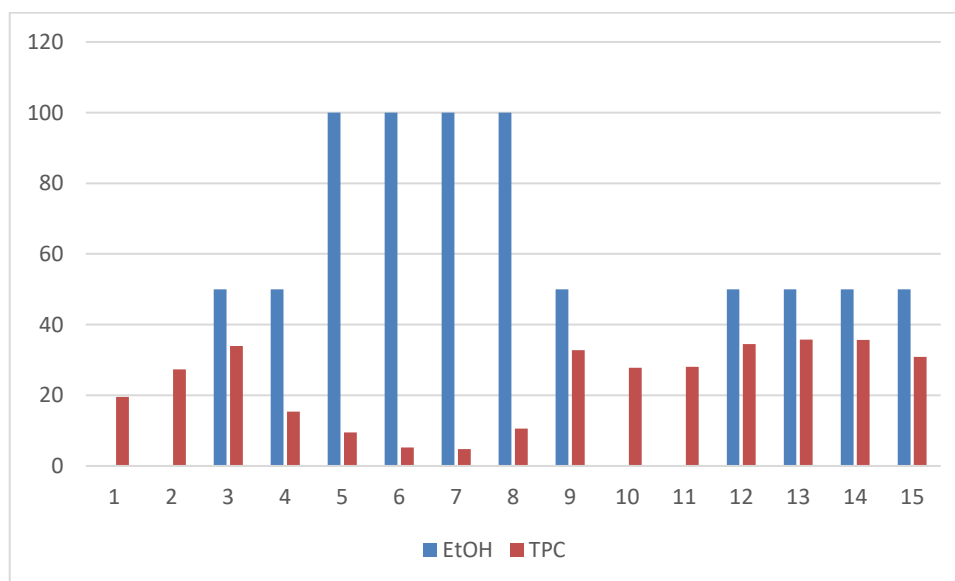
Şahin y Şamlı (2013), Dranca y Oroian (2016), Prasad et al. (2011) mencionan que el tipo de solvente utilizado y las condiciones de extracción repercuten en la eficiencia y calidad del extracto, es por ello que es fundamental la elección del solvente para asegurar una extracción exitosa.

En la presente investigación se utilizó solventes como EtOH y H₂O que son solventes próticos polares, debido a que son donantes de puentes de hidrógeno y facilitan la transferencia en extracciones sólido-líquido (Reichardt & Welton, 2011).

En la Figura 10, se aprecia el contenido de fenoles totales con respecto a la concentración de EtOH mediante la técnica de ultrasonido, siendo el 50% de EtOH el que representa mayores cantidades de compuestos fenólicos, obteniendo 3578 mg EAG/100g como la concentración más alta, mientras que en concentración de 0% de EtOH no se obtiene buenos resultados atribuyendo a que el agua es el solvente que presenta mayor viscosidad y por lo tanto afecta la transferencia de masa desde el sólido al líquido, según Mokrani y Madani (2016) la concentración de EtOH 0% proporciona extractos con un contenido importante de impurezas que interfieren en la identificación fenólica, y EtOH al 100% presenta los niveles más bajos de TPC.

Figura 10

Contenido total de fenoles con respecto a la concentración de EtOH



Nota: La variable concentración de EtOH está en porcentaje y el contenido total de fenoles (TPC) en mg EAG/g. Tobón Arroyave (2015)

en su trabajo de investigación en el que obtuvo compuestos

fenólicos a partir de la pulpa de café manifestó que la mezcla de EtOH:H₂O (50:50, v/v) presentó un valor de 5168 mg EAG/100g, concluyendo que es el mejor solvente para la

extracción de compuestos fenólicos, debido a que el H₂O incrementa la constante dieléctrica de la mezcla, lo que conlleva a aumentar la polaridad del solvente mejorando su capacidad extractiva y Marcelo-Díaz et al. (2017) en su investigación reportaron que el TPC estuvo dentro del intervalo de 179.70 a 1429.09 mg EAG/100g y el valor máximo se obtuvo en concentración de EtOH al 35%, a ello se suma Şahin y Şamlı (2013) que reportaron una mayor concentración de TPC de la hoja de olivo en porcentaje de EtOH 50%, comparado con el resultados encontrados utilizando EtOH 100% y EtOH 0%, que presentaron resultados muy inferiores.

3.1.2 Tiempo y temperatura de extracción

Vázquez-Cárdenas et al. (2015) y Flores-Martínez, León-Campos, Estarrón-Espinosa, y Orozco-Ávila (2016) manifestaron que los parámetros de tiempo y temperatura se perfilan como los más influyentes en el rendimiento de la extracción, Şahin y Şamlı (2013) evaluaron la variable de tiempo de extracción en el rango de 20 a 60 min demostrando que la cantidad de compuestos fenólicos incrementa con respecto al tiempo y su prolongación podría aumentar el rendimiento. Además, Al-Dhabi, Ponmurugan, y Jeganathan (2017) y Esclapez, García-Pérez, Mulet, y Cárcel (2011) mencionaron que el incremento de la temperatura contribuye a la activación de las enzimas que participan en la descomposición de los compuestos complejos de la matriz vegetal lo que provoca una mejora en la tasa de transferencia de masa resultando un aumento en la eficiencia de extracción.

En nuestra investigación, la extracción se realizó a 5°C, 47.5°C y 70°C y el mejor resultado que se obtuvo fue a una temperatura de 70°C y concentración de EtOH al 50%. Dranca y Oroian (2016) en su investigación obtuvieron una mayor cantidad de TPC a una temperatura 70°C. Al-Dhabi et al. (2017) expresan que la temperatura es un factor crítico dentro de la extracción, así como a temperaturas altas puede aumentar el rendimiento a su vez promueve la oxidación de los compuestos.

