



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

**Desarrollo de un protocolo para medir pH en muestra de
café**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO QUIMICO

Autora: Obando Yunga, Erika Katherine

Director: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny

LOJA

2022



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-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>

2022

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 30 de septiembre de 2022

Magister

Natalí Elizabeth Solano

Director de la carrera de Ingeniería Química

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Desarrollo de un protocolo para medir pH en muestra de café realizado por Erika Katherine Obando Yunga ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, PhD.

C.I.:1103596167

Correo electrónico: jgfigueroa@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Erika Katherine Obando Yunga, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Titulación denominado: Desarrollo de un protocolo para medir pH en muestra de café, de la carrera de 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; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente 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", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo 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.

.....

Autor: Erika Katherine Obando Yunga

C.I.: 1950001949

Correo electrónico: ekobando@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Con mucho cariño a mis hermanos Yeslee, Andrea, Juan Carlos y José Luis por ser parte de mi motivación, por compartir conmigo buenos y malos momentos, los quiero mucho.

A mis tíos Freddy, Wilson, Nancy, Patricia, Ramón y Milton a pesar de la distancia estuvieron presentes a lo largo de mi vida universitaria.

A mi querido amigo Adrián, quién me brindó su apoyo incondicional, sus consejos y palabras de aliento para seguir adelante.

Agradecimiento

En primer lugar, quiero agradecer a Dios y la Virgen del Cisne, por guiarme e iluminar mi camino durante mi estudio, por darme fuerza y fortaleza para luchar por cada uno de mis sueños.

A mis padres por ser mi ejemplo a seguir, confiar en mis capacidades y darme la oportunidad de poder alcanzar otra meta propuesta en mi vida.

A mi director de Trabajo de Titulación PhD. Geovanny Figueroa por sus enseñanzas, paciencia y acompañamiento en el desarrollo del presente trabajo.

Gracias a todas las personas quienes me ayudaron directa e indirectamente a lo largo de mi carrera universitaria, en especial a Daniela, Fátima y Milton.

Índice de contenidos

Caratula	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
Lista de abreviaturas.....	XI
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Capítulo uno	5
Marco Teórico	5
1.2 Clasificación.....	6
1.2.1 <i>Coffea arabica</i>	6
1.2.2 <i>Coffea canephora o robusta</i>	6
1.2.3 <i>Composición química de los granos de café</i>	6
1.3 Producción de café a nivel mundial	7
1.4 Producción de café en el Ecuador.....	8
1.4.1 <i>Precio del café verde en Ecuador</i>	8
1.5 Parámetros físico químicos del café	9
1.5.1 <i>pH</i>	9
1.5.1.1 Tabla de escala de pH..	10
1.5.1.2 Equipos para medición de pH.	10
1.5.1.3 pH-metro.....	10
1.5.1.4 pH del café..	11
1.6.1 <i>Acidez</i>	12

1.6.1.1 Equipo para medición de acidez.....	12
1.6.1.2 Bureta digital Mettler Toledo.	12
Capítulo dos	15
Metodología y materiales.....	15
2.1 Muestra.....	15
2.1.1 Reactivos	15
2.2 Optimización del proceso de extracción de ácidos orgánicos	16
2.3 Determinación de la acidez.....	18
2.4 Validación del método.....	18
2.4.1 Repetibilidad.....	18
2.4.2 Exactitud	19
2.4.3 Límite de detección y cuantificación.....	19
2.5 Caracterización fisicoquímica del café cerezo.....	19
2.6 Análisis estadístico	20
Capítulo tres	21
Resultados y discusión.....	21
3.1 Optimización del proceso de extracción	21
3.2 Validación del método.....	27
3.3 Caracterización del café en cerezo.....	28
Conclusiones	32
Recomendaciones	33
Apéndice	41

Índice de tablas

Tabla 1 Variedades de Coffea arabica.....	6
Tabla 2 Composición de los granos de café crudo (Porcentaje).....	7
Tabla 3 Valores de pH en el café.....	11
Tabla 4 Valores de acidez en el café	13
Tabla 5 Acidez titulable de la pulpa de los frutos de café para diferentes estados de maduración.....	14
Tabla 6 Diseño de Box-Behnken para optimizar la extracción de ácidos orgánicos....	17
Tabla 7 Extracción con combinación de equipos.....	24
Tabla 8 Efecto del tiempo sobre la acidez titulable.....	26
Tabla 9 Repetibilidad del método	27
Tabla 10 Caracterización del café cerezo en sus diferentes estados de maduración .	29

Índice de figuras

Figura 1 Granos de cerezo de café.....	5
Figura 2 Producción de café verde a nivel mundial 2001-2019.....	7
Figura 3 Producción de café verde en Ecuador 2001-2019	8
Figura 4 Precio del café verde en Ecuador 2001-2019	9
Figura 5 Tabla de escala de pH.....	10
Figura 6 Medidor de pH.....	11
Figura 7 Comportamiento del pH de la pulpa de café de acuerdo con los días transcurridos después de la floración	12
Figura 8 Bureta digital Mettler	13
Figura 9 Muestra de café cerezo	15
Figura 10 Equipo de ultrasonido.....	16
Figura 11 Baño maría con agitación.....	16

Figura 12 Fermentación de café cerezo	18
Figura 13 Gráficas de superficie de respuesta	22
Figura 14 Gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto combinado de agitación y relación extracción asistida por ultrasonido sobre acidez	25

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Fórmula para el cálculo del límite de detección	19
Ecuación 2 Fórmula para el cálculo del límite de cuantificación	19
Ecuación 3 Ecuación de la acidez para extracción asistida por ultrasonido.....	22
Ecuación 4 Ecuación de la acidez para maceración dinámica	22

Lista de abreviaturas

UAE: Extracción asistida por ultrasonido

RSM: Metodología de superficie de respuesta

ANOVA: Análisis de varianza

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

EtOH: Etanol

MD: Maceración dinámica

MAE: Extracción asistida por microondas

RSD: Desviación estándar relativo

HPLC: Cromatografía Líquida

Resumen

Para la determinación de acidez en el café el método oficial AOAC 920.92, utiliza una maceración durante 16 horas, este tiempo prolongado dificulta la toma de decisiones para la cosecha y proceso de fermentación del café. Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un método que permita medir la acidez de cerezo de café en menor tiempo, luego de realizar una búsqueda de información no se ha encontrado técnicas disponibles para determinar el contenido de acidez en un tiempo menor. Se optimizaron las variables de solvente, temperatura y tiempo, mediante la metodología de superficie de respuesta, se estableció la acidez como variable de respuesta. El mejor método para la extracción de ácidos orgánicos, fue la extracción asistida por ultrasonido (UAE) siendo las condiciones óptimas: tiempo de extracción 150 min, solvente 100% agua y temperatura de 70 °C. Por lo tanto, este es el primer estudio que permite cuantificar la acidez, en el que se obtuvo como valor máximo de acidez de 5.50 ± 0.15 mL de NaOH 0.1 M/100 g y pH de 5.65.

Palabras clave: Cerezo de café, ultrasonido, fermentación, ácidos orgánicos, acidez titulable.

Abstract

For the determination of acidity in coffee, the official AOAC 920.92 method uses maceration for 16 hours, this long time makes it difficult to make decisions for the coffee harvest and fermentation process. For this reason, the objective of the present investigation was to develop a method that allows measuring the acidity of coffee cherry in less time, after conducting a search for information, no available techniques have been found to determine the acidity content in a shorter time. Solvent, temperature and time variables were optimized using the response surface methodology, acidity was established as the response variable. The best method for the extraction of organic acids was ultrasound-assisted extraction (UAE), with optimal conditions: extraction time 150 min, solvent 100% water, and temperature 70 °C. Therefore, this is the first study that allows quantifying acidity, in which a maximum acidity value of 5.50 ± 0.15 mL of NaOH 0.1 M/100 g and pH of 5.65 was obtained.

Keywords: Coffee cherry, ultrasound, fermentation, organic acids, titratable acidity.

Introducción

El café es un producto ampliamente consumido en el mundo (Abalo, 2021), el cual se caracteriza por su excelente aroma y sabor (Elhalis et al., 2021). En el año 2019 se comercializó 10 billones de toneladas a nivel mundial (FAO, 2019). En el mercado actual el precio del café depende de su calidad sensorial. Para que un café sea considerado de especialidad, el resultado de la evaluación sensorial debe alcanzar un puntaje mayor a 80 puntos según la escala de SCAA (Guambi et al., 2017). Cafés con esta calidad pueden llegar a costar más de 100 dólares la taza (200 mL) (Anecafé, 2021). Sin embargo, para alcanzar este puntaje, se debe cosechar sólo frutos maduros y tener un control riguroso en el proceso de post-cosecha, especialmente en la etapa de fermentación (Batista et al., 2020).

El estado de madurez del fruto del cafeto, se determina en base al color del cerezo, la concentración de sólidos solubles y la acidez (Carvajal et al., 2011). Estos parámetros dependen de la concentración de carotenoides y antocianinas, azúcares y ácidos orgánicos, respectivamente (Marín et al., 2004). Se recomienda cosechar el café cuando presente un color de Orange-Red Group N34-A, 13.96 a 24°Brix y una acidez cercana a 8.3 mL de NaOH 0.1 M/100 g (Figuroa & Vargas, 2016; Marín et al., 2004; Martínez et al., 2017).

Respecto a la fermentación, los microorganismos del mucilago con la ayuda de sus enzimas pectolíticas que oxidan una parte de los azúcares, producen energía (ATP) y otras sustancias como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, dióxido de carbono y especialmente ácidos orgánicos (Córdova & Guerrero, 2016; Prieto et al., 2013; Schwan et al., 2012). Estos compuestos son responsables de la calidad final del café (Avallone et al., 2001; Kipkorir et al., 2015), al punto que una sobrefermentación puede ocasionar un café de muy baja calidad. (Hameed et al., 2018; Mazzafera, 1999). En este sentido, la acidez es un parámetro que se debe monitorear constantemente durante el proceso de fermentación (Barbosa et al., 2019; Lee et al., 2015; Pereira et al., 2021).