3.2 Linealidad del método

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se procedió mediante el método de Folin-Ciocalteu, se preparó las muestras tal como se indicó en el Capítulo dos y se determinó

la concentración de los compuestos fenólicos presentes en cada una de las muestras, posteriormente, se desarrolló la curva de calibración de estándar de ácido gálico en función de la concentración y absorbancia de las soluciones. En la Tabla 7 se presenta las concentraciones y el promedio de las tres lecturas de absorbancia que se realizó para cada ensayo.

Tabla 7

Concentraciones y absorbancias de las soluciones del estándar de ácido gálico

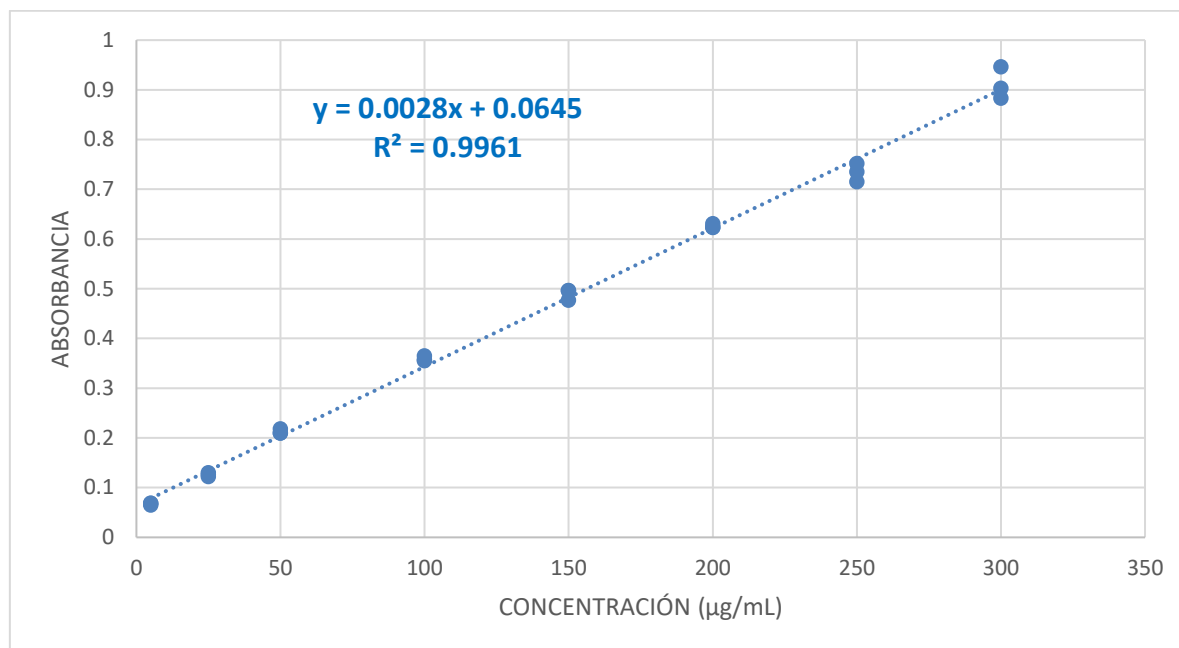
Concentración (µg/mL)	Absorbancia
5	0.067
25	0.126
50	0.213
100	0.359
150	0.490
200	0.626
250	0.734
300	0.911

Según Herrera, Ticona, Udaeta, Chuqui, y Giménez (2008) la linealidad de un método analítico se expresa como la obtención de resultados que son directamente proporcionales a la concentración de un analito en una muestra teniendo en cuenta el coeficiente de correlación. Según Van Loco, Elskens, Croux, y Beernaert (2002) para realizar un análisis entre absorbancia y concentración de un analito se debe comprobar si el modelo se ajusta a un coeficiente de correlación $R^2 \geq 0.995$.

En la Figura 11 se presenta la ecuación de la curva de calibración del ácido gálico y el coeficiente de correlación (R^2) 0.996, concluyendo que el método es válido para el realizar un análisis de absorbancia y concentración de las muestras de café.

Figura 11

Curva del estándar de ácido gálico.



3.3 Optimización mediante metodología de superficie de respuesta.

Para conocer las mejores condiciones de extracción y los factores que tienen mayor efecto en el proceso y las interacciones entre los mismos, se utilizó el diseño experimental de Box-Behnken, usando el software MINITAB 16, que permite optimizar las condiciones de extracción, con una cantidad menor de experimentos, comparado con otros métodos estadísticos como el diseño Compuesto Central (CCD) (Rakić, Kasagić-Vujanović, Jovanović, Jančić-Stojanović, & Ivanović, 2014; Zolgharnein, Shahmoradi, & Ghasemi, 2013).

En la presente investigación se estudiaron tres variables independientes (temperatura, tiempo y concentración de EtOH), y la variable dependiente o variable de respuesta, fue la concentración de compuestos fenólicos totales (TPC). Cada variable independiente toma tres valores los cuales son dos puntos axiales y un punto central o un valor mínimo, intermedio y un máximo (-1, 0, +1) tal como se muestra en la Tabla 3. Se realizaron un total de 15 experimentos y los valores para cada experimento mediante el diseño experimental de Box-Behnken se presentan en el Anexo 1.

3.3.1 Análisis estadístico

En la Tabla 8 se presenta el p -valor de cada una de las variables e interacciones presentadas en la extracción de TPC, según Mussatto, Machado, et al. (2011) las variables con más impacto dentro de la extracción son las que el p -valor es inferior a 0.05 ($p < 0.05$). Siendo, el porcentaje de EtOH y su interacción cuadrática EtOH*EtOH las que presentaron mayor efecto.

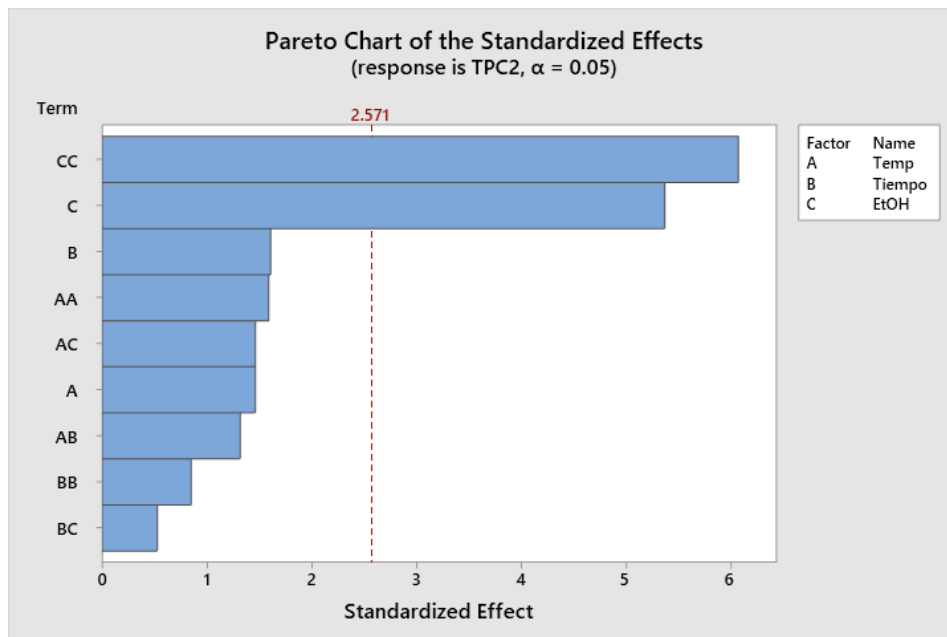
Tabla 8

P-valor para cada variable e interacción en la cuantificación de compuestos fenólicos

Variabes e interacciones	P-Valor
Temperatura	0.203
Tiempo	0.168
<i>EtOH</i>	<i>0.003</i>
Temperatura*Temperatura	0.173
Tiempo*Tiempo	0.435
<i>EtOH*EtOH</i>	<i>0.002</i>
Temperatura*Tiempo	0.245
Temperatura*EtOH	0.203
Tiempo*EtOH	0.621

Nota: En cursiva y negrita se marcan las variables e interacciones que presentaron efecto en el TPC.

En la Figura 12, se observa que las variables que superan el valor de 2.571 se consideran de muy alta influencia sobre la variable de respuesta. Teniendo en cuenta esto, se observa que la variable de concentración de solvente EtOH es la que tiene mayor interferencia, y con menos grado de participación encontramos su interacción cuadrática EtOH*EtOH.

Figura 12*Diagrama de Pareto*

Nota: Se presenta el diagrama de Pareto donde las variables que sobrepasan la línea vertical tienen efecto en la variable de respuesta, donde A pertenece a temperatura, B es tiempo de extracción y C es la concentración de EtOH.

Tobón Arroyave (2015) menciona que las variables y las interacciones que se encuentran sobre la línea tienen efecto sobre la variable de respuesta (TPC), a medida que se incrementa el valor de las variables se obtiene un incremento en la extracción de compuestos.

Según Prasad et al. (2011) en su investigación mencionan que la concentración de solvente es la principal variable que tiene efecto sobre la variable de respuesta, en nuestro caso es la variable que mayor efecto tiene juntamente con su interacción cuadrática. Saikia, Mahnot, y Mahanta (2015) en su investigación de extracción de fenoles de orujo demostraron que la concentración de EtOH es la que presenta mayor efecto en la extracción y a su vez la temperatura no presentó ningún efecto en la extracción. En nuestra investigación la temperatura es la variable que menos presenta interacción en la extracción de TPC.

En la Figura 12 encontramos la variable del tiempo como una de las variables que tienen menos efecto en la extracción, Čujić et al. (2016) presentaron resultados similares en

el que demostraron que el tiempo de extracción de TPC a partir de frutos secos de chokeberry es el factor que presenta menos interacción con la variable de respuesta.

3.3.2 Ecuación de regresión

Los datos experimentales de TPC extraídos se ajustaron a una ecuación de regresión de segundo grado en la que se observa la respuesta del sistema en función de las variables e interacciones que intervienen en el mismo.

Ecuación 3

Ecuación de regresión cuadrática para el contenido total de fenoles

$$\begin{aligned} TPC = & 2.4 + 0.843Temp + 0.1287Tiempo + 0.248EtOH - 0.00781Temp^2 - 0.000222Tiempo^2 \\ & - 0.006041EtOH^2 - 0.00143Temp * Tiempo + 0.00311Temp * EtOH \\ & + 0.000258Tiempo * EtOH \end{aligned}$$

3.3.3 Optimización del proceso

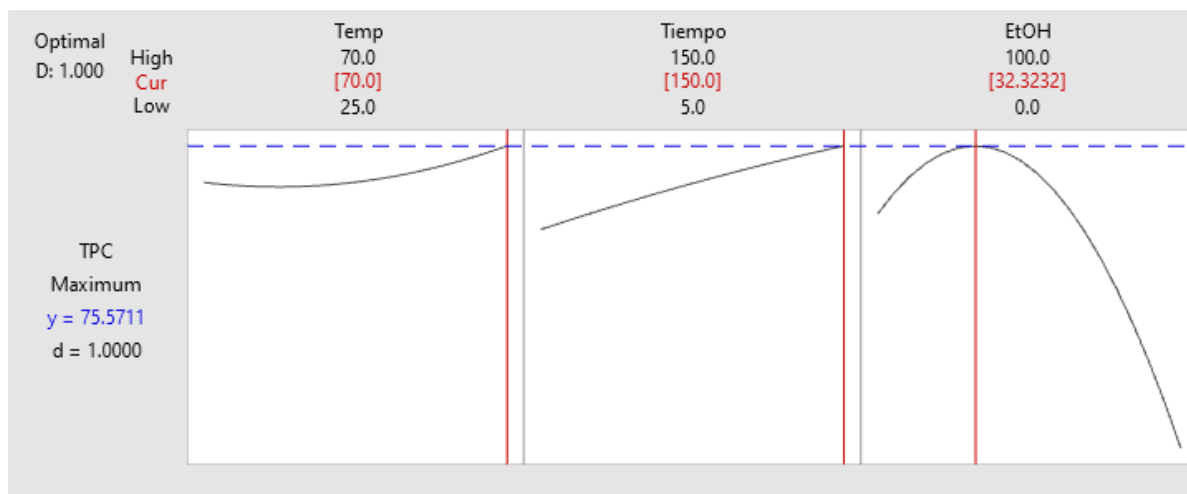
A continuación, se presentan los ensayos que se realizaron hasta llegar a obtener un valor óptimo en las variables de estudio.