Estudios previos han utilizado el método oficial AOAC 920.92 Acidity (Total) of Roasted coffee para cuantificar la concentración de ácidos orgánicos en el café (Kinyua et al.,

2017; Mazzafera, 1999; Pereira et al., 2021; Ramalakshmi et al., 2007). Sin embargo, esta metodología incluye un proceso de extracción por 16 h (*Official Methods of analysis of AOAC International, 2019*), lo que impide tomar decisiones oportunas, que permitan evitar pérdidas económicas por una sobrefermentación. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un método que permita medir la acidez del café en un tiempo mucho menor.

Al desarrollar un método totalmente nuevo se encontraron dificultades en el desarrollo del presente trabajo de investigación, dado la escasez de información en bibliografía, sin embargo, para contrarrestar esta problemática, se realizaron varias pruebas bajo diferentes condiciones.

El presente trabajo de titulación está organizado en tres capítulos, en el capítulo uno se presenta la revisión bibliográfica respecto a las generalidades del café y parámetros físico químicos. En el capítulo dos se describe la metodología empleada para la extracción de ácidos orgánicos del café; en el capítulo tres se realiza un análisis de resultados y discusión de los mismos con datos bibliográficos y finalmente se describe las conclusiones y recomendaciones para próximas investigaciones. Cabe indicar que, este método permitirá la toma de decisiones en menor tiempo en el proceso de cosecha y fermentación del café.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1 Café

El café (Figura 1) es una semilla originaria del árbol del cafeto, que pertenece a la familia de las *Rubiáceas* y al género *Coffea*, pero la producción de los cafetos según Huanca (2018) se da en dos de sus especies como son *Coffea arabica* y *canephora*. Se originó en la provincia de Kaffa del sudoeste de Etiopia donde las plantas se daban de forma silvestre, las mismas se llevaron al sur de Arabia y se cultivaron en el siglo XV. La difusión y elección de la especie fue llevada a cabo por los árabes, los cuáles introdujeron en la provincia de Yemen probablemente a finales del siglo XVI. Luego en el año 1700 las plantas de café de Yemen fueron introducidas por los holandeses en Indonesia. De igual manera, algunas décadas más tarde se propagó en América Central y del Sur (Espinosa 2019; Téllez 2016).

Figura 1

Granos de cerezo de café



1.2 Clasificación

El café de origen botánico cuenta principalmente con dos especies, como son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* o robusta, y algunas especies menos consumidas como, *Coffea excelsa* y *Coffea liberica*. A continuación, se describen las especies más representativas:

1.2.1 *Coffea arabica*

Es la especie más significativa hoy en día, representa un 70% de la producción de café, constituyéndose en un café de calidad. En la Tabla 1, se puede apreciar las características de las diferentes variedades de esta familia.

Tabla 1

Variedades de Coffea arabica

Variedad	Características
Moka	Granos pequeños e irregulares
Típica	Café sensible a enfermedades y plagas
Canturra	Desarrollo rápido y tiene buen rendimiento
Catuai	Rápido rendimiento
Kent	Muy resistente
Armella	Su nombre es gracias al color de su grano
Maragogipe	Grano grande, resistente a enfermedades

Nota. Adaptado de Huanca (2018)

Además, la especie *Coffea arabica* es muy resistente y de alto rendimiento, lo que justifica su mayor cultivo.

1.2.2 *Coffea canephora* o robusta

Esta variedad de café se produce en lugares con bajas altitudes, es resistente a cambios climáticos como las fuertes lluvias y altas temperaturas, los frutos son pequeños y además es menos aromático. Por otra parte, los granos de café verde contienen más cafeína y son más ácidos (Herrera 2018).

1.2.3 Composición química de los granos de café

El café verde está compuesto químicamente de carbohidratos (58-59%), proteínas (11.5-11.8%), ácidos clorogénicos (6.5-10%) y minerales (4.2-4.4%) (Calle 2011). En la Tabla

2, al mismo tiempo se indica el porcentaje de cada uno de ellos se muestra la composición química de los granos verdes de la especie arábica y robusta.

Tabla 2

Composición de los granos de café crudo (Porcentaje)

Componente	<i>Coffea arabica</i> (%)	<i>Coffea robusta</i> (%)
Cafeína	1.2	2.2
Minerales	4.2	4.4
Potasio	1.7	1.8
Lípidos	16	10
Trigonelinas	1	0.7
Proteínas	11.5	11.8
Ácidos alifáticos	1.4	1.4
Ácidos clorogénicos	6.5	10
Glucósidos	0.2	0.5
Carbohidratos	58	59

Nota. Adaptado Calle (2011)

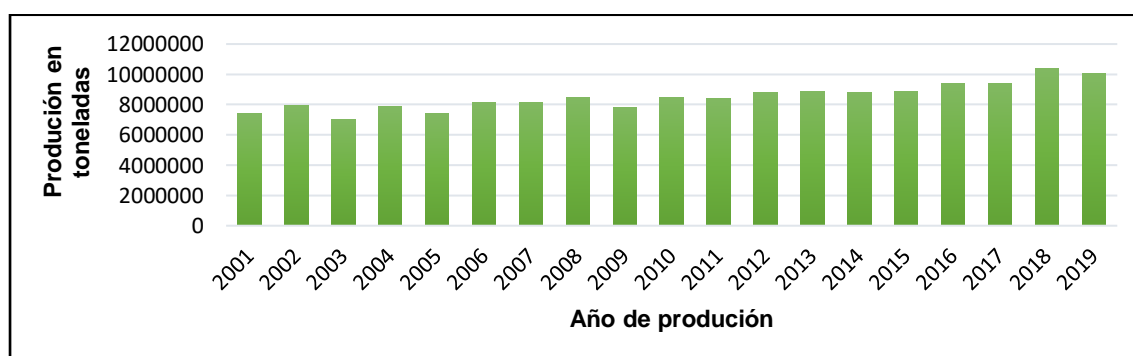
Los granos de *Coffea arabica* contienen mayor cantidad de lípidos, mientras que la especie *Coffea robusta* se caracteriza por contener cafeína, minerales y ácidos clorogénicos en mayor proporción.

1.3 Producción de café a nivel mundial

De acuerdo a la Organización Internacional del Café, la producción mundial se redujo 0.9% es decir a 168.71 millones de sacos de 60 kg en el año 2019, lo que representa un valor de diez billones de toneladas como se muestra en la Figura 2 (FAO, 2019).

Figura 2

Producción de café verde a nivel mundial 2001-2019



Nota. Adaptado de FAO (2019)

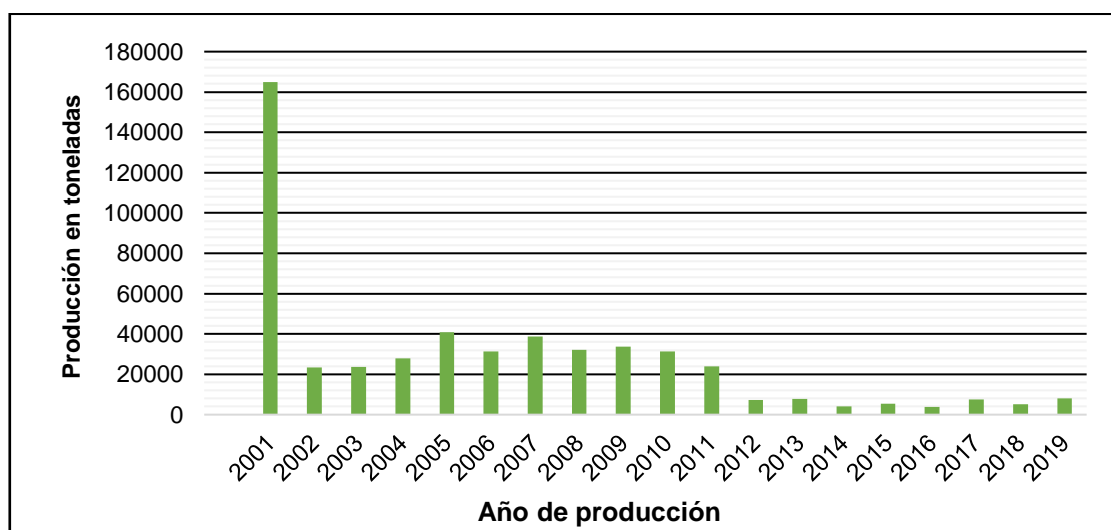
A nivel mundial la producción de café arábica es mayor que la de café robusta, siendo 12.554,47 y 11.749,72 millones de sacos de 60 kg, respectivamente (Sánchez et al., 2019).

1.4 Producción de café en el Ecuador

En Ecuador, la producción de café ha disminuido de manera significativa desde el 2001, donde se producía 164.7 mil toneladas a 8 mil toneladas en el 2019 como se muestra en la Figura 3, esto fue debido a que los productores han sustituido las plantaciones de café por plantas frutales, cacao y pastizales mostrando en el 2019 un rendimiento de 2.258 hectogramos/hectárea (hg/ha); en comparación al año 2001 la producción se redujo en 59%, puesto que en ese año se presentó un rendimiento de 5.561 hg/ha (FAO, 2019).

Figura 3

Producción de café verde en Ecuador 2001-2019



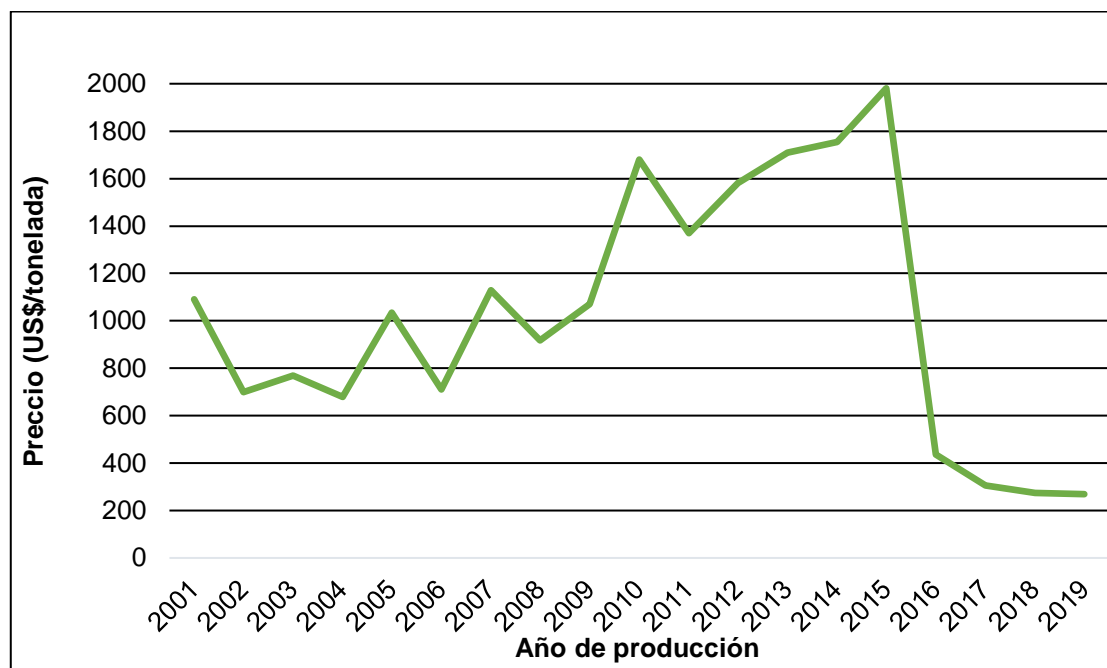
Nota. Adaptado de FAO (2019)

1.4.1 Precio del café verde en Ecuador

El precio del café verde ecuatoriano (Figura 4), en el año 2001 estaba rondando entre 1090 \$US/tonelada. A partir, del año 2002 sufrió una disminución llegando a costar 700 \$US/tonelada; esto fue debido a que existió una sobreoferta mundial. Y peor aún, para el año 2019 su precio bajó hasta llegar a 269 \$US/tonelada (FAO, 2019).

Figura 4

Precio del café verde en Ecuador 2001-2019



Nota. Adaptado de FAO (2019)

Sin embargo, el café puede llegar a costar hasta \$ 100 por libra, debido a la calidad que este puede tener y al buen manejo que se le da, tal es el caso, de la finca Loma Cruz ubicado en la provincia de Pichincha donde cultivan café de la variedad Típica-Sidra mediante el proceso de lavado; el mismo que logró estar entre los mejores lotes del concurso de la última edición de la taza dorada del año 2021 (Anecafé, 2021).

1.5 Parámetros físico químicos del café

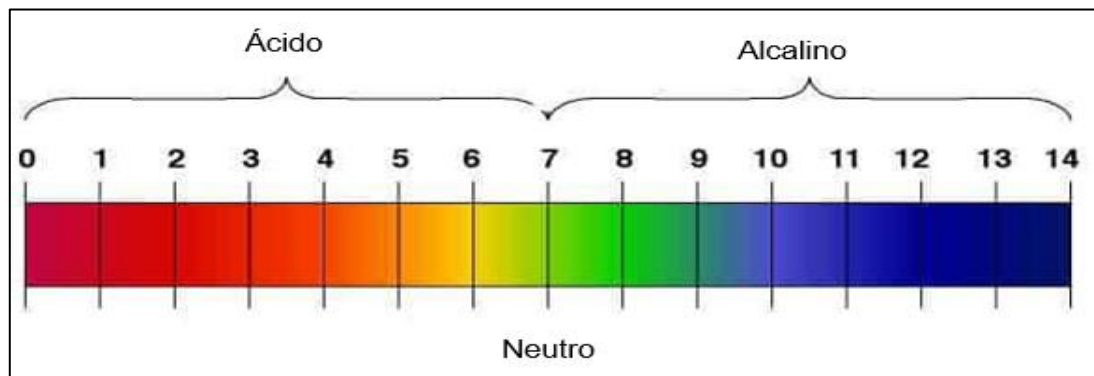
1.5.1 pH

El pH es un parámetro físico químico importante que refleja las condiciones químicas de una solución, puede controlar la disponibilidad de nutrientes, las funciones biológicas, la actividad microbiana y el comportamiento de los productos químicos. En la industria alimentaria es muy importante, se utiliza principalmente para comprobar la calidad, controlar la actividad microbiana, controlar el sabor y para prolongar la vida útil de los alimentos (Martin & Moss, 2000).

1.5.1.1 Tabla de escala de pH. Los valores de pH están entre 0 y 14; una sustancia es ácida cuando su pH está entre 0 y < 7 , una sustancia es básica o alcalina cuando su pH está entre >7 y 14 y una sustancia es neutra cuando su pH es 7, es decir no es ni ácido ni básico como se presenta en la Figura 5 (Blanco & Carbajal, 2013).

Figura 5

Tabla de escala de pH



Nota. Adaptado de Shakeel (2020)

1.5.1.2 Equipos para medición de pH. El pH se determina leyéndolo directamente con un pH-metro (Figura 6). Por lo tanto, es un análisis simple y rápido. Sin embargo, con grandes cantidades de muestra, los análisis de pH y acidez tienen mayor duración debido al tiempo necesario para ejecutarlos, debido principalmente por la preparación de la muestra (Araujo et al., 2020).

1.5.1.3 pH-metro. Es un instrumento que mide la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad expresada como pH, se utiliza en muchas aplicaciones que van desde la experimentación de laboratorio hasta control de calidad.

Figura 6*Medidor de pH*

1.5.1.4 pH del café. El café está sujeto a cambios físicos, químicos y organolépticos que afectan la calidad del producto final; el valor del pH puede ser indicativo de cambios en los granos de café, como fermentaciones indeseables que pueden ocurrir antes o después de la cosecha del mismo (Araujo et al., 2020). El valor de pH del café tostado debe estar entre 4.9 y 5.2, si el café tiene un valor de pH por debajo de 4.9, tendrá un sabor demasiado agrio y por encima de 5.2 será más amargo. En la Tabla 3, se presenta valores de pH de café reportado por varias investigaciones (Valencia et al., 2015).

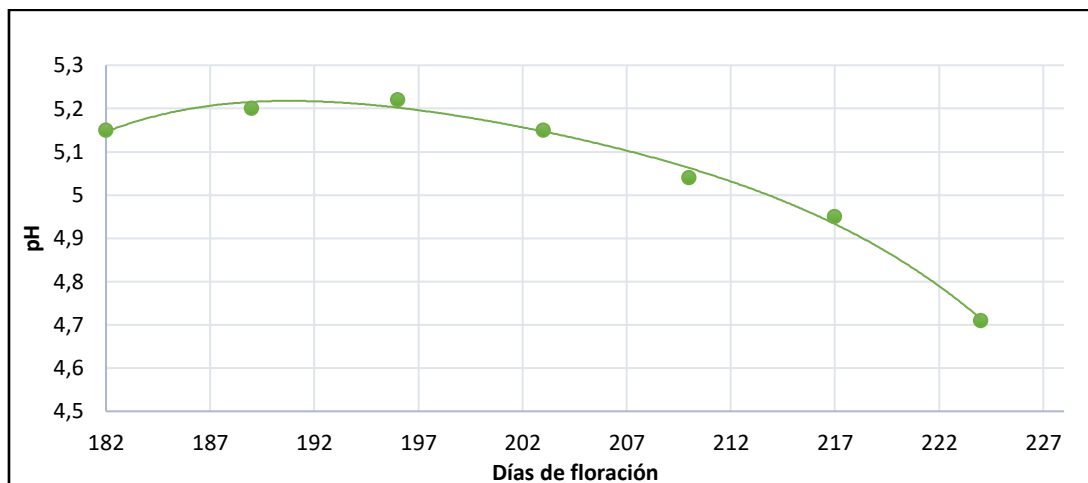
Tabla 3*Valores de pH en el café*

Muestra	pH	Referencias
Mucilago	3.5 – 3.9	Cárdenas y Pardo (2014)
Pulpa	4.4	Andrade (2018)
Verde	5.9	Perez (2016)
Tostado	4.90 – 5.2	Espinosa (2019)
	5.5	Perez (2016)

En la investigación sobre la evaluación de los cambios físicos y químicos en el proceso de maduración de los granos de café; el café en estado verde presentó los valores más altos de pH desde 5.17 hasta 5.22. Por el contrario, a partir del día 203 de floración la variable disminuyó, siendo el valor más bajo para un café sobremaduro, transcurridos 224 días como se muestra en la Figura 7 (Marín et al., 2004)

Figura 7

Comportamiento del pH de la pulpa de café de acuerdo con los días transcurridos después de la floración



Nota. Tomado de Marín et al. (2004)

1.6.1 Acidez

Official methods of analysis of AOAC International (1995) define a la acidez como el grado de una sustancia que describe su capacidad de donar protones, los cuáles son capaces de acidificar una disolución acuosa. Además, nos dice que la acidez titulable es el indicador que expresa el contenido de ácidos libres en una matriz, el cual se expresa como el porcentaje del ácido predominante de la matriz.

1.6.1.1 Equipo para medición de acidez. Tanto la acidez como el pH son parámetros de fundamental importancia para el control de la calidad de la materia prima y productos, hoy en día la utilización de equipos automatizados permite llevar a cabo valoraciones más precisas, además de la obtención de resultados con menos errores.

1.6.1.2 Bureta digital Mettler Toledo. La bureta digital Mettler Toledo (Figura 8) es un equipo eficiente y seguro, debido a que está diseñado para aportar una sensación de sencillez en el trabajo cotidiano en el laboratorio; además ofrece resultados rápidos y precisos, se ajusta a la normativa.

Figura 8*Bureta digital Mettler Toledo*

1.6.1.3 Acidez del café. La acidez del café está vinculada con el nivel de pH y depende del nivel de tostado, si se le ha añadido agua para lavarlo. Además, la acidez y pH tienen una característica común, ya que el pH nos ayuda a determinar qué tan ácido o alcalino resulta el café. En la Tabla 4 se puede observar valores de acidez de café tomado de varias investigaciones (Franca et al., 2005).