3.3.3.1 Primer ensayo

En la Figura 13, se presenta la gráfica de efectos principales, en la que se puede apreciar la gran influencia que tiene el porcentaje de EtOH en la extracción, y así mismo se visualiza la poca influencia de la temperatura y el tiempo de extracción. La pendiente de la variable de porcentaje de EtOH en su totalidad es decreciente, en la que se logra alcanzar el máximo a 32.3 %, la única variable optimizada. La temperatura tiene un efecto positivo, pero bastante insignificante por lo que no existe un valor óptimo, es por ello se toma al máximo valor estudiado en el ensayo que es a 70°C, al igual que el tiempo no tiene un valor óptimo, es poco notorio su efecto sobre la variable de respuesta, observando que la pendiente va aumentando progresivamente, por lo que se toma el máximo valor estudiado en el ensayo que es de 150 min.

Figura 13

Influencia de la temperatura, tiempo de extracción y concentración de EtOH



3.3.3.2 Segundo ensayo

Como se pudo apreciar en el primer ensayo no se encontró una respuesta óptima para el sistema, por lo que se repitió el proceso aumentando el tiempo de 150 a 200 minutos, en el que se pudo encontrar las mejores condiciones de extracción para el sistema. Como se puede observar en la Tabla 9, se exponen las condiciones óptimas de extracción de los compuestos fenólicos.

Tabla 9

Variables óptimas de extracción

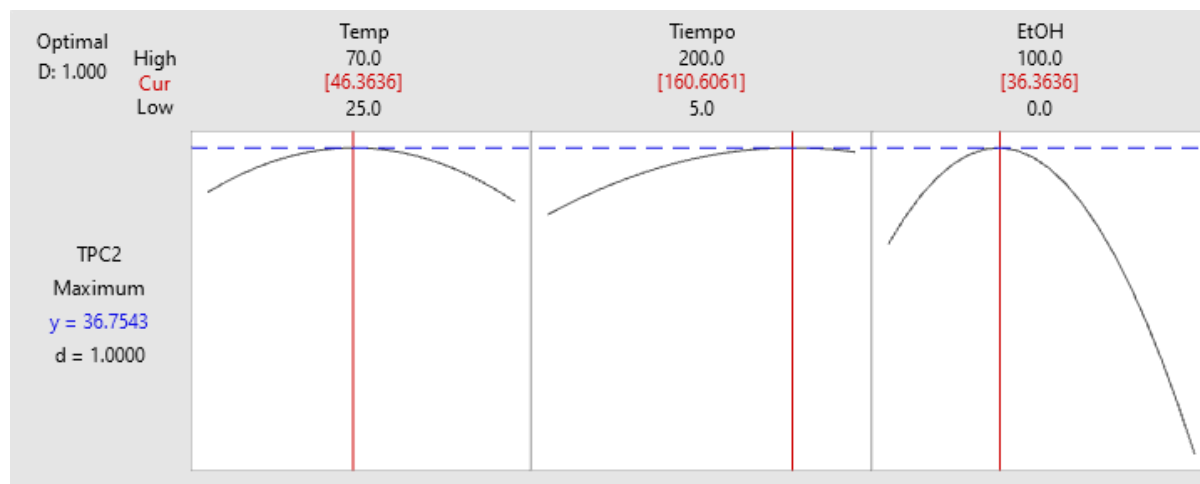
Variable	Valor óptimo
Temperatura	46.4 °C
Tiempo	160.6 min
EtOH	36.4 %

En las condiciones de extracción aplicadas se obtuvo que el contenido total de fenoles se encuentra dentro del intervalo de 478 y 3578 mg EAG/100g, así mismo las variables óptimas de extracción: tiempo de extracción de 160.6 min, temperatura de extracción de 46.4 °C y la concentración de EtOH de 36.4 %, con estas condiciones se obtiene una cantidad máxima de 3674 mg EAG/100g de compuestos fenólicos.

La Figura 14 describe los efectos principales que presenta cada variable estudiada, se puede apreciar que el porcentaje de EtOH es la que presenta mayor influencia en la variable de respuesta (TPC) tal y como se puede visualizar en el diagrama de Pareto.