Tabla 4*Valores de acidez en el café*

Tipo de café	Acidez titulable (mL NaOH 0,1N/100g de muestra)	Referencias
Pulpa	8.13	Figueroa y Vargas (2016)
	9.05 ± 1.9	Espinosa (2019)
Verde	7.03	Marín et al. (2004)
Tostado	8.04 ± 0.14	Perez (2016)

La acidez es una de las características químicas que se debe medir durante el proceso de maduración del café, en la Tabla 5 se muestra como a medida que va transcurriendo la etapa de maduración el valor de la acidez va aumentando.

Tabla 5*Acidez titulable de la pulpa de los frutos de café para diferentes estados de maduración*

Estado	Días después de la floración	Acidez Titulable (mL NaOH 0,1N/100g de muestra)
Verde 1	182	9.4
Verde 2	189	6.0
Verde 3	196	5.7
Verde amarillo	203	5.1
Pintón	210	6.7
Maduro	217	11.4
Sobremaduro	224	21.5
Seco	231	38.9

Nota. Adaptado de Marín et al. (2004)

Capítulo dos

Metodología y materiales

2.1 Muestra

Se recolectaron frutos de café (*Coffea arabica* L.) variedad Típica (Figura 9), proveniente de la Provincia de Zamora Chinchipe, Cantón Centinela del Cóndor a 833 msnm. Una vez recolectados las muestras, se sumergieron en agua con la finalidad de eliminar los granos de baja densidad, debido a que son inmaduros, malformados y/o brocados (de Sousa et al., 2021). A continuación, para eliminar cualquier impureza se lavó la muestra con abundante agua potable.

Figura 9

Muestra de café cerezo



2.1.1 Reactivos

Para la determinación de acidez se usó hidróxido de sodio, la preparación de este reactivo se presenta en la Figura A 1 (Apéndice A), el cual fue estandarizado con ftalato ácido de potasio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) seguidamente colocado en la bureta digital (Figura A 2) Los reactivos utilizados en la calibración del titulador automático fueron: soluciones buffer 4, 7 y 10 (Thermo Fisher, Scientific, Estados Unidos). Por otra parte, para la evaluación de la exactitud del método se utilizó ácido cítrico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

2.2 Optimización del proceso de extracción de ácidos orgánicos

Para la optimización del proceso de extracción se empleó la metodología superficie de respuesta (RSM) con un diseño experimental de Box-Behnken. Diseño que permite optimizar de manera rápida, eficiente y económica cuando se requiere estudiar el efecto de tres o más variables (Bezerra et al., 2008). Como técnicas de extracción se evaluaron la extracción asistida por ultrasonido (Figura 10) y maceración dinámica. Las variables independientes experimentadas fueron, tiempo de extracción (20-70 min), concentración del disolvente etanol-agua (0-100%) y temperatura de extracción (25-70° C). Como variable dependiente o de respuesta, se seleccionó la acidez.

Figura 10

Equipo de ultrasonido



Las extracciones asistidas por ultrasonidos se realizaron en un baño de ultrasonido (Fisher Scientific, FS60D, California, Estados Unidos) con una frecuencia de 42 kHz y a 100 W de potencia y su acondicionamiento se muestra en la Figura A 3. Luego de despulpar, se pesó 5 g de café en un tubo centrifuga, y se agregó 40 mL de solvente. En cambio, para la maceración dinámica se utilizó un baño maría provisto agitación magnética (IKA, RO15, Medellín, Colombia) a 80 rpm como se muestra en la Figura 11.

Figura 11

Baño maría con agitación



En este caso, en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se pesó 5 g de muestra, dentro del mismo se colocó un magneto de 2.3 cm, se adicionó 40 mL de solvente y se cubrió con parafilm. Las diferentes combinaciones de las variables evaluadas, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Diseño de Box-Behnken para optimizar la extracción de ácidos orgánicos

Temperatura (°C)	Proporción de solvente (%EtOH)	Tiempo (min)	Acidez titulable (mL NaOH 0.1N/100 g)		
			UAE	Maceración dinámica	
25	0	45	3.49	3.77	
47.5	100	70	4.42	4.05	
70	50	70	5.03	5.05	
47.5	100	20	4.02	3.58	
47.5	0	20	3.65	4.5	
47.5	50	45	4.15	4.61	
47.5	50	45	3.74	4.2	
70	100	45	6.00	4.48	
25	50	20	2.92	3.41	
47.5	50	45	4.33	4.00	
25	100	45	3.95	2.58	
25	50	70	3.52	3.63	
47.5	0	70	5.45	5.99	
70	50	20	4.42	4.77	
70	0	45	5.69	5.98	
Condiciones óptimas					
			Predicha	6.24	6.09 ± 0.39
70	0	70	Observada	6.55	5.92 ± 0.37

Además, para comparar los resultados, se analizó la acidez del café con el método oficial AOAC 920.92 Acidity (Total) of Roasted coffee (*Official Methods of analysis of AOAC International, 2019*).

2.3 Determinación de la acidez

Para determinar la acidez se utilizó un equipo de titulación (Mettler Toledo DL15, Zurich, Suiza) empleando una solución valorante de NaOH 0.1 M. Para lo cual, el extracto obtenido fue filtrado y colocado en un vaso de precipitación de 250 mL, al cual se le adicionó 150 mL de agua destilada y se procedió a la valoración hasta que el extracto alcance un pH 8.2. Los resultados se expresaron en mL de NaOH a 0.1 M/100 g de muestra.

2.4 Validación del método

2.4.1 Repetibilidad

Se pesaron 630 g de café, luego se procedió a despulpar la cereza de café con la ayuda de una despulpadora mecánica (Firmar, 1/5, Medellín, Colombia). Se colocó la muestra en boecos previamente esterilizados y se realizó fermentación anaerobia (Figura 12) con trampas de aire, a temperatura ambiente durante 24 horas. Considerando que la acidez del grano de café aumenta en el proceso de fermentación, después de haber transcurrido este tiempo se almacenaron a -20 °C, para que la acidez no cambie y así disponer de una muestra estable (Córdova & Guerrero, 2016). Para evaluar la repetibilidad del método, un sólo operador analizó la muestra de café con las condiciones óptimas (UAE, 70 °C, 150 min and 0% EtOH) en cuatro días diferentes, repitiendo el análisis por 10 ocasiones. La repetibilidad se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA), prueba de rangos múltiples de Tukey, con un nivel de significancia $p > 0.05$.

Figura 12

Fermentación de café cerezo



2.4.2 Exactitud

Se colocó en tubos centrifuga 5 g de muestra fermentada, se adicionó 1 mL de solución de ácido cítrico (3.5 mg/mL), se añadió 40 mL de agua destilada y se realizó la extracción utilizaron las condiciones óptimas. El resultado se evaluó mediante el porcentaje de recuperación.

2.4.3 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calculó mediante el análisis de 10 blancos (Shrivastava, 2011) .Utilizando las siguientes ecuaciones (1y2):

Ecuación 1

Fórmula para el cálculo del límite de detección

$$LOD = X_{b_1} + 3S_{b_1}$$

Ecuación 2

Fórmula para el cálculo del límite de cuantificación

$$LOQ = X_{b_1} + 10S_{b_1}$$

Donde:

X_{b_1} =Concentración media del blanco

S_{b_1} = Desviación estándar

2.5 Caracterización fisicoquímica del café cerezo

Una vez optimizado el método, se lo utilizó para caracterizar muestras de café verde con diferentes estados de madurez. Adicional a la acidez se midió: pH, color y sólidos disueltos. El pH se midió con un equipo de titulación (Mettler Toledo, DL15, Zurich, Suiza). La clasificación de colores se realizó utilizando cartas de color (Royal Horticultural Society, Reino Unido), y un colorímetro digital (Konika Minolta, Japón), el mismo que se presentó en una escala $L^*a^*b^*$. Los sólidos disueltos del café se midieron según el método de la AOAC 932.12 Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products (Official Methods of analysis of AOAC International, 2019), con un refractómetro digital (Mettler Toledo, 30PX, Schwerzenbach, Suiza).

2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las características fisicoquímicas del café se presentaron como medias de desviación estándar. Para determinar si existe diferencia en la acidez del grano se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rangos múltiples de Tukey, y las diferencias se consideraron significativas en $p > 0.05$. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software MINITAB 16 (PA, USA).

Capítulo tres

Resultados y discusión

3.1 Optimización del proceso de extracción

La extracción de ácidos orgánicos depende de condiciones como: técnica de extracción, solvente, tiempo, temperatura, relación solvente-muestra, tamaño de partícula de la muestra, entre otras (Silva et al., 2007). De estos parámetros, en el presente estudio se optimizó el solvente de extracción, la temperatura y el tiempo. Respecto al solvente de extracción, teniendo en cuenta que el método AOAC 920.92 Acidity (Total) of Roasted coffee, utiliza como solvente etanol al 80%, se seleccionó como solventes de extracción agua y etanol en proporciones de 0 a 100%. Además, estos solventes tienen la ventaja de ser seguros, económicos y mayor extracción de los ácidos orgánicos de interés (Tomšik et al., 2016). Para la temperatura, se evaluó el rango completo de operación de los equipos (25 a 70°C). Cabe indicar, que a 70 °C se evita la degradación de ácidos orgánicos (Robles & Ochoa, 2012). Con relación al tiempo de extracción, considerando que el equipo de ultrasonido reduce el tiempo de extracción en comparación con otros métodos de extracción (Ghafoor & Choi, 2009), se evaluó en un rango entre 20 a 70 min. Como técnicas de extracción se emplearon la maceración dinámica y la extracción asistida por ultrasonidos. Como variable respuesta se seleccionó la acidez titulable. En la Tabla 6, se detallan las distintas condiciones ensayadas, de acuerdo a la metodología de superficie de respuesta, con el diseño de Box-Behnken.

Para la extracción asistida por ultrasonido (UAE), se encontró que la temperatura, tiempo y la relación cuadrática del solvente tienen efecto sobre la acidez (Apéndice B). En la Figura 13 (a y c), a consecuencia del efecto cuadrático del solvente, se evidencia que la tasa de extracción tiene sus valores máximos con solventes de extracción puros (etanol y agua), disminuyendo considerablemente con una relación del 50 %EtOH. Este resultado concuerda con el encontrado por Fernández et al. (2022), quienes utilizaron los mismos solventes, para extraer ácido cítrico de la piel de naranja y reportaron que 100% agua es el mejor solvente. Además, en la investigación de Daneshfar et al. (2012), mencionan que algunos ácidos

orgánicos (cítrico, málico, malónico) son más solubles en agua que en etanol. Por otra parte, en la Figura 13 (b) se puede comprobar el efecto lineal positivo de la temperatura y tiempo de extracción. En cambio, para la maceración dinámica (DM) se identificó efecto lineal para las tres variables independientes (Apéndice C). En la Figura 13 (d, e y f), se puede observar que a medida que se incrementa la temperatura, tiempo, y concentración de agua en el solvente de extracción, la acidez aumenta. El diseño empleado permitió obtener modelos matemáticos cuadrático (Ecuación 3) y de primer orden (Ecuación 4) con un buen ajuste para UAE ($p > 0.387$) y MD ($p > 0.522$), respectivamente. Además, los coeficientes de determinación para cada técnica mostraron que más del 85 % y 89 % de las variaciones de las variables son explicadas por el modelo.

Ecuación 3

Ecuación de la acidez para extracción asistida por ultrasonido

$$\text{Acidez} = 1.887 + 0.04029\text{Temp} - 0.022\% \text{EtOH} + 0.0178\text{Time}$$

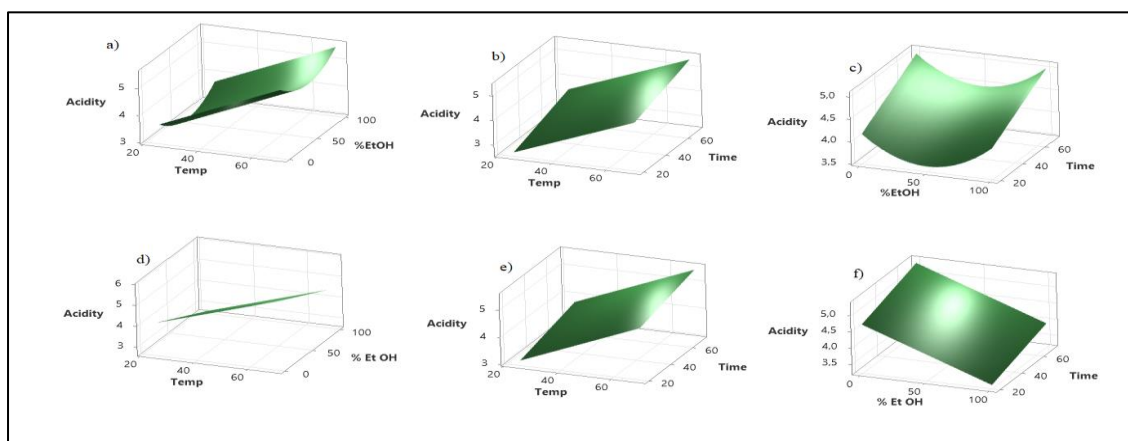
Ecuación 4

Ecuación de la acidez para maceración dinámica

$$\text{Acidez} = 2.628 + 0.03829 \text{Temp} - 0.01389\% \text{EtOH} + 0.01232 \text{Time}$$

Figura 13

Gráficas de superficie de respuesta



Nota. Se muestra el efecto de (a) temperatura/EtOH (b) temperatura/tiempo y (c) EtOH/tiempo en la acidez asistida por ultrasonido, (d) temperatura/EtOH, (e) temperatura/tiempo y (f) EtOH/tiempo sobre la acidez con maceración dinámica.

Así mismo, los modelos determinaron que las mejores condiciones de extracción de los ácidos fueron 70 °C, 0 % EtOH y 70 min, para ambas técnicas. Bajo estos parámetros, se encontró una acidez de 6.09 ± 0.39 y 5.92 ± 0.37 mL de NaOH 0.1 M/100 g de café para UAE y DM, respectivamente. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Hernández et al. (2009), quienes optimizaron la extracción de ácidos orgánicos de la papaya y la piña, y señalaron que la eficiencia del proceso mejora utilizando solvente de extracción agua, a una temperatura de 65°C y el tiempo de extracción de 60 min. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 13, no se encontró efecto cuadrático positivo para las variables ensayadas. Por lo tanto, no se pudo identificar dentro de los rangos ensayados condiciones óptimas. Cabe indicar, que para el solvente y temperatura de extracción no se puede ensayar otras condiciones, debido a que se trabajó con el rango completo de mezcla de solventes y temperatura máxima de operación de los equipos. Además, debido a que no existió interacción entre los factores temperatura y solvente, a continuación, sólo se optimizó la variable tiempo de extracción, manteniendo fijo 70 °C y 0 % EtOH.

En otras investigaciones han logrado maximizar la extracción de compuestos de interés, combinando dos técnicas a la vez. Por ejemplo, Gallo et al. (2017) utilizaron la maceración con agitación magnética, seguida de una extracción con el equipo Naviglio, lo mismo que permitió incrementar la tasa de extracción de polifenoles en un 49 %, en comparación con los resultados encontrados utilizando las técnicas de extracción por separado. Así mismo, Cravotto et al. (2008) utilizaron la técnica asistida por microondas (MAE) y UAE, para mejorar la extracción de compuestos bioactivos (ácidos grasos), logrando disminuir el tiempo hasta 10 veces y aumentando el rendimiento en un 50 %. En tal sentido, en la presente investigación se evaluó si la extracción con MD seguida la UAE, permite incrementar la eficiencia de extracción en un menor tiempo. Para ello, se utilizó un diseño central compuesto, evaluando como variable el tiempo en cada técnica. En la Tabla 7, se presentan las condiciones que fueron evaluadas.

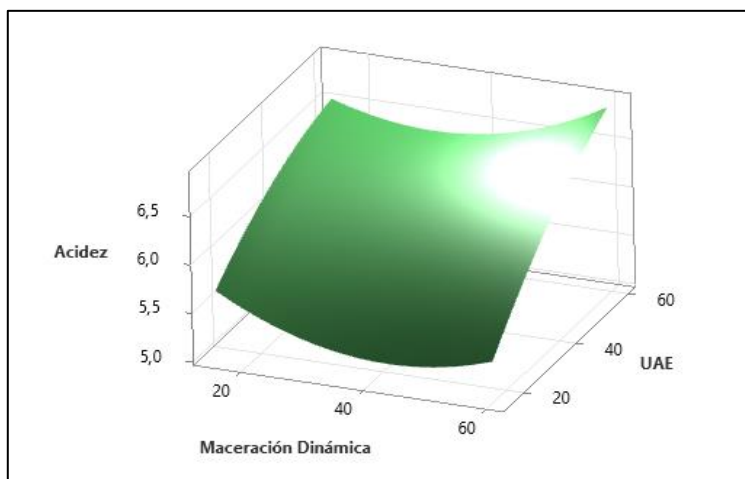
Tabla 7*Extracción con combinación de equipos*

Maceración dinámica	UAE	Acidez titulable (mL NaOH 0.1M/100 g)
37.5	37.5	6.42
53.4	21.6	5.07
60	37.5	6.54
21.6	21.6	5.54
15	37.5	6.07
53.4	53.4	6.58
37.5	60	6.04
37.5	37.5	6.25
37.5	37.5	5.83
37.5	15	5.65
37.5	37.5	5.79
37.5	37.5	5.38
Respuesta	Predicha	Observada
Acidez titulable (mL NaOH 0.1M/100 g)	6.86	6,87±0.78

Luego de hacer el análisis de varianza de los resultados encontrados mediante este diseño, se identificó el gran efecto que tiene la técnica de extracción por ultrasonido sobre la variable de respuesta (acidez), esto también se puede evidenciar en la Figura 14, donde se ve un incremento considerable del 33 % de la acidez entre los tiempos de 15 a 60 min con esta técnica. En cambio, para la maceración dinámica no se evidenció efecto en el tiempo de extracción. En base a lo anterior, se descarta el método de maceración dinámica para la extracción de los ácidos presentes en el café.

Figura 14

Gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto combinado de agitación y relación extracción asistida por ultrasonido sobre acidez



Por otro parte, estudios previos revelan que el uso de extracciones sucesivas en la determinación de ácidos orgánicos en alimentos como la papaya, la piña y la uva, mejoran la eficiencia al posibilitar una reducción en el tiempo destinado a este proceso (Benmeziane et al., 2014; Hernández et al., 2009). En tal sentido, se realizó tres extracciones sucesivas de 15 min cada una, con la finalidad de reducir el tiempo de 70 min para UAE (Figura 13). Como se evidencia en el Apéndice D, sólo hasta la segunda extracción se mejora la eficiencia del método. Sin embargo, la acidez de 4.23 ± 0.02 mL de NaOH/100 g alcanzada luego de dos extracciones, es menor en comparación que el valor obtenido con UAE de 6.09 ± 0.39 mL de NaOH/100 g con las condiciones de 70 min, 70 °C y 0 % EtOH. Esto puede atribuirse a que los ácidos están impregnados en el mucílago que rodea el grano de café, el mismo que es muy viscoso y poco soluble en agua. Peñuela et al. (2010) en su estudio mencionan que para la remoción completa de mucílago del café se necesita aproximadamente 16 horas de fermentación antes del lavado con agua. No obstante, para caracterizar la materia prima, se requiere conocer la acidez del grano de café antes de cualquier proceso de fermentación.

En base a los resultados, es necesario determinar el tiempo óptimo de extracción mediante UAE, para lo cual se evaluó el efecto del tiempo hasta 180 min sobre la extracción

de ácidos, manteniendo constante el solvente (agua) y temperatura (70 °C). Como se puede evidenciar en la Tabla 8, existe un incremento de la acidez para la UAE hasta el tiempo de 150 min. A partir de este tiempo, ya no se evidencia valores diferentes, por ese motivo se determinó 150 min como tiempo óptimo de extracción.