Figura 14

Influencia de la temperatura, tiempo de extracción y concentración de EtOH

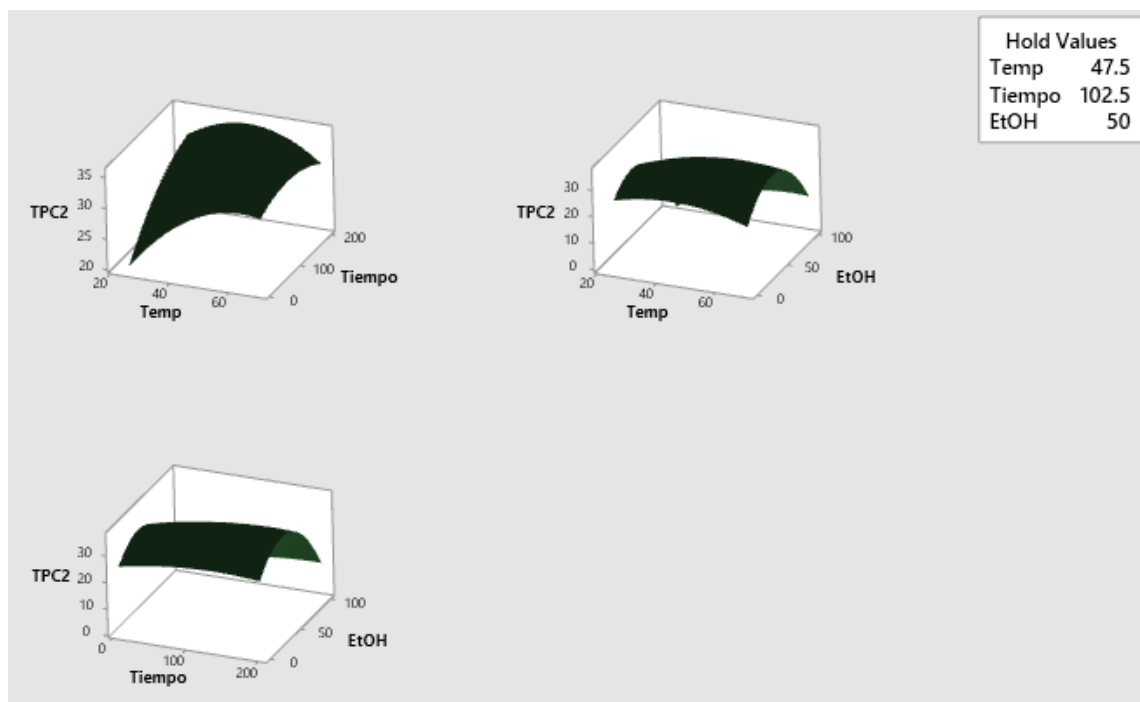


La variable de porcentaje de EtOH presenta una pendiente decreciente, en la que alcanza su máximo en 36.4%. Así mismo, la temperatura presenta un efecto positivo sobre la variable de respuesta, y se observa que el valor óptimo es de 46.4°C, el tiempo presenta un efecto positivo sobre la variable de respuesta, y se observa que la pendiente va creciendo paulatinamente hasta un valor máximo de 160.6 min.

Como se puede observar en la Figura 15 a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo incrementa el contenido total de fenoles hasta llegar a un valor máximo, Durling et al. (2007) en su investigación de extracción de compuestos fenólicos de salvia seca, mencionan que al incrementar la temperatura existe una mayor extracción de compuestos fenólicos, así mismo, Thoo, Ho, Liang, Ho, y Tan (2010) realizaron un estudio sobre el efecto de la concentración de EtOH (0 - 100 %, v/v), tiempo de extracción (20 - 120 min) y temperatura (25 – 65°C) en la extracción de compuestos fenólicos de mengkudu obteniendo una temperatura óptima de 65°C, tiempo de 80 min y 40% de EtOH concluyendo que el aumento de la temperatura mejora los coeficientes de difusión y la solubilidad de los compuestos fenólicos. Además, Benmeziane, Djamaï, Cadot, y Seridi (2014), Ruenroengklin et al. (2008) y Mokrani y Madani (2016) también mencionan que el incremento de la temperatura mejora la eficiencia de extracción de TPC debido a que incrementa la tasa de transferencia de masa desde el sólido al solvente.

Figura 15

Influencia de la temperatura, tiempo y % EtOH sobre TPC



El tiempo es un variable fundamental en la extracción ya que a gran escala se ahorraría energía y costos. En el primer ensayo se evaluó un rango de 5 a 150 min, pero no se encontró un valor óptimo. Por lo tanto, se modificó el intervalo a un rango de 5 a 200 min, encontrándose un tiempo óptimo de 160.6 min. Un valor similar obtuvieron Mokrani y Madani (2016) en el que evaluaron el efecto del tiempo entre 30-450 min utilizando un baño con agitación y en el que se reportó que a un tiempo de 180 min se obtiene la mayor cantidad de compuestos fenólicos del fruto de melocotón. Según Benmeziane et al. (2014) en su investigación de extracción de TPC de fresa argelina, evaluaron el tiempo entre un intervalo de 30-120 min, y encontraron un tiempo óptimo de 30 min.

La concentración de EtOH es muy importante en la extracción de compuestos fenólicos, como se puede apreciar en el diagrama de Pareto es la variable que presenta mayor interacción con la variable de respuesta. La mayor cantidad de TPC optimizando esta variable se encuentra en 36.4 %, un resultado similar mostro Thoo et al. (2010) en el que el valor óptimo de concentración de EtOH se encontró en 40%. Así mismo, Saikia et al. (2015) expresa que la concentración de EtOH es la variable que tiene un mayor efecto en la variable

de respuesta, y su óptimo fue de 65% de EtOH en compuestos fenólicos extraídos del orujo. Mokrani y Madani (2016) expresan que el uso de mezclas de disolventes orgánicos con agua ayuda a la a la extracción de compuestos, debido a que crea un medio polar potenciando la extracción.

En la presente investigación se pudo determinar que el café es una fuente importante de compuestos fenólicos e importantes en la dieta humana, Almeida y de Toledo Benassi (2011) obtuvieron una cantidad entre 1.58 – 4.11 g EAG/100g de compuestos fenólicos, demostrando que el café es una fuente importante en estos compuestos, ya que entre el 69 y 73% de la capacidad antioxidante que presenta el café es principalmente debido a los ácidos clorogénicos que son los principales componentes de la fracción fenólica ampliamente utilizados en el área de salud (Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, 2011).

Conclusiones

Se establecieron las condiciones óptimas de las variables independientes que maximizan el contenido de fenoles totales en el café, siendo: tiempo de extracción de 160.6 min, porcentaje de EtOH 36.4 % y temperatura de 46.4 °C obteniendo un valor máximo de 3675 mg EAG/100 g.

Los resultados de esta investigación indican que el café es una fuente potencial de compuestos fenólicos y muy importantes en la dieta humana que pueden extraerse mediante técnicas sencillas como lo es la extracción asistida por ultrasonido.

Se demostró que la mezcla de etanol-agua es un disolvente adecuado para la extracción de compuestos fenólicos, debido a que el agua aumenta la constante dieléctrica, lo que permite aumentar su polaridad mejorando la capacidad extractiva del solvente.

La temperatura es una variable fundamental en la extracción, ya que se determinó que al aumentar la temperatura paulatinamente favorece las interacciones moleculares y aumenta la extracción de compuestos fenólicos.

El tiempo es una variable fundamental en la extracción de compuestos fenólicos, ya que se demostró que a medida que se aumenta el tiempo el contenido total de fenoles es mayor, debido a que en el primer ensayo se trabajó con un tiempo de 150 min y no se encontró en valor óptimo, por lo que se repitió el proceso con un tiempo de 200 min y se consiguió encontrar un tiempo óptimo de 160,6 min.

Recomendaciones

Estudiar la influencia de otras variables que son muy importantes en el proceso de extracción como son: relación solvente/sólido, frecuencia ultrasónica, tamaño de partícula, pH y ciclo (tiempo que se aplican las ondas ultrasónicas por segundo).

Evaluar distintos tipos de solventes para verificar en cual existe una mayor recuperación de compuestos fenólicos.

Evaluar que método es el que tiene mayor eficiencia para la extracción de compuestos fenólicos entre ellos: extracción asistida por microondas, extracción supercrítica y la que se estudió en esta investigación la extracción asistida por ultrasonido.

Referencias

- Abrahão, S. A., Pereira, R. G. F. A., Duarte, S. M. d. S., Lima, A. R., Alvarenga, D. J., & Ferreira, E. B. (2010). Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, *34*(2), 414-420.
- Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 206-213.
- Almeida, M. B., & de Toledo Benassi, M. (2011). Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais Antioxidant activity and estimation of melanoidin content in commercial roasted coffee. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, *32*(suplemento 1), 1893-1900.
- Alves, B. H. P., do Nascimento, E. A., de Aquino, F. J. T., Chang, R., & de Moraes, S. A. L. (2007). Composição química de cafés torrados do Cerrado e do Sul de Minas Gerais. *Ciência Engenharia* *16*(1/2), 9-15.
- Andrade, K. S., Gonçalves, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M., Martínez, J., & Ferreira, S. R. (2012). Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, *88*, 544-552.
- Arauzo, P., Lucian, M., Du, L., Olszewski, M., Fiori, L., & Kruse, A. (2020). Improving the recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds by using hydrothermal delignification coupled with ultrasound assisted extraction. *Biomass Bioenergy* *139*, 105616.
- Barrezueta-Unda, C. S., Blacio, W. M., & Abad, C. C. Q. (2018). Análisis del cacao y café ecuatoriano desde su cadena de valor en el periodo 2010-2015. *Revista Científica Agroecosistemas*, *6*(3), 6-17.

- Benmeziane, F., Djamai, R., Cadot, Y., & Seridi, R. (2014). Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes,(*Vitis Vinifera*). *International Food Research Journal*, 21(3).
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Boudet, A.-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., & Velić, D. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food Nutrition Sciences* 61(3), 195-199.
- Chaves-Ulate, E., & Esquivel-Rodríguez, P. (2019). Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 299-311.
- Clarke, R. J. (2012). *Coffee: Volume 1: Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Crippa, A., Discacciati, A., Larsson, S. C., Wolk, A., & Orsini, N. (2014). Coffee consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a dose-response meta-analysis. *American journal of epidemiology*, 180(8), 763-775.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194, 135-142.
- D'Elia, L., La Fata, E., Galletti, F., Scalfi, L., & Strazzullo, P. (2019). Coffee consumption and risk of hypertension: a dose–response meta-analysis of prospective studies. *European journal of nutrition*, 58(1), 271-280.
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076-1080.

- Dahmoune, F., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Moussi, K., Bouaoudia-Madi, N., . . . Boughani, L. (2015). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P. lentiscus* L. leaves: Comparative study of artificial neural network (ANN) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Industrial Crops Products* 77, 251-261.
- de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Júnior, A. I. M., do Prado, F. G., Pagnoncelli, M. G. B., Karp, S. G., & Soccol, C. R. (2020). Chemical composition and health properties of coffee and coffee by-products. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 91, pp. 65-96): Elsevier.
- Delgado, A. M., Issaoui, M., & Chammem, N. (2019). Analysis of main and healthy phenolic compounds in foods. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1356-1364.
- Destandau, E., Michel, T., & Elfakir, C. (2013). Microwave-assisted extraction. *Natural product extraction: principles applications* (21), 113.
- Ding, M., Bhupathiraju, S. N., Satija, A., van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2014). Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: a systematic review and a dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation*, 129(6), 643-659.
- Dranca, F., & Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 637-646.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., & Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food chemistry*, 101(4), 1417-1424.
- Escarpa, A., & Gonzalez, M. (2001). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(2), 57-139.
- Esclapez, M., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120.

- Esquivel, P., & Jimenez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488-495.
- FAO. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Farah, A. (2019). *Coffee: Production, quality and chemistry*: Royal society of chemistry.
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian journal of plant physiology*, 18(1), 23-36.
- Ferreira, T., Shuler, J., Guimarães, R., & Farah, A. (2019). Introduction to coffee plant and genetics.
- Ferruzzi, M. G. (2010). The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology behavior* 100(1), 33-41.
- Flament, I. (2001). *Coffee flavor chemistry*: John Wiley & Sons.
- Flores-Martínez, H., León-Campos, C., Estarrón-Espinosa, M., & Orozco-Ávila, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista mexicana de ingeniería química*, 15(3), 773-785.
- Germer, T. A., Zwinkels, J. C., & Tsai, B. K. (2014). *Spectrophotometry: Accurate measurement of optical properties of materials*: Elsevier.
- Gotteland, M., & De Pablo, S. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista chilena de nutrición*, 34(2), 105-115.
- Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., & Giovannucci, E. L. (2017). Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. *Annual review of nutrition*, 37, 131-156.
- Guntero, V. A., Longo, M. B., Ciparicci, S., Martini, R. E., & Andreatta, A. E. (2015). *Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola*.
- Herrera, V., Ticona, J. C., Udaeta, E., Chuqui, R., & Giménez, A. (2008). Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. *Biofarbo*, 16, 47.

- IARC. (2016). The Agency for Research on Cancer. Retrieved from <https://www.iarc.who.int/featured-news/media-centre-iarc-news-mono116/>
- Inoue, M., & Tsugane, S. (2019). Coffee drinking and reduced risk of liver cancer: Update on epidemiological findings and potential mechanisms. *Current nutrition reports*, 8(3), 182-186.
- Jácome, A. R., & Garrido, A. (2017). A Real Option Analysis applied to the production of Arabica and Robusta Coffee in Ecuador. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), e0104.
- Je, Y., & Giovannucci, E. (2012). Coffee consumption and risk of endometrial cancer: Findings from a large up-to-date meta-analysis. *International journal of cancer*, 131(7), 1700-1710.
- Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- Król, K., Gantner, M., Tatarak, A., & Hallmann, E. (2020). The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *European Food Research Technology* 246(1), 33-39.
- Lafranconi, A., Micek, A., De Paoli, P., Bimonte, S., Rossi, P., Quagliariello, V., & Berretta, M. (2018). Coffee intake decreases risk of postmenopausal breast cancer: A dose-response meta-analysis on prospective cohort studies. *Nutrients*, 10(2), 112.
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 132(5), 1740-1745.
- Li, X. J., Ren, Z. J., Qin, J. W., Zhao, J. H., Tang, J. H., Ji, M. H., & Wu, J. Z. (2013). Coffee consumption and risk of breast cancer: an up-to-date meta-analysis. *PLoS One*, 8(1), e52681.
- Lim, Y., Park, Y., Choi, S. K., Ahn, S., & Ohn, J. H. (2019). The effect of coffee consumption on the prevalence of diabetes mellitus: The 2012–2016 Korea national health and nutrition examination survey. *Nutrients*, 11(10), 2377.

- Liu, J., Lin, S., Wang, Z., Wang, C., Wang, E., Zhang, Y., & Liu, J. (2011). Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability. *Food bioproducts processing* 89(4), 333-339.
- Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., . . . Straif, K. (2016). Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages. *Lancet Oncology*, 17(7), 877.
- Marcelo-Díaz, R., Luján-Gonzales, V., Ramirez, L., Olano, M., Vargas, A., Rojas, M., & Linares, G. (2017). Fenólicos a partir de residuos de café: Optimización del proceso de extracción. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(4), 405-410.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.
- Messina, G., Zannella, C., Monda, V., Dato, A., Liccardo, D., De Blasio, S., . . . Cibelli, G. (2015). The beneficial effects of coffee in human nutrition. *Biology Medicine* 7(4), 1.
- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation purification Technology* 162, 68-76.
- Molina, R., & Rodríguez, C. (2012). Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *Revista venezolana de endocrinología y metabolismo*, 10, 7-12.
- Morris, J. (2018). *Coffee: A global history*: Reaktion Books.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1149-1154.

- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation Purification Technology* 83, 173-179.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Technology* 4(5), 661-672.
- Neo, Y. P., Ariffin, A., Tan, C. P., & Tan, Y. A. (2008). Determination of oil palm fruit phenolic compounds and their antioxidant activities using spectrophotometric methods. *International journal of food science technology* 43(10), 1832-1837.
- OMS. (2017). Enfermedades Cardiovasculares. Retrieved from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486-490.
- Passos, M. L., & Saraiva, M. L. M. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896-904.
- Patay, É. B., Bencsik, T., & Papp, N. (2016). Phytochemical overview and medicinal importance of Coffea species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(12), 1127-1135.
- Pérez-Hernández, L. M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. Á., & Meza, N. G. (2013). Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de cafe verde y procesado de las especies Coffea arabica y Coffea canephora. *Biotechnia*, 15(1), 51-56.
- Pimentel, G. D., Zemdegs, J. C., Theodoro, J. A., & Mota, J. F. (2009). Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk? *Diabetology metabolic syndrome* 1(1), 1-8.

- Ponce Vaca, L. A., Orellana Suárez, K. D., Acuña Velásquez, I. R., Alfonso Alemán, J. L., & Fuentes Figueroa, T. (2018). Situación de la caficultura ecuatoriana: perspectivas. *Revista Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina*, 6(1), 307-325.
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., & Ismail, A. J. (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food chemistry*, 128(4), 1121-1127.
- Puerta, G. (2013). *Composición química de una taza de café* (0120-0178). Retrieved from
- Rakić, T., Kasagić-Vujanović, I., Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B., & Ivanović, D. (2014). Comparison of full factorial design, central composite design, and box-behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazole and its impurities. *Analytical Letters*, 47(8), 1334-1347.
- Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food chemistry*, 115(1), 79-85.
- Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejic, A., & Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360-368.
- Ranheim, T., & Halvorsen, B. (2005). Coffee consumption and human health—beneficial or detrimental?—Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Molecular nutrition food research* 49(3), 274-284.
- Reichardt, C., & Welton, T. (2011). *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- Rodríguez, R. (2018). Mantenimiento de laboratorio: Espectrofotómetro. Retrieved from <http://rekner.com/mantenimiento-de-laboratorio-espectrofotometro-0-2/>

- Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J., & Jiang, Y. (2008). Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7), 1333-1341.
- Şahin, S., & Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602.
- Saikia, S., Mahnot, N. K., & Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food chemistry*, 171, 144-152.
- Soler Cantero, A. (2009). *Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional*: Universitat de Lleida.
- Somporn, C., Kamtuo, A., Theerakulpisut, P., & Siriamornpun, S. (2012). Effect of shading on yield, sugar content, phenolic acids and antioxidant property of coffee beans (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) harvested from north-eastern Thailand. *Journal of the Science of Food Agriculture* 92(9), 1956-1963.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. 30(18), 3268-3295.
- 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.
- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., & Tan, C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food chemistry*, 120(1), 290-295.
- Tobón Arroyave, N. d. I. C. (2015). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo.

- Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food function* 6(8), 2424-2439.
- Van Dam, R. M., & Feskens, E. J. (2002). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *The lancet*, 360(9344), 1477-1478.
- van Dam, R. M., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2020). Coffee, caffeine, and health. *New England Journal of Medicine*, 383(4), 369-378.
- Van Dam, R. M., Willett, W. C., Manson, J. E., & Hu, F. B. (2006). Coffee, caffeine, and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study in younger and middle-aged US women. *Diabetes care*, 29(2), 398-403.
- Van Loco, J., Elskens, M., Croux, C., & Beernaert, H. (2002). Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation Quality Assurance* 7(7), 281-285.
- Vázquez-Cárdenas, C., Valiente-Banuet, J., Caballero-Mata, P., Mújica-Paz, H., Rodríguez-Rodríguez, J., & Welti-Chanes, J. (2015). Kinetic and statistical criteria for the selection of conditions of extraction of volatile compounds of piquin pepper (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(2), 231-241.
- Vignoli, J., Bassoli, D., & Benassi, M. d. 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.
- Votavová, L., Voldřich, M., Ševčík, R., Čížková, H., Mlejnecka, J., Stolař, M., & Fleišman, T. (2009). Changes of antioxidant capacity of robusta coffee during roasting. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(Special Issue 1), Changes of Antioxidant Capacity of Robusta Coffee during Roasting. *Czech J. Food Sci.*, 27: S49.
- Wang, A., Wang, S., Zhu, C., Huang, H., Wu, L., Wan, X., . . . He, L. (2016). Coffee and cancer risk: A meta-analysis of prospective observational studies. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.

- Weinberg, B. A., & Bealer, B. K. (2004). *The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug*: Routledge.
- Xu, D.-P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., & Li, H.-B. (2017). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food chemistry*, 217, 552-559.
- Yang, Z., & Zhai, W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative food science emerging technologies* 11(3), 470-476.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., . . . Varigos, J. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The lancet*, 364(9438), 937-952.
- Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Angeloni, S., Mustafa, A. M., Vittori, S., . . . Caprioli, G. (2020). Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods*, 9(6), 713.
- Zolgharnein, J., Shahmoradi, A., & Ghasemi, J. B. (2013). Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics*, 27(1-2), 12-20.

Apéndice

Apéndice 1:

Diseño experimental.

Orden de Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Etanol (%)
1	70	102.5	0
2	47.5	200	0
3	47.5	102.5	50
4	25	5	50
5	47.5	200	100
6	47.5	5	100
7	25	102.5	100
8	70	102.5	100
9	70	5	50
10	25	102.5	0
11	47.5	5	0
12	47.5	102.5	50
13	47.5	102.5	50
14	70	200	50
15	25	200	50

Apéndice 2:

Cálculo para determinar el contenido de fenoles totales (TPC) en las muestras de café.

Para proceder con los cálculos, se parte desde la ecuación de la curva de calibración del estándar de ácido gálico y se obtiene la concentración ($\mu\text{g/mL}$) obtenida mediante los respectivos cálculos y mediante una regresión se obtiene la concentración de cada muestra en ($\text{mg EAG}/100\text{g}$). A continuación, se describe el proceso.

Ecuación 4

Ecuaciones de la curva de calibración del estándar de ácido gálico

$$y = xb + a$$

$$y = 0.0028x + 0.0645$$

y: absorbancia,

x: Concentración de las soluciones de estándar de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$),

b: pendiente de la recta,

a: intersección de la recta.

Para obtener x (concentración) de la formula del estándar de ácido gálico despejamos “x” y reemplazamos los respectivos valores. El valor de “y” se reemplaza con la absorbancia de cada muestra, y “a” y “b” se mantienen constantes.

En las siguientes tablas se presentan las respectivas absorbancias para cada muestra.

Muestra	Absorbancia
1	0.337
2	0.445
3	0.403
4	0.279
5	0.656
6	0.464
7	0.398
8	0.434
9	0.572
10	0.451
11	1.043
12	0.515
13	0.558
14	0.583
15	0.494

Ecuación 5

Ecuación para calcular x (concentración).

$$x = \frac{y + a}{b}$$

$$x = \frac{0.337 + 0.0645}{0.0028}$$

$$x = 143.393 \frac{\mu g}{mL}$$

En la siguiente tabla se muestra las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de cada muestra.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	144.106
2	182.748
3	167.674
4	123.290
5	258.715
6	189.567
7	165.999
8	178.919
9	228.567
10	185.021
11	397.371
12	207.871
13	223.423
14	232.515
15	200.573

Una vez obtenida la concentración de la muestra, y mediante una regla de tres se hace la regresión hasta obtener la cantidad total de fenoles expresa en mg EAG/g.

$$143.393 \mu\text{g} \longrightarrow 1000 \mu\text{L}$$

$$X \longleftarrow 1000 \mu\text{L}$$

$$X = 143.393 \mu\text{g}$$

$$143.393 \mu\text{g} \longrightarrow 200 \mu\text{L}$$

$$X \longleftarrow 40000 \mu\text{L}$$

$$\mathbf{X = 28678.6 \mu\text{g EAG/g}}$$

Se realiza el cambio de unidades para expresar en mg EAG/g;

$$x = 28678.6 \mu\text{g} * \frac{1 \text{ mg}}{1000\mu\text{g}} = \mathbf{28.6786 \text{ mg EAG/g}}$$

y en $\mu\text{g EAG/100g}$.

$$28.6786 \mu\text{g} \longrightarrow 1 \text{ g}$$

$$X \longleftarrow 100 \text{ g}$$

$$X = 2867.860 \mu\text{g EAG}/100\text{g}$$

Se sigue el mismo procedimiento para todas las muestras teniendo en cuenta la absorbancia y concentración que en cada muestra son diferentes y los resultados se presentan en la Tabla 6.