Tabla 8

Efecto del tiempo sobre la acidez titulable

Tiempo (min)	Acidez titulable (mL NaOH 0.1M/100 g) UAE
70	6.09 ±0.48 ^b
120	6.15±0.04 ^b
150	6.29 ±0.04 ^a
180	6.36 ±0.03 ^a

Nota. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna

significativamente diferente ($p > 0.05$) según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey

Una vez definidas las condiciones óptimas de extracción: tiempo de 150 min, temperatura 70°C y solvente 100% agua, se comparó este procedimiento frente al método AOAC 920.92 Acidity (Total) of Roasted coffee. En este sentido, la acidez del café fue de 2.57 ± 0.03 y 5.50 ± 0.15 mL de NaOH 0.1 M/100 g, para el método oficial y UAE, respectivamente. Por lo tanto, con las condiciones óptimas definidas para el método de UAE se puede extraer una mayor cantidad de ácidos orgánicos y en menor tiempo (13 horas menos). Resultados similares fueron encontrados por Liu et al. (2010), quienes evaluaron la extracción de ácido clorogénico de *Folium eucommiae*, donde la extracción con ultrasonido logró una mayor extracción con un tiempo de 30 min, en comparación del método de extracción Soxhlet con 4 horas y extracción de reflujo de calor con 2 horas. La principal ventaja de una UAE es que, es relativamente barata, permite el ahorro de energía, y aumenta el rendimiento en la extracción (Esclapez et al., 2011). Se usa principalmente en la extracción de compuestos químicos de especies vegetales debido a que, la cavitación acústica provoca la ruptura celular, incrementando el transporte del solvente hacia el tejido vegetal, ayudando en la liberación de los compuestos de interés (Robles & Ochoa, 2012). Es por esto que, esta técnica

es más efectiva frente a otros métodos utilizados en la optimización de un proceso (Otorga et al., 2012).

3.2 Validación del método

La validación del método propuesto se realizó mediante los ensayos de repetibilidad, exactitud, límite de detección y cuantificación. La repetibilidad del método, se midió como la desviación estándar relativa en términos de acidez y pH, como se muestra en la Tabla 9, la extracción se realizó por 10 ocasiones en el mismo día, durante cuatro días, con la muestra de café fermentada durante 24 h.

Tabla 9

Repetibilidad del método

Ensayo	N	Acidez titulable (mL NaOH 0,1M/100 g)	pH
A	10	3.76±0.29 ^a	4.74 ± 0.09 ^a
B	10	3.50±0.21 ^a	4.80 ±0.05 ^a
C	10	3.55±0.23 ^a	4.73 ±0.04 ^a
D	10	3.55±0.14 ^a	4.75 ± 0.07 ^a

Nota. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey

Como se puede apreciar en la Tabla 9, al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se evidenció que no existe diferencia significativa entre los diferentes resultados. Además, la desviación estándar relativa (RSD) fue de 6.03 %, valor que es mucho menor que el encontrado por Yang y Choong (2001), para la determinación de los ácidos orgánicos volátiles en jugos de frutas, vinagre y leche, quienes obtuvieron una RSD de 9.4 %, lo que demuestra la excelente repetibilidad del método, a pesar de la complejidad de la muestra. Por otra parte, en el ensayo de exactitud se obtuvo una recuperación del $94.7 \pm 9.5\%$. Resultado similar al encontrado por Scherer et al. (2012), en el que obtuvieron valores entre 82 y 110 % en la determinación simultánea de los principales ácidos orgánicos en frutas y jugos (manzana, naranja y limón). Respecto a los límites de detección y cuantificación, se calcularon mediante el análisis con 10 blancos dando como resultados 0.40 y 0.48 mL de NaOH 0.1 M/100 g de






muestra, respectivamente. Valores que son muy bajos comparados al nivel de acidez del café en los diferentes estados de madurez comprendidos entre 0.98 y 11.4 mL de NaOH 0.1 M/100 g (Hameed et al., 2018; Marín et al., 2004).

3.3 Caracterización del café en cerezo

Con la finalidad de probar la efectividad del método desarrollado (Figura A 4), se lo utilizó para caracterizar cerezos de café en diferentes estados de maduración. Esto es importante, debido a que el estado de madurez afecta considerablemente la calidad sensorial y química del café (Marín et al., 2004). Por ejemplo, cuando los frutos se dejan sobremadurar en la planta, se inician los procesos de catabolismo, lo que ocasiona la degradación de las membranas plasmáticas y la presencia de compuestos químicos indeseables, procedentes de la fermentación o del ataque microbiano. Además, provoca un aumento excesivo de la acidez, disminuyendo la calidad del grano de café (Hameed et al., 2018; Schwan et al., 2012).

Tabla 10

Caracterización del café cerezo en sus diferentes estados de maduración

Muestra	Color		Acidez titulable (mL NaOH0.1M/100 g)	pH	Sólidos solubles (Brix°)	
	Cartas de color	Colorímetro				
Verde		Yellow green group 144-B	$L^* = 51.8 \pm 2.1$ $a^* = -1.4 \pm 0.3$ $b^* = 37 \pm 1.10$	6.43 ± 0.07^b	5.04 ± 0.02^d	*
Verde pintón		Yellow-green N144C and orange-red group 34-B	$L^* = 34.6 \pm 1.4$ $a^* = 21.2 \pm 0.6$ $b^* = 17.2 \pm 0.5$	5.03 ± 0.15^d	5.54 ± 0.01^a	12.7 ± 0.8^b
Pintón		Red group 45-A	$L^* = 32.6 \pm 0.2$ $a^* = 5.2 \pm 0.1$ $b^* = 5.7 \pm 0.4$	4.92 ± 0.06^d	5.53 ± 0.03^a	13.7 ± 0.28^b
Maduro		Orange-red group N34-A	$L^* = 24.8 \pm 0.8$ $a^* = 16.8 \pm 0.5$ $b^* = 4 \pm 0.10$	5.74 ± 0.05^c	5.47 ± 0.03^b	17.5 ± 0.14^a
Sobremaduro		Greyed purple group 183-A	$L^* = 22.5 \pm 0.2$ $a^* = 8 \pm 1.90$ $b^* = 4.6 \pm 2.1$	7.51 ± 0.35^a	5.31 ± 0.03^c	11.20 ± 0.14^c

n=3 datos, expresados en promedio \pm desviación estándar

* No fue posible determinar

Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey

En la Tabla 10, se presentan los resultados de acidez para los diferentes estados de maduración, parámetro que está comprendido entre 4.92 ± 0.06 hasta 7.51 ± 0.35 mL NaOH 0.1M/100 g. Además, se evidenció una correlación entre la acidez y la concentración de sólidos solubles. En este sentido, la acidez disminuyó hasta un valor de 5.74 ± 0.05 mL NaOH 0.1M/100 g, justo cuando el cerezo de café presentó una concentración de sólidos solubles de 17.5 °Brix, momento propicio para realizar la cosecha. Sin embargo, a continuación, la acidez se incrementó considerablemente hasta un valor de 7.51 ± 0.35 mL NaOH 0.1M/100 g. Este comportamiento es similar al detallado en el estudio de Marín et al. (2004). En esta investigación, se evidencia que un café maduro listo para su proceso de cosecha y posterior fermentación, tiene un valor de acidez de 5.74 ± 0.05 mL NaOH 0.1M/100 g. Sin embargo, este valor es mucho menor al indicado por Figueroa y Vargas (2016), quienes obtuvieron una acidez de 8.3 ± 0.4 mL de NaOH 0,1 M/100 g para café arábico, se debe tomar en cuenta que la acidez depende de factores como la variedad, altura, fertilización, lugar de procedencia, entre otros.

Además, de la acidez a los frutos del café también se analizó color, pH y sólidos solubles. Se encontró que los colores de los granos de café van cambiando según el índice de maduración del mismo, en esta investigación presentaron colores desde Yellow green (Café verde) hasta Greyed purple (Sobremaduro) (Tabla 10). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Carvajal et al. (2011), donde mencionan que el color del fruto de café va variando según el día de floración, entre los primeros 182 a 210 días con un color verde. A partir del día 217 el fruto tiende a una coloración verde pintón, a los 224 días los frutos se caracterizan por ser pintones, luego a los 231 días se los denominan maduros y a los 238 días se consideran como granos de café sobremaduro (rojo intenso-purpura). En esta investigación, el color que obtuvo la mayor cantidad de sólidos solubles de la cereza de café fue el Orange-red group N34-A, similar al encontrado en la investigación de Figueroa y Vargas (2016), y parecido al color rojo encontrado por Carvajal et al. (2011) para café de la especie *arabica*. Además, se midió el color mediante el colorímetro digital, los resultados se

expresaron en parámetros de color CIELAB (L^* , a^* , b^*), donde se aprecia que la luminosidad para los frutos verdes es de 51.8, la cual disminuyó significativamente a partir de los frutos verde pintón, teniendo el menor valor para los frutos sobremaduros de 22.5.

En la determinación del pH se obtuvo valores desde 5.04 ± 0.02 hasta 5.54 ± 0.01 , el comportamiento de esta variable muestra que, cuando el pH disminuye la acidez aumenta y viceversa para los estados de maduración del café verde pintón y pintón.

Los resultados de sólidos solubles indicaron que a partir de los frutos verde pintón a maduros se obtuvo valores de 12.7 a 17.5 °Brix, esto demuestra que a medida que avanza el estado de maduración de los cerezos aumenta el contenido de sólidos solubles. El café cerezo utilizado en esta investigación se encontró dentro del rango ideal establecido de 12 a 24 °Brix para un café listo para la cosecha y el procesamiento (Marín et al., 2004).

Conclusiones

El método de maceración dinámica para la extracción de ácidos orgánicos del café no presentó efecto al aumentar el tiempo de extracción.

Las variables temperatura y tiempo presentaron efecto significativo lineal, pero no se encontró interacción entre las variables estudiadas.

El mejor método de extracción de ácidos orgánicos, fue el asistido por ultrasonido, con las condiciones óptimas de: tiempo de 150min, solvente 100% agua y temperatura de 70 °C, obteniendo un valor máximo de acidez de 5.50 ± 0.15 mL de NaOH 0.1 M/100 g y pH de 5.65.

Finalmente, se comprobó que este método sirve para poder caracterizar muestras de café en diferentes estados de maduración y durante el proceso de fermentación.

Recomendaciones

Se recomienda emplear este método para evaluar el contenido de ácidos orgánicos en muestras de café con diferentes procesos de fermentación y tipo de tostado.

Evaluar la eficiencia de extracción de ácidos orgánicos, con el uso de extracción asistida por microondas frente a la usada en esta investigación extracción asistida por ultrasonido.

Utilizar el método desarrollado para la extracción y posterior cuantificación de ácidos orgánicos en HPLC (Cromatografía Líquida).

Referencias

- Abalo, R. (2021). Coffee and caffeine consumption for human health. In (Vol. 13, pp. 2918): Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Andrade, K. (2018). *Evaluación de los parámetros tiempo, temperatura y variedad de café arábica (Coffea arabica) caturra amarillo y SL-28 en el proceso de tostado [tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. Repositorio Institucional <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/8594>*
- Anecafé. (2021). Taza Dorada. <https://www.anecafe.org.ec/>
- Araujo, C., Macedo, L., Vimercati, W., Ferreira, A., Prezotti, L., & Saraiva, S. (2020). Determination of pH and acidity in green coffee using near-infrared spectroscopy and multivariate regression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2488-2493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10270>
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J., Olguin, E., & Guiraud, J. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current microbiology*, 42(4), 252-256. <https://doi.org/10.1007/s002840110213>
- Barbosa, M., dos Santos Scholz, M., Kitzberger, C., & de Toledo Benassi, M. (2019). Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. *Food chemistry*, 292, 275-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.072>
- Batista, M., Batista, N., Mariane, S., Ribeiro, D., Borém, F., & Schwan, R. (2020). Influence of fermentation conditions on the sensorial quality of coffee inoculated with yeast. *Food Research International*, 136, 109482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109482>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Blanco, V., & Carbajal, S. (2013). Determinación microbiológica, pH, acidez y grados Brix en bebidas carbonatadas de máquinas dispensadoras en los Food Court de Metrocentro, San Salvador. *El salvador: Universidad de El Salvador*. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4716>
- Calle, S. (2011). *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales* [Universitat Politècnica de Catalunya]. <http://hdl.handle.net/2099.1/11148>
- Cárdenas, J., & Pardo, J. (2014). *Caracterización de las etapas de fermentación y secado del café la primavera* [Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito]. <https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/handle/001/159/C%c3%a1rdenas%20D%c3%adaz%2c%20Juan%20Pablo%20-%202014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carvajal, J., Aristizábal, I., Oliveros, C., & Mejía, J. (2011). Colorimetría del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6229-6240.
- Córdova, N., & Guerrero, J. (2016). Caracterización de los procesos tradicionales de fermentación de café en el departamento de Nariño. *Biotecnología en el Sector agropecuario y agroindustrial*, 14(2), 75-83. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)75-83](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)75-83)
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., & Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(5), 898-902. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.10.009>
- Daneshfar, A., Baghlani, M., Sarabi, R. S., Sahraei, R., Abassi, S., Kaviyan, H., & Khezeli, T. (2012). Solubility of citric, malonic, and malic acids in different solvents from 303.2 to 333.2 K. *Fluid phase equilibria*, 313, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.09.033>

- de Sousa, S., Moreli, A., Donzeles, S., Soares, S., & Vitor, D. (2021). Harvesting, Drying and Storage of Coffee. In *Quality Determinants In Coffee Production* (pp. 1-64). Springer.
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2021). The role of wet fermentation in enhancing coffee flavor, aroma and sensory quality. *European food research and technology*, 247(2), 485-498. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03641-6>
- Esclapez, M., García, J., Mulet, A., & Cárcel, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>
- Espinosa, S. (2019). *Caracterización del perfil aromático de café (Coffea arabica L.) mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas* Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/24784>
- FAO. (2019). Producción de café verde en Ecuador. from Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. In.
- Fernández, F., Heleno, S., Pinela, J., Carocho, M., Prieto, M., Ferreira, I., & Barros, L. (2022). Recovery of Citric Acid from Citrus Peels: Ultrasound-Assisted Extraction Optimized by Response Surface Methodology. *Chemosensors*, 10(7), 257. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10070257>
- Figueroa, J., & Vargas, L. (2016). Evaluación de DES, FSC Y SPME/CG-MS para la extracción y determinación de compuestos responsables del aroma de café tostado de Vilcabamba-Ecuador. *Química Nova*, 39, 712-719. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160077>
- Franca, A., Mendonça, J., & Oliveira, S. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT-Food Science and Technology*, 38(7), 709-715. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.014>
- Gallo, M., Conte, E., & Naviglio, D. (2017). Analysis and comparison of the antioxidant component of Portulaca oleracea leaves obtained by different solid-liquid extraction techniques. *Antioxidants*, 6(3), 64. <https://doi.org/10.3390/antiox6030064>

- Ghafoor, K., & Choi, Y. (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(3), 295-300. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2009.052>
- Guambi, L. A. D., Cedeño, S. d. R. V., & Talledo, D. S. F. (2017). Calidad organoléptica de cafés arábigos en relación a las variedades y altitudes de las zonas de cultivo, Ecuador. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 18(1), 67-77.
- Hameed, A., Hussain, S., Ijaz, M., Ullah, S., Pasha, I., & Suleria, H. (2018). Farm to consumer: factors affecting the organoleptic characteristics of coffee. II: postharvest processing factors. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(5), 1184-1237. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12365>
- Hernández, Y., Lobo, G., & González, M. (2009). Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food chemistry*, 114(2), 734-741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.021>
- Herrera, E. (2018). *Determinación del número de floraciones y etapas críticas de desarrollo del fruto del café de bajura (Coffea canephora var. Robusta) para el manejo preventivo de la broca (Hypothenemus hampei) en la Provincia de Colón Universidad de Panamá*. <http://up-rid.up.ac.pa/id/eprint/1363>
- Huanca, M. (2018). *Evaluación física del grano de café (Coffea arabica L.) en diferentes tipos de tueste y la calidad sensorial, en taza destinada a diferentes mercados Universidad Mayor de San Andrés*. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/23813>
- Kinyua, W., Kipkorir, R., Mugendi, B., & Kathurima, C. (2017). Effect of different fermentation methods on physicochemical composition and sensory quality of coffee (Coffea arabica). 11. <https://doi.org/10.9790/2402-1106023136>
- Kipkorir, R., Muliro, P., & Muhoho, S. (2015). Effects of coffee processing technologies on physico-chemical properties and sensory qualities of coffee. *African Journal of Food Science*, 9(4), 230-236. <https://doi.org/10.5897/AJFS2014.1221>

- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2015). Coffee fermentation and flavor—An intricate and delicate relationship. *Food chemistry*, 185, 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124>
- Liu, Q., Yang, X., Zhang, L., & Majetich, G. (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from Folium eucommiae and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2503-2511.
- Marín, S., Arcila, J., Montoya, E., & Oliveros, C. (2004). Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café coffea Arabica l var Colombia. *Cenicafé*, 3.
- Martin, A., & Moss, M. (2000). *Food microbiology* (Second ed.). Royal society of chemistry.
- Martínez, V., Aristizábal, I., & Moreno, E. (2017). Evaluation of the composition effect of harvested coffee in the organoleptic properties of coffee drink. *Vitae*, 24(1), 47-58. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n1a06>
- Mazzafera, P. (1999). Chemical composition of defective coffee beans. *Food chemistry*, 64(4), 547-554. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00167-8)
- Official Methods of analysis of AOAC International*. (2019). (L. George, Ed. Vol. II).
- Official methods of analysis of AOAC International. (1995). Acidity (titratable) of fruit products. *Official methods of analysis of AOAC international*, 2, 10.
- Otorga, T., Moharram, H., Shaltout, O., Asker, D., & Youssef, M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>
- Peñuela, A., Oliveros, C., & Sanz, J. (2010). Remoción del mucílago de café a través de fermentación natural. *Cenicafé*, 61(2), 159-173.
- Pereira, L., Guarconi, R., Moreli, A., Pinheiro, P., Pinheiro, C., Moreira, T., . . . Caten, C. (2021). Physicochemical parameters of arabica fermented coffee in different altitudes. <https://doi.org/10.25186/v16i.1877>

- Perez, M. (2016). *Compuestos fenólicos y perfil de ácidos grasos en granos de café (Coffea arabica L.) verde y tostado de variedades e híbridos cultivados en Coatepec, Veracruz* Universidad Veracruzana]. <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/l.-en-A.-Monica-Lilian-Perez-Ochoa.pdf>
- Prieto, H., Poltronieri, Y., Farah, A., & Perrone, D. (2013). Zinc supplementation, production and quality of coffee beans. *Revista Ceres*, 60(2), 293-299.
- Ramalakshmi, K., Kubra, R., & Rao, M. (2007). Physicochemical characteristics of green coffee: Comparison of graded and defective beans. *Journal of food science*, 72(5), S333-S337. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00379.x>
- Robles, L., & Ochoa, L. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 13(2), 109-122.
- Sánchez, A., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2019). Sector Cafetero Ecuatoriano. <https://blogs.cedia.org.ec/obest/wp-content/uploads/sites/7/2020/10/Analisis-del-sector-cafetero-ecuatoriano-final-tres.pdf>
- Scherer, R., Rybka, A., Ballus, C., Meinhart, A., Teixeira, J., & Godoy, H. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food chemistry*, 135(1), 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.111>
- Schwan, R., Silva, C., & Batista, L. (2012). Coffee fermentation. *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*, 677-690. <https://doi.org/10.1201/b12055-46> (2nd Edition)
- Shakeel, A. (2020). The Concept and importance of pH Scale. *The basic concept of pH value*. <https://www.jagranjosh.com/general-knowledge/the-concept-and-importance-of-ph-scale-1456306298-1>
- Shrivastava, A. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of young scientists*, 2(1), 21-25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

- Silva, E., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 381-387. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.01.008>
- Téllez, L. (2016). *Historia cultural del consumo de café en México* Universidad Veracruzana]. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/41692/TellezRodriguezLucia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics sonochemistry*, 29, 502-511. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.005>
- Valencia, J., Pinzón, M., & Gutiérrez, R. (2015). Caracterización fisicoquímica y sensorial de tazas de café producidas en el departamento del Quindío. *Alimentos Hoy*, 23(36), 150-156.
- Yang, M., & Choong, Y. (2001). A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂–C₁₂) volatile organic acids in foods. *Food chemistry*, 75(1), 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00211-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00211-4)

Apéndice

Apéndice A

Diagrama de flujo del proceso

Figura A 1

Preparación de NaOH 0.1 M



Figura A 2

Preparación de la bureta digital

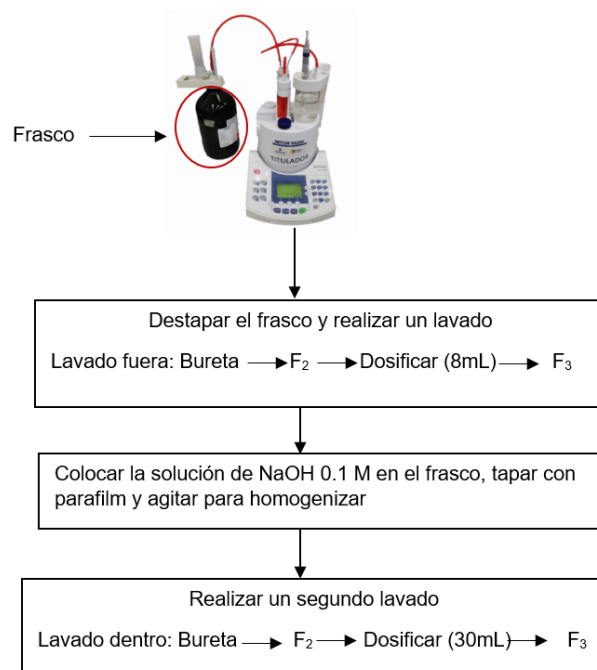


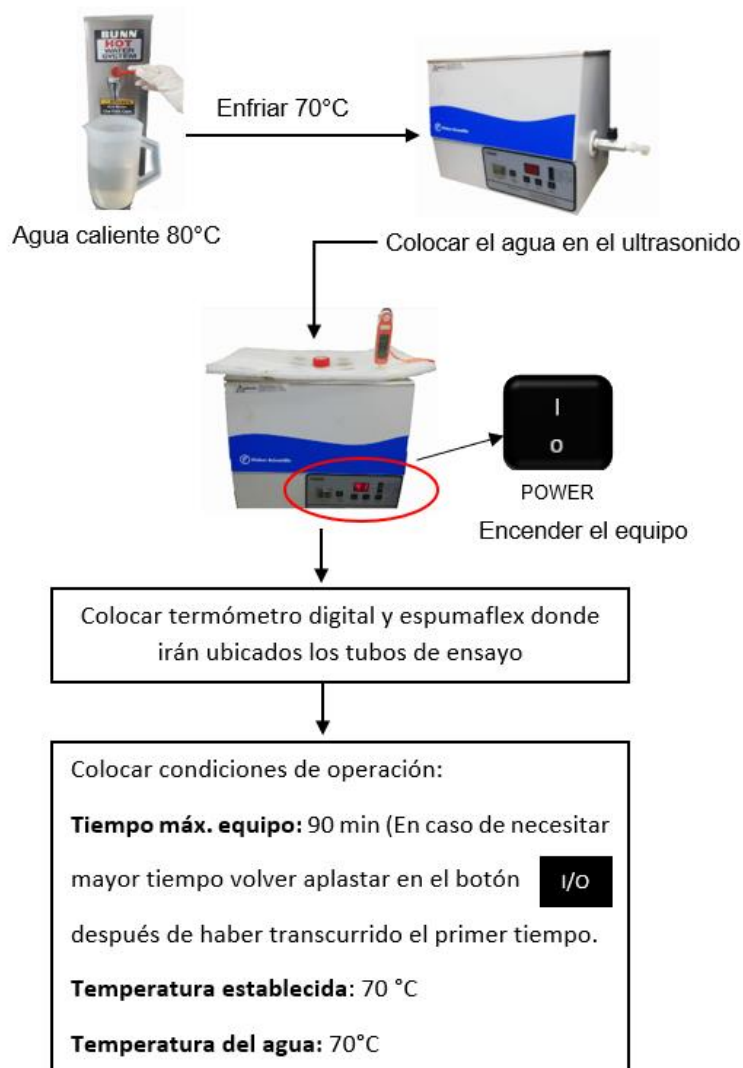
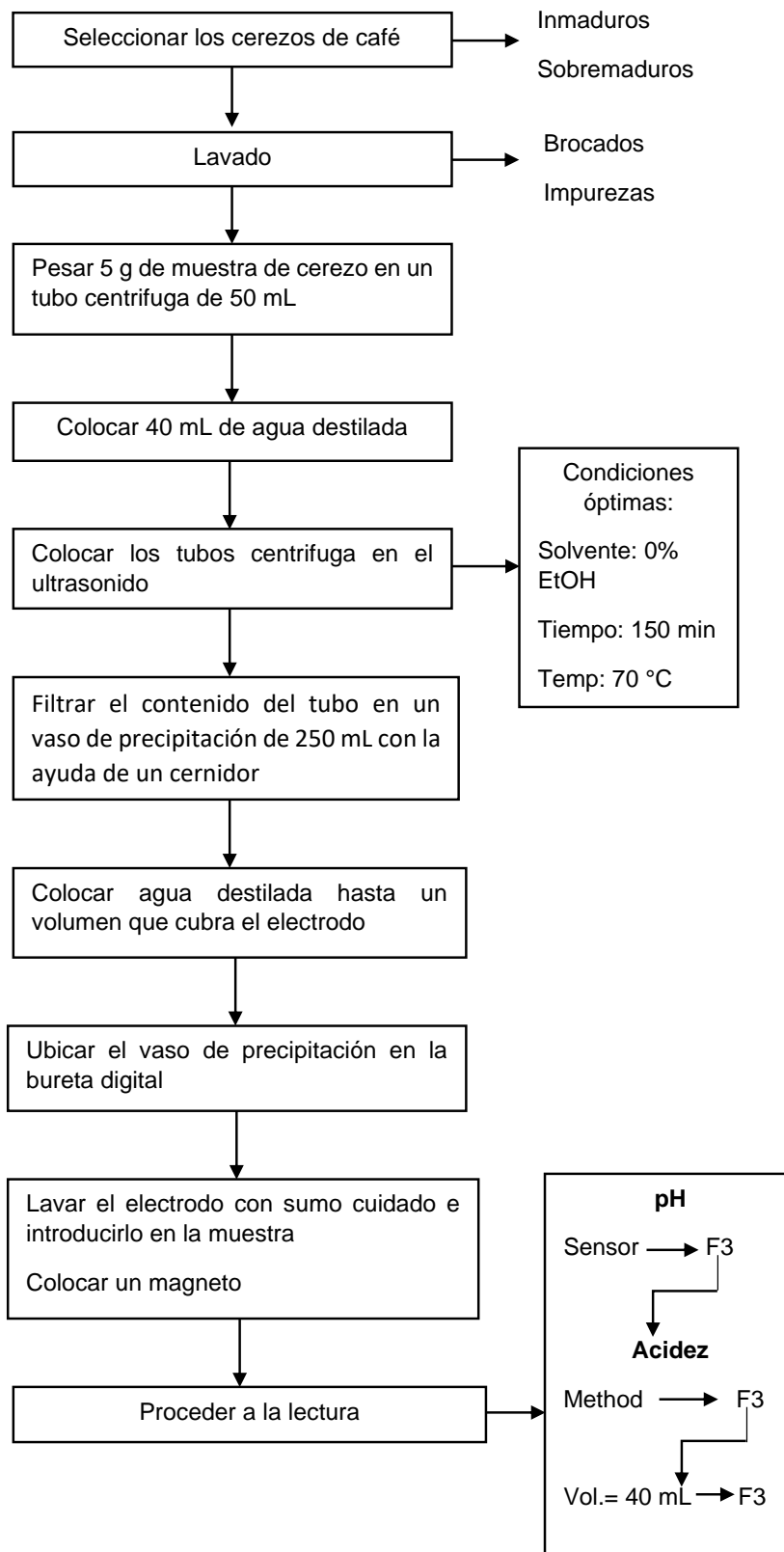
Figura A 3*Acondicionamiento del equipo ultrasonido*

Figura A4*Desarrollo del método*

Apéndice B

Anova de extracción asistido por ultrasonido

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	9,2335	2,30837	14,52	0
Lineal	3	8,0337	2,67791	16,84	0
Temp	1	6,5738	6,57379	41,34	0
%EtOH	1	0,0015	0,00154	0,01	0,924
Time	1	1,4584	1,4584	9,17	0,013
Cuadrado	1	1,1998	1,19977	7,54	0,021
%EtOH**%EtOH	1	1,1998	1,19977	7,54	0,021
Error	10	1,5902	0,15902		
Falta de ajuste	8	1,4071	0,17589	1,92	0,387
Error puro	2	0,1832	0,09158		
Total	14	10,8237			

Apéndice C

Anova de maceración dinámica

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	10,5525	3,5175	31,16	0
Lineal	3	10,5525	3,5175	31,16	0
Temp	1	5,9365	5,9365	52,59	0
% Et OH	1	3,8575	3,85752	34,18	0
Time	1	0,7585	0,75848	6,72	0,025
Error	11	1,2416	0,11287		
Falta de ajuste	9	1,0536	0,11706	1,25	0,522
Error puro	2	0,188	0,09401		
Total	14	11,7941			

Apéndice D

Extracciones sucesivas

Número de extracciones	Tiempo acumulado (min)	Acidez titulable (mL NaOH 0.1M/100 g) UAE
1	15	4.13±0.17 ^b
2	30	4.23±0.02 ^{ab}
3	45	4.44±0.05 ^a

Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferente ($p > 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey