

ESTUDIO QUÍMICO DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES Y ANÁLISIS DE LA  
COMPOSICIÓN DE TANINOS Y CAFEÍNA EN DOS VARIEDADES DE CAFÉ  
(*Caturra* y *Castillo*) DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ARMANDO OLIVO BASTIDAS LEGARDA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

ESTUDIO QUÍMICO DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES Y ANÁLISIS DE LA  
COMPOSICIÓN DE TANINOS Y CAFEÍNA EN DOS VARIEDADES DE CAFÉ  
(*Caturra* y *Castillo*) DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ARMANDO OLIVO BASTIDAS LEGARDA

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director  
NELSON HURTADO GUTIERRES.  
Ph.D en Ciencias Químicas

Codirector  
JUAN PABLO JIMENEZ MORA.  
Químico

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

“Las ideas y conclusiones aportadas por el presente Trabajo de Grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Art. 1º del Acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

### Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2011.



## AGRADECIMIENTOS

A la Gobernación de Nariño, especialmente al Doctor Jairo Rebolledo Rengifo, Gerente de la Zona Norte del departamento de Nariño, por permitir la realización del presente trabajo, bajo el convenio específico interinstitucional llevado a cabo. De igual manera agradecimientos, a sus colaboradores, Doctor Ernesto Narváez y Diana Hoyos, por su amistad y colaboración en el desarrollo del trabajo. Agradecimientos al Laboratorio del café, especialmente a los catadores Fernando Guerrero y Ernesto Acosta, por la colaboración recibida durante todo el proceso de realización del trabajo y la amistad brindada.

A la Universidad de Nariño, especialmente a la Sección de Laboratorios, bajo la Jefatura de la Doctora Piedad Rebolledo en el periodo 2008 – 2011, por su apoyo en la realización del convenio y el uso de las dependencias de análisis, utilizadas en el desarrollo del trabajo de investigación.

A David Eduardo Arturo Perdomo, Químico del área de análisis instrumental de la Sección de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, por ser la persona que propuso la idea para el presente trabajo de investigación, agradecimientos especiales por su colaboración y apoyo incondicional durante el desarrollo del trabajo, y su amistad brindada.

A Juan Pablo Jimenez Mora, Químico del área de análisis instrumental de la Sección de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, por su colaboración, apoyo y amistad durante todo el proceso realizado, además por ser el Codirector del presente trabajo de investigación.

A el Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica (GIPIB), a los Directores Nelson Hurtado Ph.D. y Silvia Cruz Ph.D., por brindarme su apoyo y colaboración. De igual manera, agradecimientos a mis compañeros del GIPIB, Cristina, Claudia, Adriana, Gabriela, Maritza, Milena, Andrés, Diego, Yorlin y Freddy. Por su apoyo y amistad brindada.

## DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación, esta dedicado a V. María S. por ser mi apoyo incondicional en mi vida.

A mis padres Fabio E. y Clara E., a mis hermanos Wilson G, Jaime A y Fabio E., por ser la razón de mis emprendimientos, su apoyo y enseñanza moral, me han permitido cumplir con la meta, gracias por todo.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	21
1. OBJETIVOS.....	23
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
2. MARCO REFERENCIAL.....	24
2.1 EL CAFÉ .....	24
2.1.1 Especie <i>Coffea arábica</i> . . . . .	24
2.1.1.1 Variedad <i>Caturra</i> . . . . .	25
2.1.1.2 Variedad <i>Castillo</i> .. . . .	26
2.1.2 Café del departamento de Nariño.....	28
2.1.3 Características organolépticas del café de Nariño. ....	28
2.1.3.1 Características físicas de calidad del café de Nariño. ....	28
2.1.3.2 Características sensoriales de calidad del café de Nariño.. ...	29
2.1.4 Compuestos volátiles del café tostado. ....	30
2.1.4.1 Compuestos potencialmente volátiles. ....	31
2.1.5 Compuestos fenólicos en café tostado.....	32
2.1.5.1 Taninos.....	33
2.1.6 Compuestos nitrogenados en café tostado. ....	34

2.1.6.1 Cafeína..	34
2.1.7 Otros compuestos químicos en café tostado.....	35
2.1.7.1 Carbohidratos..	36
2.1.7.2 Ácidos orgánicos.....	36
2.1.7.3 Aminoácidos y proteínas..	37
2.2 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.....	37
2.2.1 Microextracción en fase sólida (SPME).....	37
2.2.1.1 Parámetros de optimización.....	39
2.2.2 Destilación extracción simultanea (DES).....	41
2.2.3 Extracción con solventes.	41
2.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS .....	42
2.3.1 Cromatografía de gases (GC). .....	42
2.3.2 Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS).....	43
3. METODOLOGÍA .....	43
3.1 PLAN EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS .....	44
3.1.1 Modelo del muestreo.....	44
3.1.2 Modelo del muestreo para análisis químicos. ....	44
3.1.3 Preparación de la muestra de ensayo de café para análisis químicos.....	45
3.2 MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS QUÍMICOS.....	48
3.2.1 Material general de laboratorio.....	48

3.2.2	Productos consumibles y reactivos químicos.....	48
3.3	EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA EN CAFÉ ARÁBICO.....	48
3.3.1	Extracción de cafeína de la muestra de ensayo de café tostado y molido.....	48
3.3.2	Preparación de recta de calibrado para cafeína.....	49
3.3.3	Análisis cuantitativo de cafeína en muestra de ensayo de café tostado y molido. ....	50
3.4	EXTRACCIÓN DE TANINOS TOTALES EN CAFÉ ARÁBICO.....	50
3.4.1	Extracción de taninos totales en muestra de ensayo de café tostado y molido.....	50
3.4.2	Análisis cualitativo de taninos totales en muestra de ensayo de café tostado y molido.. ....	51
3.4.3	Análisis cuantitativo de taninos totales en muestra de ensayo de café tostado y molido.....	51
3.4.4	Preparación de recta de calibrado para taninos totales.. ....	51
3.5	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CAFÉ ARÁBICO.....	52
3.5.1	Técnica destilación extracción simultanea (DES).....	52
3.5.2	Técnica Microextracción en fase solida (SPME). ....	54
3.6	TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICOS DE COMPUESTOS VOLÁTILES. ....	55
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
4.1	DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA EN CAFÉ ARÁBICO.....	56
4.1.1	Determinación de la longitud de onda fija y adecuada.. ....	56

4.1.2	Recta de calibrado..	57
4.1.2.1	Precisión..	57
4.1.2.2	Exactitud..	58
4.1.2.3	Linealidad y rango.....	59
4.1.2.4	Límite de detección y límite de cuantificación. ....	60
4.1.3	Análisis de muestras de ensayo de café arábico tostado y molido. ....	63
4.1.3.1	Muestra de ensayo de café <i>Caturra</i> y <i>Castillo</i> .....	63
4.2	DETERMINACIÓN DE TANINOS TOTALES EN CAFÉ ARÁBICO.....	67
4.2.1	Análisis cualitativo de taninos totales..	68
4.2.2	Determinación de la longitud de onda fija y adecuada..	69
4.2.3	Recta de calibrado..	70
4.2.3.1	Precisión..	71
4.2.3.2	Exactitud..	71
4.2.3.3	Linealidad y rango.....	72
4.2.3.4	Límite de detección y límite de cuantificación.....	73
4.2.4	Análisis de muestras de ensayo de café arábico tostado y molido. ....	74
4.2.4.1	Muestra de ensayo de café <i>Caturra</i> y <i>Castillo</i> .....	74
4.3	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EN CAFÉ ARÁBICO.....	78
4.3.1	Análisis de COVs por Microextracción en Fase Sólida	

(SPME).....	79
4.3.1.1 Optimización de las condiciones de extracción de COVs.....	79
4.3.2 Análisis de COVs por destilación extracción simultanea (DES).....	85
4.3.3 Identificación de los COVs mayoritarios en café tostado y molido.....	89
4.3.4 Comportamiento de los COVs mayoritarios en las muestras de café.....	94
5. CONCLUSIONES .....	102
6. RECOMENDACIONES .....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	104
ANEXOS.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ANOVA	Análisis de varianza
CAR	Carboxen
CW	Carbowax
CENICAFÉ	Centro Nacional de Investigaciones del Café
CIFC	Centro Internacional de la Ruya del Café (sigla en portugués)
COVs	Compuestos Orgánicos Volátiles
DES	Destilación extracción simultánea
DVB	Divinilbenceno
EFS	Extracción con fluidos supercríticos
FID	Detector de ionización en llama (sigla en inglés)
GC	Cromatografía de gases (sigla en inglés)
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (sigla en inglés)
GIPIB	Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica
ha	Hectáreas
HS-SPME	Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (sigla en inglés)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (sigla en inglés)
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MSR	Metodología de superficie de respuesta
PA	Poliacrilato
PCA	Análisis de los componentes principales (sigla en inglés)
PDMS	Polidimetilsiloxano
SPME	Microextracción en fase sólida (sigla en inglés)
UV-VIS	Espectrofotometría ultravioleta visible



## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Variedades de la especie <i>Coffea arábica</i> .....	25
Tabla 2. Compuestos volátiles en el café.....	31
Tabla 3. Características de la muestra de ensayo de café arábico.....	46
Tabla 4. Especificaciones de la recta de calibración para cafeína.....	50
Tabla 5. Especificaciones de la recta de calibración para taninos totales.....	52
Tabla 6. Especificaciones de extracción técnica DES.....	53
Tabla 7. Especificaciones de extracción técnica HS-SPME.....	54
Tabla 8. Absorbancias a partir de las soluciones patrón de cafeína a 272,8 nm. ....	57
Tabla 9. Concentraciones experimentales de las soluciones patrón de cafeína. ....	58
Tabla 10. Absorbancias finales de las soluciones patrón de cafeína. ....	59
Tabla 11. Datos estadísticos de regresión lineal para cafeína. ....	59
Tabla 12. Concentraciones de las soluciones patrón de cafeína para determinar LC y LD. ....	61
Tabla 13. Datos estadísticos de la regresión lineal para determinar LC y LD.....	61
Tabla 14. Municipios de muestreo para cafeína y taninos totales.....	63
Tabla 15. Datos de absorbancias para muestras de café <i>arábico</i> variedad <i>Caturra</i> .....	64
Tabla 16. Datos de absorbancias para muestra de café <i>arábico</i> variedad <i>Castillo</i> .....	64

Tabla 17.	Contenido medio de cafeína en muestra de ensayo de café arábico variedad <i>Caturra</i> .....	65
Tabla 18.	Contenido medio de cafeína en muestra de ensayo de café arábico variedad <i>Castillo</i> .....	65
Tabla 19.	ANOVA para cafeína en dos regiones cafeteras del departamento de Nariño para la variedad <i>Caturra</i> .....	66
Tabla 20.	Pruebas de Múltiple Rangos.....	67
Tabla 21.	Carta colorimétrica para identificación cualitativa de taninos.....	69
Tabla 22.	Absorbancias a partir de soluciones patrón de ácido tánico a 754,4 nm.....	70
Tabla 23.	Concentraciones experimentales de soluciones patrón de ácido tánico.....	71
Tabla 24.	Absorbancias finales de soluciones patrón de ácido tánico.....	72
Tabla 25.	Datos estadísticos de regresión lineal para ácido tánico.....	73
Tabla 26.	Concentraciones de las soluciones patrón de ácido tánico para determinar LC y LD.....	74
Tabla 27.	Datos de determinación de LC y LD para ácido tánico.....	74
Tabla 28.	Datos de absorbancias para taninos totales en muestras de café arábico variedad <i>Caturra</i> para las dos zonas cafeteras.....	75
Tabla 29.	Datos de absorbancias para muestra de café arábico variedad <i>Castillo</i> .....	75
Tabla 30.	Contenido medio de taninos totales en muestra de café arábico variedad <i>Caturra</i> .....	76
Tabla 31.	Contenido medio de taninos totales en muestra de café arábico variedad <i>Castillo</i> .....	76
Tabla 32.	ANOVA para taninos totales en dos regiones cafeteras.....	77
Tabla 33.	Pruebas de Múltiple Rangos.....	78
Tabla 34.	Muestra de ensayo para compuestos volátiles.....	79

Tabla 35.	Efectos estimados en la extracción COVs 500.....	80
Tabla 36.	Análisis de Varianza para la extracción de COVs 500. ....	81
Tabla 37.	Coeficientes de regresión para COVS 500.....	83
Tabla 38.	Deseabilidad global optima para extracción de COVs para SPME.....	84
Tabla 39.	Condiciones óptimas de extracción de los COVs por la técnica de SH-SPME.....	85
Tabla 40.	Número de COVs por la técnica DES. ....	85
Tabla 41.	Resumen estadístico para la técnica DES. ....	86
Tabla 42.	ANOVA para la técnica DES.....	86
Tabla 43.	Pruebas de múltiples rangos para la técnica DES. ....	87
Tabla 44.	Diferencias entre par de niveles de tiempo de extracción. ....	88
Tabla 45.	Técnicas de extracción de COVs en muestras de café tostado y molido. ....	89
Tabla 46.	COVs identificados por GC-MS de Supelco en muestra de café tostado.....	91
Tabla 47.	Repetibilidad y precisión de la técnica cromatográfica.....	92
Tabla 48.	Identificación de los COVs mayoritarios con GC-FID en muestra de café arábico, a partir de sus índices de Kovat's. ....	93
Tabla 49.	Áreas cromatográficas (GC-FID) de los COVs mayoritarios. ....	94
Tabla 50.	Concentración relativa (%) de los COVs mayoritarios en muestras de café <i>arábico</i> por SPME-GC-FID. ....	96
Tabla 51.	COVs variables en las muestras de café analizadas. ....	98
Tabla 52.	COVs y sus descripciones odoríficas en las muestras de café. ....	100
Tabla 53.	Valoraciones sensoriales de las muestras de café.....	102

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Cafeto del género <i>Coffea spp</i> en producción. ....	24
Figura 2. Especie <i>Coffea arábica</i> variedad <i>Caturra</i> .....	26
Figura 3. Especie <i>Coffea arábica</i> variedad <i>Castillo</i> .....	27
Figura 4. Perfil de Taza del café de Nariño.....	30
Figura 5. Taninos (Polímeros de catequina).....	33
Figura 6. Cafeína (1,3,7-trimetilxantina). ....	35
Figura 7. Dispositivo de Microextracción en fase sólida (SPME). ....	38
Figura 8. Esquema de un cromatógrafo de gases.....	42
Figura 9. Zonas cafeteras del departamento de Nariño. ....	44
Figura 10. Proceso de preparación de la muestra de ensayo de café para análisis químicos.....	47
Figura 11. Montaje para extracción de cafeína. ....	49
Figura 12. Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11. ....	50
Figura 13. Montaje técnica destilación extracción simultanea (DES). ....	53
Figura 14. Extractos obtenidos por la técnica DES. ....	53
Figura 15 . Montaje técnica Microextracción en fase sólida (SPME).....	54
Figura 16. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC17A. ....	55
Figura 17. Reacciones colorimétricas y de precipitación para taninos. ....	68

## LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Variedades de café cultivadas en el departamento de Nariño.....	26
Gráfica 2. Espectro de solución patrón de cafeína. ....	56
Gráfica 3. Recta de calibración para de cafeína a 272,8 nm. ....	60
Gráfica 4. Contenido de cafeína en dos regiones cafeteras del departamento de Nariño para la variedad <i>Caturra</i> . ....	65
Gráfica 5. Medias de Fisher (LSD), para el contenido medio de cafeína.....	67
Gráfica 6. Espectro de solución patrón de ácido tánico.....	70
Gráfica 7. Recta de calibración para ácido tánico a 754,4 nm.....	73
Gráfica 8. Contenido de Taninos totales en 2 regiones cafeteras del departamento de Nariño.....	76
Gráfica 9. Medias de Fisher (LSD) para el contenido medio de taninos totales.....	78
Gráfica 10. Diagrama de Pareto para extracción de COVs 500. ....	81
Gráfica 11. Factores principales dela extracción de COVs 500.....	82
Gráfica 12. Superficie de Respuesta Estimada para extracción de los COVs.....	84
Gráfica 13. Niveles de tiempo de extracción y número de COVs por la técnica DES.....	88
Gráfica 14. Cromatograma de COVs en muestra de café variedad <i>Caturra</i> extraído por SPME-GC-FID.....	1
Gráfica 15. Cromatograma de Supelco para COVs de granos de café tostado por SPME-GC-MS. ....	90
Gráfica 16. Variación de COVs para la técnica SPME en muestras de café. ....	95

Gráfica 17. Variación de COVs para la técnica DES en muestras de café. ....	96
Gráfica 18. Comportamiento de COVs en muestras de café extraídos por SPME-GC-FID.....	97
Gráfica 19. COVs en muestras de café analizadas y sus descripciones odoríficas.....	99

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Datos experimentales de la metodología de superficie de respuesta (MSR). .....	112
Anexo B. Cromatogramas (GC-FID) de muestras de café tostado y molido.....	114
Anexo C. Tiempos de retención e índices de Kovat's por GC-FID de COVs de muestra de café arábico tostado y molido. ....	118
Anexo D. Compuestos orgánicos volátiles identificados por Supelco (GC-MS) en muestra de café tostado.....	119
Anexo E. Referencias bibliográficas en la identificación de los COVs en muestras de café.....	120
Anexo F. Estructuras químicas y descripciones odoríficas, de los COVs mayoritarios, identificados en las muestras de café tostado y molido. ....	122
Anexo G. Cálculos matemáticos y estadísticos.....	125

## RESUMEN

En variedades de café *Caturra* y *Castillo*, cultivadas en dos regiones cafeteras del departamento de Nariño, se determinó el contenido de cafeína y taninos totales, utilizando técnicas de extracción con solventes y análisis espectrofotométricos UV-VIS, encontrándose para la variedad *Caturra* de la región Norte (el muestreo se realizó en 6 municipios) un valor de cafeína de 1,281% y para la misma variedad pero de la región Occidente (muestreo en 10 municipios) del departamento de Nariño un valor de 1,080%, esto permitió establecer que existen diferencias significativas en cuanto al contenido de este componente en las dos regiones cafeteras. Para la variedad *Castillo*, realizando el muestreo en solo dos municipios, se determinó que este valor fue de 1,082%.

Con respecto al contenido promedio de taninos, igualmente se encontró que para las muestras de variedad *Caturra*, colectadas en las dos regiones, existe una diferencia significativa en la concentración de estos compuestos, determinándose valores de 3,82% y 3,99% para la región Norte y Occidente respectivamente. Adicionalmente, para las dos muestras colectadas de la variedad *Castillo*, se determinó una concentración de taninos de 3,74%.

Además, en este estudio se lograron determinar los constituyentes volátiles que aportan al aroma (COVs) de las dos variedades de café. Se identificaron 14 COVs mayoritarios utilizando dos técnicas de extracción; la destilación extracción simultánea (DES) y la Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME). Las mejores condiciones de extracción fueron: para la técnica DES, tiempo de extracción 60 minutos, y para la técnica HS-SPME: temperatura de 71°C, tiempo de 60 minutos y tipo de fibra DBV/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS. La composición de los extractos se evaluó mediante la técnica de análisis de Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID). Con los datos obtenidos se determinaron los índices de retención de Kovats, permitiendo establecer que 8 COVs son pirazinas y 6 son furanos. A partir de este tipo de análisis fue posible encontrar que existe una composición diferente de los compuestos que aportan al aroma de las dos variedades de café. De otro lado, mediante el cálculo de la concentración relativa (%), se determinó que para la variedad *Caturra*, el compuesto en mayor concentración es el furanmetanol, y para la variedad *Castillo*, el 2-furancarboxaldehído.



## ABSTRACT

*Caturra* coffee varieties and *Castillo*, grown in the coffee two regions of Nariño department, we determined the caffeine content and total tannins, using methods of solvent extraction and spectrophotometric UV-VIS, for the variety found in the northern region *Caturra* (sampling was conducted in 6 municipalities) a value of 1,281% caffeine and the same variety but of the West region (sampling in 10 municipalities) of the Department of Nariño a value of 1,080%, which established that there are significant differences the content of this component in two coffee regions. For *Castillo* variety, sampling done in only two municipalities, determined that this value was 1,082%.

Regarding the average content of tannins, also found that for samples *Caturra* variety collected in the two regions, there is a significant difference in the concentration of this compound, determined values of 3,82% and 3,99% for North and West respectively. Additionally, for the two samples collected from a variety *Castillo*, identified a tannin concentration of 3.74%.

In addition, this study been achieved determine the volatile constituents that contribute to the aroma (VOCs) from the two varieties of coffee. We identified 14 VOCs majoritarian using two extraction methods; Simultaneous distillation extraction (SDE) and solid phase microextraction headspace (HS-SPME). The best extraction conditions were: for the SDE method, extraction time 60 minutes, and the HS-SPME method: temperature of 71°C, time 60 minutes and fiber type DBV/Carboxen<sup>TM</sup> / PDMS. The composition of the extracts was assessed using the technique of gas chromatography analysis coupled with a flame ionization detector (GC-FID). With the data obtained were determined retention indices of Kovats, allowing established that VOCs are 8 pyrazines and furans are 6. With this type of analysis was possible to find that there is a different composition of compounds that contribute to the aroma of the two varieties of coffee. On the other hand, by calculating the relative concentration (%), we determined that for the variety *Caturra*, the compound at higher concentrations is furanmethanol, and for the variety *Castillo*, 2-furancarboxaldehyde.

## INTRODUCCIÓN

La presente investigación surge a partir de la necesidad de incrementar el conocimiento de uno de los productos más importantes para el departamento de Nariño, como es el café, especialmente en la especie *arábica* en las variedades *Caturra* y *Castillo*. El propósito es contribuir al conocimiento químico del aroma, denominado en adelante compuestos orgánicos volátiles (COVs), y además, conocer la concentración de cafeína y taninos, compuestos con reconocidos beneficios para la salud, como es el caso de los compuestos fenólicos.

Este estudio químico no pretende mejorar el producto, sino ampliar el conocimiento sobre él, de modo que proporcione información sobre las características y calidad del café de esta región del país.

Mejorar las condiciones de calidad son argumentos esenciales en el proceso de producción industrial, y con un conocimiento enriquecido del producto ayudará a resolver en el futuro los factores que afectan características como el aroma, el contenido de cafeína y taninos del grano nariñense; problemas técnicos de calidad.

El interés del consumidor, son las características organolépticas que presentan este tipo de productos, tales como sabor, consistencia y aroma, de ahí la importancia de determinar la composición volátil aromática.

Tradicionalmente, el proceso básico para la caracterización del aroma ha sido el análisis sensorial, y el instrumento único de medida es el hombre mismo, siendo una valoración subjetiva. No obstante, el café es una bebida que en última instancia es calificada por su aroma y sabor en la taza, criterios esenciales que determinan el valor económico del café.<sup>1</sup>

En este estudio se profundizó en los compuestos volátiles mayoritarios que forman parte del aroma del café arábico en las variedades *Caturra* y *Castillo*, optimizando las mejores condiciones de extracción, de modo que permitió separar e identificar de forma aproximada los compuestos mayoritarios volátiles.

La cuantificación de la cafeína es de gran valor en estas variedades de café, ya que este compuesto no solo le confiere el sabor amargo a la bebida, sino que también se ha comprobado, que aumenta el nivel de atención y favorece el estado de vigilia.<sup>2</sup> La cafeína, junto con otros agentes activos está presente en los

---

<sup>1</sup> REBOLLEDO I. D y VENTO L. A. Propuesta de agroindustrialización del proceso del beneficio del café en el Municipio de la Unión (Nariño) de acuerdo a las características de calidad esperadas por el cliente a nivel internacional. Trabajo de grado. Bogotá. 2004 p. 7

<sup>2</sup> DÍAZ C. Y. Cuantificación de cafeína en café nacional tostado y molido comercializado en la ciudad de Guatemala. Guatemala. Química Farmacéutica. 2007 p. 5-10

medicamentos para los dolores de cabeza, insuficiencia cardíaca, migraña o desorden del centro respiratorio.<sup>3</sup>

Finalmente, se cuantificó los taninos totales del café arábico, ya que estos compuestos actúan inicialmente como mecanismos de defensa para la planta, ejerciendo un efecto inhibitor sobre muchas enzimas, debido a la precipitación de las proteínas, contribuyendo por tanto, a la función protectora en cortezas y leños.<sup>4</sup>

Existen diversos estudios químicos sobre la composición química del café, sin embargo, debido a las particularidades de este tipo de producto en cada región del país, esta investigación tuvo como objetivo, estudiar la composición de cafeína, taninos y el aroma mediante la utilización de diversas técnicas instrumentales. Se estandarizó la técnica de Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME del inglés, Headspace - Solid Phase Microextraction) para los compuestos volátiles, utilizando como técnica de extracción comparativo la técnica de destilación extracción simultánea (DES), adicionalmente se realizó el análisis químico de cafeína y taninos totales; por medio de técnicas de extracción con solventes. Finalmente se aplicó, técnicas instrumentales de análisis de: Cromatografía de gases (GC) y Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS). Disponibles en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño.

Este Proyecto de investigación, permitió la integración de la Universidad de Nariño, el Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica (GIPIB) y el sector caficultor del departamento a través de la Gobernación de Nariño.

---

<sup>3</sup> CLARKE R, y Colaboradores. Coffee Recent Developments. Blackwell Science Ltd. 2001 p. 108

<sup>4</sup> DÍAZ J. A. y ASENCIOS R. S. Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. Perú. 2008 p. 6 -18

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la estandarización de la técnica Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME) para los componentes volátiles, y el análisis químico de cafeína y taninos en *Caturra* y *Castillo*, dos variedades de café producido en el departamento de Nariño.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de extracción “Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME)” útil en el análisis de la fracción más volátil en café *Caturra*, una variedad de café, del departamento de Nariño.
- Implementar las metodologías de extracción destilación extracción simultanea (DES) y Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME) en el análisis de los constituyentes volátiles en *Caturra* y *Castillo* dos variedades de café del departamento de Nariño.
- Implementar las metodologías para el análisis y cuantificación de taninos totales y cafeína en muestras de *Caturra* y *Castillo* dos variedades de café del departamento de Nariño.
- Identificar los constituyentes volátiles mayoritarios en *Caturra* y *Castillo* dos variedades de café del departamento de Nariño, mediante la técnica analítica de Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID).
- Cuantificar el contenido de taninos totales y cafeína en *Caturra* y *Castillo* dos variedades de café del departamento de Nariño, por medio de la técnica de Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS).

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 EL CAFÉ

El cafeto es un arbusto tropical de la familia de las *Rubiáceas* y género *Coffea spp*, que crece en zonas de moderada humedad, entre los 600 y los 1.800 m.s.n.m. Las principales especies cultivadas son *arábica* y *robusta*. El cafeto produce frutos llamados cerezas de café, con dos núcleos que contienen cada uno un grano o semilla de color verde.<sup>5</sup> Su cultivo se originó en su forma silvestre (*arábica*) en Abisinia (actual Etiopia) y se hizo popular durante el siglo XIII como bebida estimulante, posiblemente a raíz de la prohibición islámica contra las bebidas alcohólicas. En el siglo XVIII, los grandes cultivos se desplazaron a Ceilán e Indonesia como también a América del Sur, donde la primera plantación se estableció en Brasil en 1727.<sup>6</sup>

Figura 1. Cafeto del género *Coffea spp* en producción.



Fuente: Centro Nacional de Investigación del Café. Cenicafe. 2008. Imágenes de archivo.

En Colombia se cultivan varias variedades de café, pero los cafetos cultivados a nivel industrial son de la especie *Coffea arábica* y *canephora*.

2.1.1 Especie *Coffea arábica*. Tiene su origen en las montañas de Etiopía. Históricamente se han distinguido dos variedades de café *arábica*: variedad *típica*, la cual se cultivó en los jardines botánicos holandeses, y fue introducida por los franceses al Caribe y desde allí se difundió a los países de Centro y Suramérica. Y la variedad *bourbon* cultivada por los franceses en las islas Bourbon o Reunión.<sup>7</sup>

<sup>5</sup> BELITZ H.D, GROSCH W. Food Chemistry. Owen R. Fennema. USA.1999 p.137

<sup>6</sup> MUNDO DEL CAFÉ, <http://www.mundodelcafe.com/historia.htm> . Visitada (23-03-2009)

<sup>7</sup> PUERTA Q., G.I. Calidad de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas en Colombia. Cenicafé, 49(4). 1998 p. 265-278

El café llegó a Colombia a finales del siglo XVIII al departamento de Santander;<sup>8</sup> desde allí se difundió hacia los departamentos hoy mayores cultivadores del grano: Antioquia, Tolima, Caldas, Valle del Cauca, Risaralda, Quindío, Cundinamarca y Nariño, entre otros. Al principio, en Colombia se cultivó café variedad *típica*; a finales de la década de los 20 se introdujo a Colombia la variedad *borbón* por su alto rendimiento en producción. Después de 1952 se introdujo la variedad *Caturra* desde el Brasil.<sup>9</sup> Desde la década de los 80 se cultiva la variedad *colombia* desarrollada en cenicafé, proveniente de la variedad *Caturra* y el *híbrido* de *timor*. Este material presenta resistencia a la roya del cafeto.<sup>10</sup> En la actualidad se cultivan diversas variedades de *Coffea arábica* las más representativas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Variedades de la especie *Coffea arábica*.

Variedad	Observaciones
<i>Moka</i>	De granos pequeños e irregulares
<i>Típica</i>	Da un excelente café pero es sensible a plagas y enfermedades
<i>Borbón</i>	Buen rendimiento
<i>Caturra</i>	De buen rendimiento, aceptación y desarrollo rápido
<i>Amarella</i>	Llamada así por su color, muy resistente a heladas
<i>Maragogipe</i>	De grano gigante, casi el doble de las otras variedades, muy resistente a enfermedades
<i>Colombia</i>	De buen rendimiento y resistente a la roya del cafeto

Fuente: Delgado, C. 1997. El libro del café.

2.1.1.1 Variedad *Caturra*. Muy similar a la variedad *Borbón* pero de entrenudos cortos, se caracteriza por: un porte bajo, crecimiento compacto, alta productividad, hojas de color verde intenso, el brote es verde, el fruto puede ser rojo o amarillo, el grano es medio (60% de café supremo), y tiene buena calidad en taza. Es susceptible a la roya (*Hemileia vastatrix*).<sup>11</sup>

Con la variedad *Caturra* se inició el cultivo intensivo en Colombia, especialmente en el departamento de Nariño, alcanzando niveles del 74% del área cafetera del departamento (ver grafica 1).<sup>12</sup> Esta variedad se distingue por ser: libre exposición, altas densidades y uso de fertilizantes. Es un mutante de mucha importancia

<sup>8</sup> \*FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. Manual del cafetero colombiano. 1979 p. 34

<sup>9</sup> CASTILLO Z, J. Mejoramiento genético del café en Colombia. Cenicafé, 1990. p. 46-53

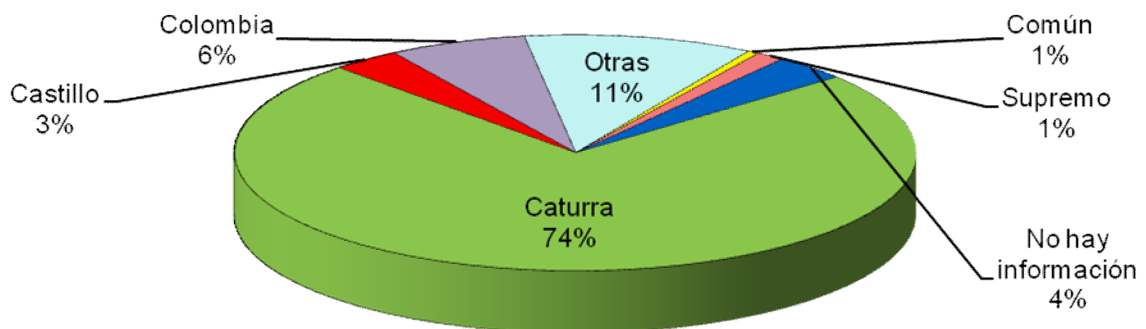
<sup>10</sup> A Illy, y Viani, R. Espresso coffee. The Chemistry of Quality, 1<sup>ra</sup> ed.; Academic Press: Londres, 1995 p. 253

<sup>11</sup> MONTOYA O., G. E. y Colaboradores. Análisis de secuencias de genes de *coffea arábica* var. *Caturra*. Cenicafe 57 (2). Colombia. 2006 p. 79-87

<sup>12</sup> \*GOBERNACION DE Nariño. Estudio físico-exploratorio en café arábico. 2009

económica por su alta producción por unidad de área.<sup>13</sup> Según el SICA se siembra en 376.000 ha (43% del área cafetera), los departamentos con mayor área son Antioquia, Tolima, Huila, Valle del Cauca y Nariño.

Gráfica 1. Variedades de café cultivadas en el departamento de Nariño.



Fuente: Laboratorio del café. Gobernación de Nariño. 2009.

Por sus excelentes características, ha sido el progenitor en diferentes cruzamientos para el desarrollo de variedades, especialmente con el *híbrido de timor*, para obtener materiales mejorados con resistencia a la roya, como la variedad *colombia*, y algunos componentes de la variedad *tabí*.<sup>14</sup>

Figura 2. Especie *Coffea* arábica variedad *Caturra*.



Fuente: Centro Nacional de Investigación del Café. Cenicafe. 2008. Imágenes de archivo.

2.1.1.2 Variedad *Castillo*. Es una variedad de café arábico, se da a partir del cruzamiento entre la variedad *Caturra* (progenitor femenino) y el *híbrido de timor*

<sup>13</sup> GALLEGO G. Juan C. Proceso de calificación y sello de calidad en relación con el origen. FAO y el IICA. 2007 p. 43-45

<sup>14</sup> CASTRO C., B.L.; CORTINA G., H. Evaluación de resistencia a *Caratocystis Fimbriata* Ell. Halst. Hunt. En progenies F5 de café *Borbón* resistente X *Caturra*. Cenicafe 60 (2). 2009 p. 115-125

CIFC#1343 (progenitor masculino),<sup>15</sup> la variedad *Castillo*, es una variedad con adaptación general a las condiciones de la caficultura colombiana. Posee un elevado potencial productivo que le permite alcanzar producciones similares a las obtenidas con las variedades *colombia* y *Caturra*.<sup>16</sup> Al igual que todas las variedades cultivadas, la variedad *Castillo* es susceptible a plagas como el minador de la hoja y la broca del café. Con respecto a la roya del café, una alta proporción de los materiales que han participado en su conformación fue evaluada en el CIFC con la colección de razas patogénicas a los derivados de *Caturra* por híbrido de *timor*, sólo un 2,5% de los materiales evaluados fueron catalogados dentro del grupo fisiológico “E”, que corresponde al genotipo SH5SH5 de las variedades susceptibles *típica* y *Caturra*. El restante 97,5% fue clasificado dentro de los grupos de resistencia a la roya del café.<sup>17</sup>

Figura 3. Especie *Coffea arábica* variedad *Castillo*



Fuente: Alvarado A., G.: Ochoa F, E. 2006. Características fenotípicas de componente de variedad *Castillo* en dos ambientes.

En los aspectos industriales, permite la producción limpia de café, ya que no requiere de la aplicación de fungicidas para el manejo químico de la roya del café. El tamaño de sus granos, superior al 80% de café supremo, permite acceder a los mercados internacionales y beneficiar a los productores por este atributo. Su calidad en taza es similar a la obtenida en las variedades tradicionales *típica*, *tabí*, *borbón*, *Caturra* y *colombia*, con las cuales forma grupos homogéneos de similitud por sus atributos de calidad.<sup>18</sup>

<sup>15</sup> ALVARADO A., G. Mejoramiento de las características Agronómicas de la variedad *Colombia* mediante la variación en su composición. Cenicafé. Avances Técnicos. 2002 p. 304

<sup>16</sup> INFORME ANUAL DE LA DISCIPLINA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO Y BIOTECNOLOGÍA. Selección por resistencia incompleta a la roya del café. Cenicafé. 2004.

<sup>17</sup> MORENO R., L.G. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Separata número 107. Volumen XXVIII. 2004 p. 187-200

<sup>18</sup> DUQUE O., H.; ALVARADO A.; G.; POSADA S., H.E. Nuevas variedades de café: Análisis Económico. Disciplina de Economía Agrícola, Cenicafé. Colombia. 2005 p. 22



2.1.2 Café del departamento de Nariño. El departamento de Nariño se encuentra en una zona geográfica exclusiva y única dentro de Colombia, y las regiones cafeteras que este posee se ven favorecidas por los factores que directamente influyen sobre los cultivos de café, entre los que se puede mencionar, la abundante radiación solar, la incidencia perpendicular de los rayos solares sobre la zona cafetera. Factores que permite al caficultor utilizar durante los periodos de cosecha, al sol como fuente de energía para secar su café. Está zona ecuatorial central con respecto al resto del país, permite cultivar café hasta los 2200 m.s.n.m, café denominado de “altura” con características de alta acidez que difícilmente se puede encontrar en el resto de las zonas cafeteras del país.<sup>19</sup>

Otros factores importantes que afectan a los cultivos de café, son los suelos de origen volcánico: encontrándose que la zona de occidente se encuentra influenciada por el volcán del Galeras y la zona norte por el volcán Doña Juana. Estos suelos afectados por cenizas volcánicas se consideran de alta productividad y proveen en un gran porcentaje de los nutrientes básicos para la producción de café. Lo cual ha permitido que entidades, tales como el Comité de Cafeteros de Nariño junto con el Laboratorio de la Química del Café de la Federación de Cafeteros (1993). “Realizaron una caracterización de los cafés de Nariño en sus diferentes zonas, estratificándolo según el Ecotopo al cual corresponde, investigando el efecto de la altura y suelo en las características físicas y organolépticas del café de cada zona”. Adicionalmente, se ha encontrado que la Oficina de Calidades de Almacafé sede Pasto, realizó un trabajo sistemático, “estudiando su distribución en tamaño, las características en taza, los rendimientos en trilla y los porcentajes de pasilla de las diferentes zonas cafeteras del departamento de Nariño”. Estudio que permitió encontrar un alto porcentaje de café retenido sobre maya 17, característica adecuada para la producción de café excelso tipo Supremo.”<sup>20</sup>

2.1.3 Características organolépticas del café de Nariño. Los perfiles sensoriales y físicos que se tienen en cuenta en estas características, hacen establecer que el café de Nariño presenta una taza “interesante” en calidad e intensidad, encontrándose mejores componentes de sabor en relación al café de otras regiones del país. Es catalogado como café de “altura”.<sup>21</sup>

2.1.3.1 Características físicas de calidad del café de Nariño. Entre las características más sobresalientes, se destacan: – el color, que básicamente no presenta diferencia significativa con respecto a cafés producidos en otras regiones de país, pero cabe destacar que en lo que respecta a café tipo Supremo, el café

---

<sup>19</sup> REBOLLEDO I. D., VENTO L. A., Op. cit., p. 21-22.

<sup>20</sup> Planta Trilladora de Café de Explotación, Complejo Industrial Cafetero de Nariño, FASE 1.

<sup>21</sup> REBOLLEDO I. D., VENTO L. A., Op. cit., p. 39

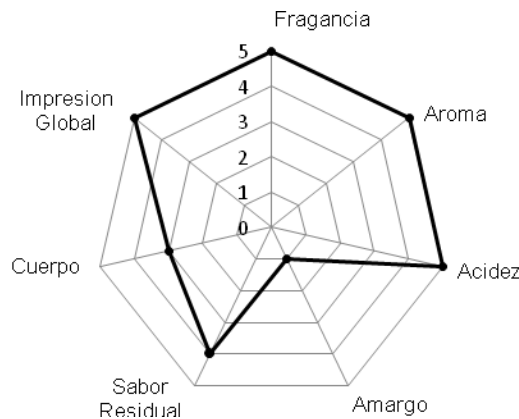
de Nariño presenta una coloración verde oliva. – tamaño del café, los juegos de mallas permite clasificar el café especial de acuerdo al tipo establecido (Supremo, Extra, Europa,.. etc.). El café de Nariño presenta generalmente un tamaño mediano, especificando que un 10% es producto de mayas 17 y 18, mientras el restante 90% se obtiene de las mallas 14, 15 y 16.<sup>22</sup>

2.1.3.2 Características sensoriales de calidad del café de Nariño. En términos de catación, de intensidad y calidad del café, – La fragancia, es uno de las herramientas de percepción más idóneas para calificar. El café de Nariño tiene una alta intensidad, limpia y agradable con notas dulces. – El aroma, compuestos volátiles arrastrados por el agua durante la preparación, permiten la caracterización de la taza, indicando que el café de Nariño es de alta intensidad, suave, fino y agradable. – El sabor, es de alta calidad, se aprecia por la cantidad de agua requerida para opacar el mal sabor, el café de Nariño requiere cantidades mínimas comparadas con las utilizadas en la preparación de la bebida en otras regiones del país. – Acidez, es de alto grado, referenciado al sabor cítrico que presenta, además es la responsable de la aceptación en mercados internacionales como el de los Estados Unidos. – Sabor residual, generalmente se aprecia por el sabor a café que permanece en la cavidad bucal del consumidor, el café del departamento se caracteriza por presentar un sabor residual pronunciado, de intensidad medianamente alta. – Cuerpo, es la sensación de textura y gusto asociada a la consistencia, carácter y fuerza de la bebida que da la impresión de llenura en la boca. El café de Nariño presenta un buen cuerpo de características medias. – Impresión global, básicamente es la que integra las características sensoriales anteriormente mencionadas, es la que da un concepto más generalizado y de relevancia comercial. El café de Nariño tiene una alta impresión global que le da la identidad del café en términos de taza catalogada como fina, balanceada y redonda, posee todas las características organolépticas y sensoriales en buena intensidad y calidad. En la figura 4, se resumen las características organolépticas que da el perfil de la taza del departamento de Nariño.

---

<sup>22</sup> Ibid., p. 39-41

Figura 4. Perfil de Taza del café de Nariño.



Fuente: REBOLLEDO I. D., VENTO L. A. 2004. Trabajo de grado. Bogotá. 2004 p. 48

2.1.4 Compuestos volátiles del café tostado. El café es apreciado y consumido en el mundo por su efecto de estimulante, y más aún por su aroma agradable, que es producto del proceso de tuestión. Por lo tanto, no es sorprendente que las investigaciones sean numerosas, y que han sido llevadas para identificar los compuestos volátiles que originan este aroma agradable para la mayoría de los consumidores, que valoran directamente a través de los sentidos olfatorios y gustativos.<sup>23</sup>

Las primeras investigaciones exhaustivas datan de los años de 1920-30. Donde se aisló aceite de color amarillo de grandes cantidades de café tostado, e identificaron más de 29 compuestos volátiles a partir de sus derivados y sus mediciones de las constantes físicas. Sostuvieron que ninguno de los compuestos identificados causaba el aroma de café. Sin embargo, enfatizaron que una disolución acuosa muy diluida de 2-furfuriltiol “desprendía” una nota agradable indicativa del aroma de café.<sup>24</sup>

El progreso en las técnicas de análisis instrumental, como Cromatografía de gases (GC) y Espectrometría de masas (MS), ha permitido identificar que la fracción volátil del café tostado consta de una gran multiplicidad de compuestos. Más de 800 compuestos volátiles con una gran variedad de grupos funcionales, han sido identificados (ver Tabla 2).<sup>25, 26, 27, 28, 29, 30</sup>

<sup>23</sup> FRIEDEL, P., y Colaboradores. Some constituents of the aroma complex of coffee. J. Agric. Food Chem. 1971 p. 530-32

<sup>24</sup> REICHSTEIN, T. & STAUDINGER, H. The aroma of coffee. Perfum. Essent. Oil. Rec. 46. 1955 p. 86-88

<sup>25</sup> GIANTURCO, M.A., GIAMMARINO, A.S. & Pitcher, R.G. The structures of five cyclic diketones isolated from coffee. Tetrahedron. 1963 p. 2051-2059

<sup>26</sup> BONDAROVICH, H.A., y Colaboradores. Volatile constituents of coffee. Pyrazines and other compounds.

Tabla 2. Compuestos volátiles en el café.

Clase de Compuesto Volátil	Número
Hidrocarburos	80
Alcoholes	24
Aldehídos	37
Cetonas	85
Ácidos Carboxílicos	28
Esteres	33
Pirazinas	86
Pirroles	66
Piridinas	20
Otras bases (por ejemplo indoles)	52
Compuestos azufrados	100
Furanos	126
Fenoles	49
Oxazoles	35
Otros	20
Total	841

Fuente: Nijssen y Colaboradores. *Volatile Compounds in Food*. 1996.

2.1.4.1 Compuestos potencialmente volátiles. El aroma del café tostado está en función de varios factores, incluyendo la especie, procedencia y grado de tuestión. Contiene una mezcla muy compleja de compuestos volátiles con concentraciones considerablemente variables.<sup>31</sup> Esto hace que la identificación y cuantificación de los COVs activos sea una tarea difícil. Investigaciones anteriores, en café arábico de tuestión media, se han logrado establecer clasificaciones de acuerdo a su olor característico, 28 compuestos se han distribuido por grupos de: dulzón/caramelo (metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, 4-hidroxi-2-S-dimetil-3(2H)-furanona, S-etil-4-hidroxi-2-metil-3(2H)-furanona y Vanillina), terroso (2-etil-3-S-dimetilpirazina, 2-etenil-3-S-dimetilpirazina, 2,3-dietil-S-metilpirazina, 2-etenil-3-etil-S-metilpirazina y 3-isobutil-2-metoxipirazina), sulfurosos (2-furfuriltiol, 2-metil-3-furantiol, metional, 3-mercapto-3-metilbutilformiato, 3-metil-2-buten-1-tiol y metanotiol), fenólico/humo (guaiacol, 4-etilguaiacol y 4-vinilguaiacol), frutas (acetaldehído, propanal y (E)-damascenona)

J. Agric. Food. Chem., 15. 1967 p. 1093-1099

<sup>27</sup> GOLDMAN, I.M., y Colaboradores. Aroma research. About the aroma of coffee. II. Pyrazines and pyridines. *Helv. Chim. Acta*, 50. 1967 p. 694-705

<sup>28</sup> TRESSL, R., y Colaboradores. Gas chromatographic-mass spectrometric study of N-alkyl- and N-furfurylpyrroles in roasted coffee. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.*, 7, 1981 p. 28-32

<sup>29</sup> FLAMENT, I. Coffee, cacao and tea. In: *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. Ed. H. Maarse. 1991 p. 617-669

<sup>30</sup> NIJSSEN, L.M., y Colaboradores. *Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data*, 7<sup>th</sup> edn, 1996 p. 72

<sup>31</sup> GROSCH W. *Chemistry III: Volatile compounds*. Germany. 2001 p. 68-89

y aromáticos (3-hidroxi-4-S-dimetil-2(SH)-furanona) y 4-etil-3-hidroxi-S-metil-2(SH)-furanona.<sup>32, 33, 34</sup> Muchos compuestos volátiles son generados por reacciones químicas durante el proceso de tuestión, entre las más importantes están la reacción de Maillard, degradación de ácidos fenólicos y carotenos.<sup>35</sup> Los COVs potenciales se forman de: compuestos monocarbonílicos (los cuales durante el tueste son degradados y se transforman en compuestos volátiles y estos a su vez actúan como precursores de odorantes importantes de grupos dulzón/caramelo y terrosos),<sup>36</sup> furanonas,<sup>37</sup> alquilpirazinas,<sup>38</sup> fenoles y tioles.<sup>39</sup>

2.1.5 Compuestos fenólicos en café tostado. Se sintetizan a partir del metabolismo secundario de las plantas. Ampliamente distribuidos en el reino vegetal y localizados en todas las partes de la planta, y su concentración es variable durante todo el ciclo vegetativo. Entre sus principales funciones cabe destacar la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, alelopatía y la defensa ante factores adversos del ambiente. Adicionalmente ejercen efectos quelantes que modulan la actividad de varios sistemas enzimáticos, de modo que actúan mayoritariamente en la dieta como elementos que promueven salud ante factores fisicoquímicos estresantes para el organismo.<sup>40</sup>

El café, como el té y el vino, contienen importantes antioxidantes fenólicos, como ácidos clorogénico y cafeico, en algunos aspectos similares a las epicatequinas y taninos del té o las quercetinas del vino tinto, pero con diferentes estructuras químicas, y por tanto, distintas funciones metabólicas.<sup>41</sup>

Entre los compuestos fenólicos más abundantes en el café, son los ácidos clorogénicos; su contenido es del 7% en el café verde y se descomponen parcialmente entre 30 a 70% durante el proceso de tuestión, alcanzando niveles del

---

<sup>32</sup> SEMMELROCH, P. & GROSCH, W. Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. wiss. technol.*, 28, 1995 p. 310-313

<sup>33</sup> SEMMELROCH, P. & GROSCH, W. Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food chem.*, 44, 1996 p. 537-543

<sup>34</sup> MAYER, F., CZERNY, M. & GROSCH, W. Sensory study on the character impact aroma compounds of coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 2000 p. 212-276

<sup>35</sup> HOLSCHER, H. & Steinhart, H. Aroma compounds in green coffee. in: *Food Flavors-Generation, analysis and process influence*. Elsevier Science, Amsterdam. 1995 p. 785-803

<sup>36</sup> AESCHBACHER, H.U., y Colaboradores. Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee. *Food Chem. Toxicol.*, 27, 1989 p. 227-232

<sup>37</sup> SCHIEBERLE, P. Formation of furaneol in heat-processed foods. In: *Flavour Precursors. Thermal and Enzymatic Conversions*. American Chemical Society. 1992 p. 164-174

<sup>38</sup> GROSCH, W. Which compounds are preferred by the olfactory sense in heated foods? *Lebensmittelchemie*, 52, 1998b p. 143-146

<sup>39</sup> PARLIMENT, T.H. & STAHL, H.D. Formation of furfurylmercaptan in coffee model systems. In: *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. Elsevier Science, Amsterdam . 1995 p. 805-813

<sup>40</sup> GEE J.M., I.T. Johnson. Polyphenolic compounds : Interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem.* 8, 2001 p. 1245-1255

<sup>41</sup> RICHELLE M., I. Tavazzi, E. Offord. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages prepared per cup serving. *J Agric Food Chem* 49(11). 2001 p. 3438-3442

orden de 4,0%,<sup>42</sup> debido a la reacción de Maillard, lo que confiere un agradable sabor y aroma, además se originan pigmentos denominados melanoidinas, que dan al café tostado su color característico.<sup>43</sup> Cuando la bebida de café presenta una nota de astringencia, es producto de alto contenido de ácido dicafeoilquínico (diclorogénico), que actúa directamente sobre las membranas mucosas, precipitando las proteínas solubles que están en la saliva.<sup>44</sup>

En comparación con otras bebidas, el café es una de las fuentes, con un alto contenido de ácidos fenólicos, comparado con jugos de manzana, naranja, vino tinto, cerveza, té negro, té verde y jugo concentrado de berries. Se ha reportado en general que 200 mL de bebida de café, proporcionan entre 70 y 350 mg de ácido clorogénico.<sup>45, 46, 47, 48</sup>

2.1.5.1 Taninos. Los taninos contienen 3 o más subunidades fenólicas (ver figura 5). Estas moléculas orgánicas, están relacionadas con el color, las características: sensoriales (entre las que se puede destacar el sabor, astringencia, dureza), nutritivas y especialmente, las propiedades antioxidantes, propias de varias especies del reino vegetal,<sup>49</sup> y que radica básicamente en la reactividad del grupo fenólico,<sup>50</sup> de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular, presentando mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples.<sup>51, 52</sup>

#### Figura 5. Taninos (Polímeros de catequina).

<sup>42</sup> SPILLER, M. A. . The chemical components of coffee. Gene A. Spiller, ed. Caffein. CRC Press 1998 p. 103-167

<sup>43</sup> POWRIE, W D, CH Wu, VP Molund. Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. Environ Health Perspect. 67, 1986 p. 47-54

<sup>44</sup> OHIOKPEHAI, O., Brumen, G. & Clifford, M.N. The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Znternational Scientific Colloquium on Coffee, Salvador, Sun Salvador; ASIC: Paris, 1982 p. 177-185

<sup>45</sup> MATTILA P, H J, T. R. Phenolic acids in berries, fruits and beverages. J Agric Food Chem, 54, 2006 p. 7193-7199

<sup>46</sup> GOTTELAND Martín. Algunas verdades sobre el café. Rev. chil. nutr. v.34 n.2. 2007 p. 105-115

<sup>47</sup> LAKENBRINK C, L S, M B. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. J. Agric. Food Chem. 48, 2000 p. 2848-2852

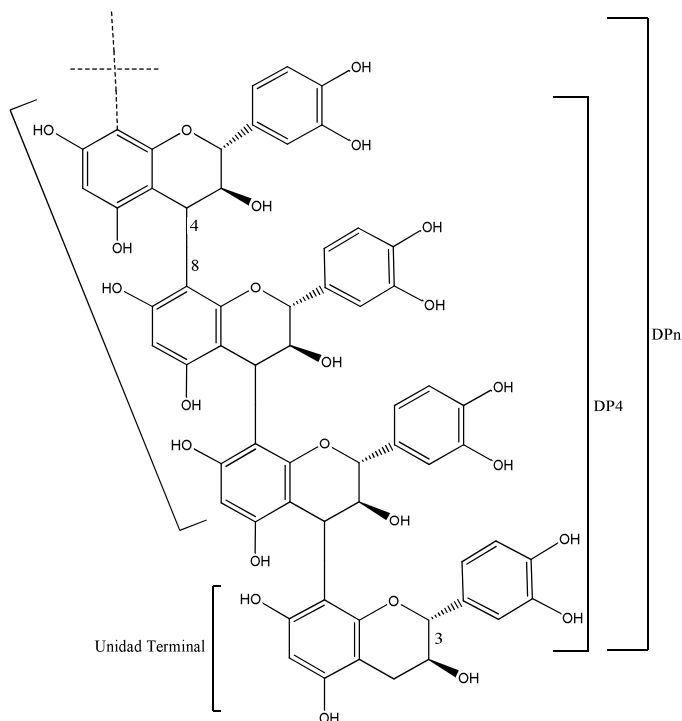
<sup>48</sup> GUTIÉRREZ M. A. Café, antioxidantes y protección a la salud. MEDISAN. 6(4), 2002 p. 72-81

<sup>49</sup> VINSON, J y B. H. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. J. Agric. Food Chem. 43, 1995 p. 401-403

<sup>50</sup> ROBBINS, R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem., 51 (10), 2003 p. 2866-2887

<sup>51</sup> HAGERMAN, A. y Colaboradores. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. J. Agric. Food Chem, 46, 1998 p. 1887-1892

<sup>52</sup> VELIOGLU, Y.S y colaboradores. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. J. Agric. Food Chem, 46, 1998 p. 4113-4117



Fuente: PALADINO S C. 2008. actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*vitisvinifera* l.)

2.1.6 Compuestos nitrogenados en café tostado. Los compuestos nitrogenados en café tostado, se atribuyen al proceso de transformación proteica que se da durante el proceso de tuestión, encontrándose melanoidinas, cafeína y trigonelina; esta última en cantidades mínimas por la degradación térmica durante el tueste, contribuyendo finalmente a la composición volátil en el café.<sup>53</sup>

2.1.6.1 Cafeína. Alcaloide estimulante del sistema nervioso contenido en café, té, mate y cola. Pertenece a la familia de las metilxantinas, en su estado puro es un polvo blanco muy amargo, se metaboliza en el hígado y los primeros productos son las dimetilxantinas.<sup>54</sup>

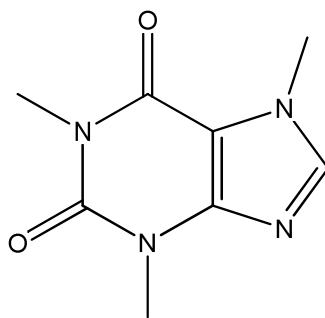
La cafeína es fisiológicamente el compuesto activo del café, que ha sido estudiado intensamente. Fue descubierto por Runge en 1820; su fórmula química de ésta purina es  $C_8H_{10}N_4O_2$  y su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina. El café contiene entre el 0,8 y 2,8 % de cafeína, dependiendo de la especie y su origen, y contribuye de un 10 a 30 % del sabor amargo de la bebida de café. Es indudable

<sup>53</sup> MACREA, R. In Coffee, Vol. 1: Chemistry; Clarke, R. J.; Macrea, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, U.K., 1985 p. 304

<sup>54</sup> MELGAREJO Martha. El verdadero poder de las bebidas energéticas. Revista Enfoque Alimentación N° 6 Diciembre. 2004 p. 1-6

que se pierda cierta cantidad de cafeína en el proceso de tostado.<sup>55</sup> La solubilidad de ésta en agua, depende de la temperatura y tiempo de extracción, encontrando que a temperatura cercana a ebullición, la solubilidad es máxima.<sup>56, 57</sup> Diferentes métodos de preparación de la bebida de café, hacen la diferencia en la cantidad final de ésta, donde la preparación por filtro la extrae en un 100% y la preparación por ebullición (hervor), la extrae en un 82%.<sup>58</sup> La cafeína es principalmente usada en bebidas no alcohólicas, pero también junto con agentes activos en medicamentos para dolores de cabeza, insuficiencia cardiaca, migraña o desorden del centro respiratorio.

Figura 6. Cafeína (1,3,7-trimetilxantina).



Fuente: CLARKE R. J. VITZTHUM O. G. 2001. Coffee Recent Developments.

El café *arábico* tiene un contenido más bajo de cafeína (0,6 – 1,5%) que el *robusta* (2,0 – 2,7%);<sup>59</sup> especie cultivada principalmente en Colombia, Centroamérica y Brasil.<sup>60</sup> Investigaciones reportan la extracción por diferentes métodos (extracción con fluidos supercríticos (EFS)<sup>61</sup> y Soxhlet usando acetato de etilo<sup>62</sup>).

### 2.1.7 Otros compuestos químicos en café tostado.

<sup>55</sup> CLARKE R, y Colaboradores, Op. cit., p. 108

<sup>56</sup> SPIRO, M, & C.M. Page. The kinetics and mechanism of caffeine infusion from coffee. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 46, No. 3. 1989 p. 349-356

<sup>57</sup> SPIRO, M. Modeling the aqueous extraction of soluble substances from ground roasted coffee. journal of the science of food and agriculture, (61) 3, 1993 p. 371–372

<sup>58</sup> PETERS, A. Brewing makes the difference. In: Proceedings of the 14<sup>th</sup> ASIC Colloquium (San Francisco), Paris, France. 1991 p. 97-106

<sup>59</sup> RAMIREZ T. P. Diseño de un sistema agroforestal basado en café robusta que incrementa la sustentabilidad, rentabilidad y equidad, en la amazonia ecuatoriana. Tesis. Chile 2005 p. 105 -192

<sup>60</sup> AGROBANCO. Área del desarrollo. Cultivo del café. Perú. 2007 p. 4

<sup>61</sup> MORENO, H. y Colaboradores. Obtención de cafeína a partir de café verde empleando CO<sub>2</sub> supercrítico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 2006 p. 1

<sup>62</sup> ORDÓÑEZ A, y Colaboradores. Estudio comparativo de la extracción de cafeína con CO<sub>2</sub> supercrítico y acetato de etilo. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 2006 p. 5



2.1.7.1 Carbohidratos. Durante el proceso de tuestión, el carbohidrato de peso molecular bajo más importante es la sacarosa, que rápidamente es degradada alcanzando concentraciones mínimas en café tostado normal. Se ha evidenciado en estudios, que en muestras de café *arábico* y robusta, la pérdida de sacarosa depende del grado tuestión, encontrándose pérdidas del 97 y 99% para grados de tuestión claro y muy oscuro, respectivamente.<sup>63</sup> La glucosa y fructosa, producto de la hidrólisis de la sacarosa, de igual manera se encuentran en mínimas concentraciones después del proceso de tuestión, por la degradación térmica.<sup>64</sup> A pesar de que la pared celular de la almendra de café es gruesa y es la responsable de muchos de los cambios químicos durante la tuestión, es inevitable la degradación de una gran fracción de polisacáridos.<sup>65</sup> Estudios anteriores en muestras de café robusta, indican la relativa labilidad de las unidades de azúcar en los polisacáridos, y se da en el siguiente orden: arabinosa > galactosa > manosa > glucosa.<sup>66</sup> El aumento en la solubilidad a 95°C, se incrementó de, 1g/100 g en café verde a 6g/100g en café tostado.<sup>67</sup> En café soluble comercial, se ha reportado contenidos promedios de: 0,004 – 0,666% de arabinosa, 0,000 – 0,137% de galactosa y 0,006 – 0,360% para manosa.<sup>68</sup> Es evidente que durante el proceso de tuestión, los polisacáridos sufren una reacción de reducción de azúcares, permitiendo la formación de monosacáridos en contenidos relativamente bajos.

2.1.7.2 Ácidos orgánicos. El perfil de acidez en el café tostado, depende básicamente del grado de tuestión.<sup>69</sup> Se ha encontrado concentraciones en café tostado de: 9, 5 y 4 g/kg de muestra, de ácido, cítrico, acético y láctico, respectivamente. Ácidos como itacónico, citracónico y mesacónico, son producto de la degradación del ácido cítrico, de igual forma la producción de ácidos maleíco y fumárico, son de degradación del ácido málico.<sup>70,71</sup> Los ácidos volátiles, que describen una clase de compuestos alifáticos con grupos funcionales carboxílicos, y pueden ser aislados de muestras de café por el método de extracción destilación simultánea (DES), y detectados por cromatografía de gases (GC). Muchos de

---

<sup>63</sup> TRUGO L.C., & R. Macrae, R. The use of the mass detector for sugar analysis of coffee products. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Lome), Paris, France. 1985 p. 245-251

<sup>64</sup> HUGHES W.J., & T.M Thorpe. Determination of organic acids and sucrose in roasted coffee by capillary gas chromatography. J. Food Sci., 52, 1987 p. 1078-1083

<sup>65</sup> WILSON A.J., , M. Petracco, & E. L. Some preliminary investigations of oil biosynthesis in the coffee fruit and its subsequent re-distribution within green and roasted beans. In: Proceedings of the 17<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Nairobi), Paris, France. 1997 p. 92-99

<sup>66</sup> THALER H., H. Structures of macromolecules in coffee. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Hamburg), Paris, France. 1975 p. 175-187

<sup>67</sup> LELOUP, V., & R. Liardon. Analytical characterization of coffee carbohydrates. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Montpellier), Paris, France. 1993 p. 863-865

<sup>68</sup> NOYES, R.M., & C, C.M. Material balance on free sugars in the production of instant coffee. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Montpellier), Paris, France. 1993 p. 577-582

<sup>69</sup> MARBROUK , A.F., & F.E Deatherage. Organic acids in brewed coffee. Food Tech, 10, 1956 p. 194-197

<sup>70</sup> BALZER, H. H. Acids in Coffee Kraft Foods. germany. 2001 p. 18-32

<sup>71</sup> BÄHRE, F., M, H.G. New non-volatile acids in coffee. Dtsche Lebensm.-Rundsch., 95, 1999 p. 399-402

estos ácidos volátiles contribuyen al perfil aromático de la bebida de café (rancio/sudoroso). Entre los más frecuentes están el ácido 2-, y/o 3-metilbutírico.<sup>72</sup> De igual manera el contenido de los ácidos volátiles decrece con el incremento del grado de tuestión.

2.1.7.3 Aminoácidos y proteínas. Compuestos involucrados en la formación del sabor y color de la bebida de café; características que afectan la intensidad y calidad del aroma.<sup>73</sup> Algunos aminoácidos son ampliamente transformados durante la tuestión, resultando cantidades insignificantes en cafés tostados, de manera similar, las proteínas se ven afectadas por las altas temperaturas, pero son menos lábiles que los aminoácidos libres.<sup>74</sup> La tuestión de café acelera la reacción de Maillard, así como la polimerización de los ácidos clorogénicos.<sup>75</sup>

## 2.2 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

2.2.1 Microextracción en fase sólida (SPME). La mayoría de los métodos tradicionales usados para el análisis de COVs en alimentos incluyen: destilación por vapor, técnica simultánea de destilación/extracción, extracción con solvente, muestreo del espacio de cabeza o *headspace* estático, purga y captura, extracción en fase sólida. Estos métodos tienen varios inconvenientes inclusive tiempos largos de preparación y el uso de solventes orgánicos.<sup>76</sup>

Una técnica novedosa de preparación de muestra, libre de disolvente y bastante más rápida, es la Microextracción en fase sólida (SPME) desarrollada a principios de los años 90 por el grupo de investigación de J. Pawliszyn.<sup>77</sup> Posteriormente, la compañía Supelco comercializó en 1993 el sistema SPME basado en una microjeringa reutilizable.

Las primeras fibras desarrolladas fueron recubiertas con Polidimetilsiloxano (PDMS) y Poliacrilato (PA), polímeros utilizados para la extracción. Hoy, el sistema

---

<sup>72</sup> HOLSCHER, W, y Colaboradores Identification and sensorial evaluation of aroma-impact-compounds in roasted colombian coffee. *Cafea, Cacao, Thea*, 34, 1990 p. 205-212

<sup>73</sup> HOMMA, S. Chemistry II: Non-volatile compounds, part II. Ochanomizu University. Tokyo. Japon. 2001 p. 50-89

<sup>74</sup> MACRAE R. Nitrogenous compounds. In: *Coffee, Vol. 1, Chemistry*. Elsevier Applied Science, London and New York 1985 p. 115-151

<sup>75</sup> HOFMANN, T. Influence of L-cysteine on the formation of bitter-tasting aminohexose reductones from glucose and Lproline: identification of a novel furo[2,3-b]thiazine. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999 p. 4763-4768.

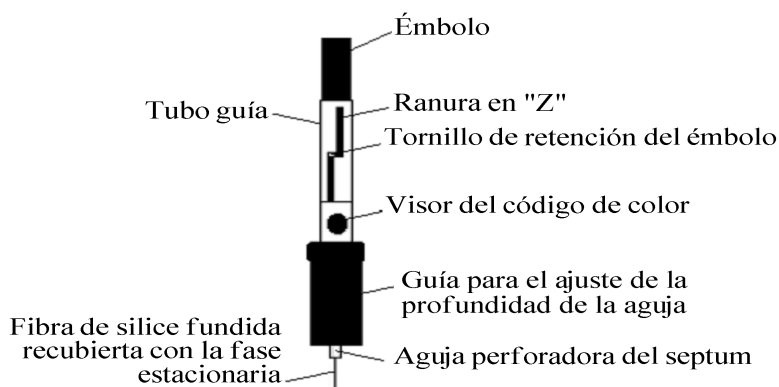
<sup>76</sup> AZODANLOU, R, y Colaboradores. A new concept for the measurement of total volatile compounds of food. *zLebensmuntersforsch A*. 208. 1999 p. 245-258

<sup>77</sup> PAWLISZYN, J. Applications of Solid Phase Microextraction. Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK, 1999 p. 655

manual de SPME, es un soporte semejante a una jeringa modificada donde se coloca la pequeña fibra de sílice fundida (ver figura 7). Las fibras polares son efectivas para extraer analitos polares, mientras que las apolares extraen analitos no polares. En la actualidad, los tipos de revestimiento disponibles presentes en las fibras pueden ser clasificados como no polares, semipolares y polares. Dichas fases extraen analitos volátiles, semivolátiles o no volátiles a partir de diferentes matrices.<sup>78</sup>

Existe dos formas de extracción posibles en SPME: Inmersión directa y extracción en espacio de cabeza o *headspace*. En la primer forma, se introduce la fibra directamente en la muestra, presentándose una relación, entre la cantidad de analito adsorbida por la fibra en el estado de equilibrio, y la concentración de éste en la muestra. En la segunda forma, los analitos son extraídos de la fase de vapor equilibrada en la muestra. Éstos necesitan ser transportados a la fracción volátil antes de ser absorbidos por la fibra. Esta extracción permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular y modificar la matriz de la muestra, como por ejemplo variando el pH, sin dañar la fibra.<sup>79</sup>

Figura 7. Dispositivo de Microextracción en fase sólida (SPME).



Fuente: MESTRES, M. y colaboradores. 2000. Aplicación de la Microextracción en fase sólida.

Los analitos volátiles se extraen más rápido que los semivolátiles, dado que los primeros se encuentran en una concentración más alta en el headspace que contribuye a tasas masivas más rápidas de transporte en dicho espacio. En general, los tiempos de equilibrio para compuestos volátiles son más cortos en este modo de extracción que en el de inmersión directa, debido principalmente a tres razones: a) una gran fracción de los analitos están presentes en la fase de vapor antes del comienzo de la extracción, b) existe normalmente una gran

<sup>78</sup> PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice; Wiley-VCH Inc.: New York, 1997 p. 247

<sup>79</sup> SANZ, C, y Colaboradores. Optimization Headspace Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee. J. Agr. Food Chem. 49: 2001 p. 1364-1367.

interfase entre la matriz de la muestra y el espacio de cabeza, y c) los coeficientes de difusión en la fase gas son generalmente más altos que en una líquida. Muchos autores coinciden que este tipo de muestreo, es uno de los métodos más populares y convenientes para el aislamiento y posterior estudio de compuestos volátiles. Por último, es importante porque su resultado en cuanto a la composición de la muestra en estudio representa de mejor forma el olor percibido por el ser humano.<sup>80</sup>

Varios estudios relacionados al análisis de los compuestos del café han sido reportados mediante el uso de esta técnica extractiva. Se ha desarrollado un método para diferenciar café tostado de diferentes orígenes, y aquellos que fueron sometidos a diferentes tratamientos tecnológicos, mediante la aplicación del análisis de los componentes principales (PCA) y usando perfiles cromatográficos obtenidos por SPME.<sup>81</sup> Se ha cuantificado cafeína en la bebida del café usando la combinación de técnicas SPME-GC-MS.<sup>82</sup> Se realizó, un estudio de comparación entre dos fibras de SPME para el análisis y clasificación de los compuestos volátiles presentes en café tostado y molido, usando el método PCA para la clasificación de estos compuestos; en el estudio se evaluaron los 30 picos mayoritarios de los compuestos, los resultados mostraron que la fibra Carbowax/DVB fue capaz de clasificar el café de acuerdo a su origen geográfico, mientras que la fibra Polidimetilsiloxano (PDMS) fue capaz de clasificarlos de acuerdo a su variedad: *arábico* o *robusta*.<sup>83</sup> Se identificaron de 37 compuestos volátiles en bebidas de café (mezcla de café *arábicos* y *robustas*) utilizando la combinación de técnicas SPME-GC-MS.<sup>84</sup>

2.2.1.1 Parámetros de optimización. El desarrollo de un procedimiento para la determinación del analito(s) por medio de SPME-GC-MS, usualmente requiere la optimización de una serie de variables. Para mostrar la viabilidad, inicialmente se optimizan las condiciones experimentales del análisis extractivo (fibra, temperatura y tiempo). Variables importantes tenidas en cuenta, porque pueden afectar el grado de adsorción de los analitos a la fibra.<sup>85</sup>

- Tipo de fibra La selección de la fibra se basa en la mayor cantidad de compuestos adsorbidos por ella y en la evaluación del tipo de fase estacionaria

---

<sup>80</sup> Ibid., p. 1369.

<sup>81</sup> BICCHI, C. P, y Colaboradores. Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid Phase Microextraction. J. Agric. Food Chem. 45: 1997 p. 4680-4686.

<sup>82</sup> YANG, M. J, y Colaboradores. Quantitative Determination of Caffeine in Beverages Using a Combined SPME-GC/MS Method. J. Chemical Education. 74(9): 1997 p. 1130-1132.

<sup>83</sup> COSTA Freitas, A. M.; y Colaboradores. Comparison of Two SPME Fibers for Differentiation of Coffee by Analysis of Volatile Compounds. Chromatographia. Nov. 54 (9/10): 2001 p. 647-652.

<sup>84</sup> ROCHA, S, y Colaboradores. Screening and Distinction of Coffee Brews based on Headspace Solid Phase Microextraction/ Gas chromatography Principal component analysis. J.Sci. Food Agric. 84: 2003 p. 43-51.

<sup>85</sup> ROJAS Gina M E. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de Microextracción en fase sólida y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas. Universidad de Puerto Rico. 2005 p. 40-44

contenida en cada fibra. Las fibras de PDMS, es un polímero líquido, las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para SPME. Son las más adecuadas para los analitos apolares aunque, en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos con cierta polaridad. La afinidad de los analitos por el PDMS puede ser estimada, a partir de los tiempos de retención de los compuestos en las columnas de PDMS, ya que el polímero que compone las fibras de PDMS, y estas columnas capilares, es básicamente el mismo. En general, se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, como de 100 µm, para compuestos con coeficientes de partición bajos, y de poco espesor para los que presenten coeficientes de partición elevados.<sup>86</sup> La fibra PDMS ha logrado extraer 33 y 19 COVs, en café *arábico* y *canéfora*, respectivamente.<sup>87</sup>

Las fibras que combinan más de un polímero (CW/DVB y DVB/CAR/PDMS), son adecuadas para la determinación de analitos volátiles, a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, por ser polímeros sólidos.<sup>88</sup> Generalmente, en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las fibras de PDMS. La fibra CW/DVB ha extraído 53 y 46 COVs en café *arábico* y *canéfora*, respectivamente.<sup>89</sup> Los resultados indican, que ninguna de las dos fibras permitió la diferenciación entre las dos especies de cafés.

Estudios han indicado que la fibra que extrae la mayor cantidad de compuestos volátiles es la DVB/CAR/PDMS en muestras de café *arábico*, esta fibra logró extraer 76 compuestos volátiles y en la muestra de café *canéfora* 64 COVs. De igual manera, la fibra DVB/CAR/PDMS, ha permitido una mejor distinción entre los compuestos volátiles encontrados en las dos especies de cafés analizadas. Caso contrario sucede con las fibras CW/DVB y PDMS. Además, la fibra DVB/CAR/PDMS permite la extracción de compuestos con abundancias superiores en comparación con las otras dos fibras.<sup>90</sup>

- Temperatura de extracción. Los resultados indican, que existe mayor cantidad de compuestos volátiles, en muestras al suministrarles calor. Pawliszyn, ha estipulado que para este modo de extracción de analitos (HS-SPME): un aumento en la temperatura de extracción, ayuda a una rápida extracción y conduce a un aumento en la concentración de los analitos".<sup>91</sup> La temperatura de 90°C, no es apropiada debido a que se ha encontrado cafeína (compuesto no volátil constituyente del café, como parte de los compuestos identificados a un tiempo de

---

<sup>86</sup> ALPENDURADA, M.F., J. Chromatography. J.Sci. Food Agric. 889. 2000 p. 3

<sup>87</sup> ROJAS Gina M E, Op. cit., p. 40

<sup>88</sup> GORECKI, T., X.M. XU, J. PAWLISZYN, Analyst, J. Agr. Food Chem. 124. 1999 p. 643

<sup>89</sup> ROJAS Gina M E, Op. cit., p. 41

<sup>90</sup> Ibid., p. 43

<sup>91</sup> PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction, Op. cit., p. 249

retención de 34,04 minutos).<sup>92</sup> Se ha encontrado que la temperatura de 30°C de extracción es una de las más adecuadas para este tipo de extracción de compuestos volátiles de café. Por ser la temperatura promedio que refleja las condiciones de almacenamiento del café tostado y molido en torrefactoras.<sup>93</sup>

- Tiempo de extracción. Luego de optimizar el tipo de fibra y la temperatura de extracción, se optimiza el tiempo de extracción requerido para llegar al estado de equilibrio entre la fibra y los compuestos volátiles de la muestra.

Se han estudiado diferentes tiempos de extracción (10, 30, 60 y 90 min). El aumento de los compuestos volátiles se da a medida que transcurre el tiempo de exposición. El equilibrio se ha alcanzado a los 60 min, en tiempos superiores se ha evidenciado una disminución en cuanto a su abundancia.<sup>94</sup> Un estudio realizado reporta que después de que la fibra alcanza el equilibrio, la cantidad de extractos empieza a disminuir. Se sugirió, que la razón de este comportamiento, se debe a que los compuestos son liberados por la fibra luego de su equilibrio.<sup>95</sup>

2.2.2 Destilación extracción simultanea (DES). Esta técnica de extracción, es ampliamente utilizada para el aislamiento y concentración de compuestos volátiles en una gran variedad de muestras acuosas.<sup>96</sup> Likens y Nickerson (1964), diseñaron un equipo para la extracción destilación simultánea (DES). En este equipo (ver figura 13), un concentrado acuoso del producto se introduce en un matraz conectado a un sistema de refrigeración, frente a él, otro matraz es conectado al mismo sistema pero conteniendo el disolvente. Los matraces se calientan separadamente y los vapores de agua y de disolvente condensan juntos en la sección central de refrigeración. Consecuentemente, las fases de agua y disolvente inmiscibles, quedan separadas en la sección en forma de U, recirculando cada fase a su respectivo matraz. El resultado es una destilación continua, que sólo requiere un pequeño volumen de disolvente para la extracción de muestras, incluso de cierto tamaño.<sup>97</sup>

2.2.3 Extracción con solventes. Con la extracción sólido-líquido se puede extraer componentes solubles de sólidos con ayuda de un disolvente. Un ejemplo de la vida cotidiana es la preparación de la infusión de café. En este proceso, la

---

<sup>92</sup> ILLY A, R Viani. , Op. cit., p. 255

<sup>93</sup> ROJAS Gina M E, Op. cit., p. 81

<sup>94</sup> Ibid., p. 48

<sup>95</sup> COSTA Freitas, A. M.; y Colaboradores, Op. cit., p. 649

<sup>96</sup> BLANCH, M M, G P. y colaboradores. Dispositivo para la separación y concentración de componentes volátiles de muestras termosensibles por destilación y extracción simultanea mediante disolventes orgánicos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Serrano, Madrid, ES. 16.12.1993 p. 2

<sup>97</sup> JORDÁN B María J. Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. efecto del procesado industrial. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Universidad de Murcia. 1999 p. 56-57

sustancia aromática del café (soluto) se extrae con agua (disolvente) del café molido (material de extracción, formado por la fase portadora sólida y el soluto). En la práctica, al término de la extracción, la fase portadora sólida siempre contendrá todavía una parte del soluto en el sólido. Además, una parte del disolvente permanecerá también ligada de forma adsorbato a la fase portadora sólida.

Para conseguir una extracción lo más rápida y completa posible del sólido, se tiene que ofrecer al disolvente superficies de intercambio grandes, y recorridos de difusión cortos. Esto se puede lograr triturando el sólido a extraer. Un tamaño de grano demasiado pequeño puede causar, por el contrario, un apelmazamiento que dificulta el paso del disolvente.<sup>98</sup>

## 2.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS

2.3.1 Cromatografía de gases (GC). Keulemans ha definido la GC como método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través, o a lo largo de la fase estacionaria.<sup>99</sup>

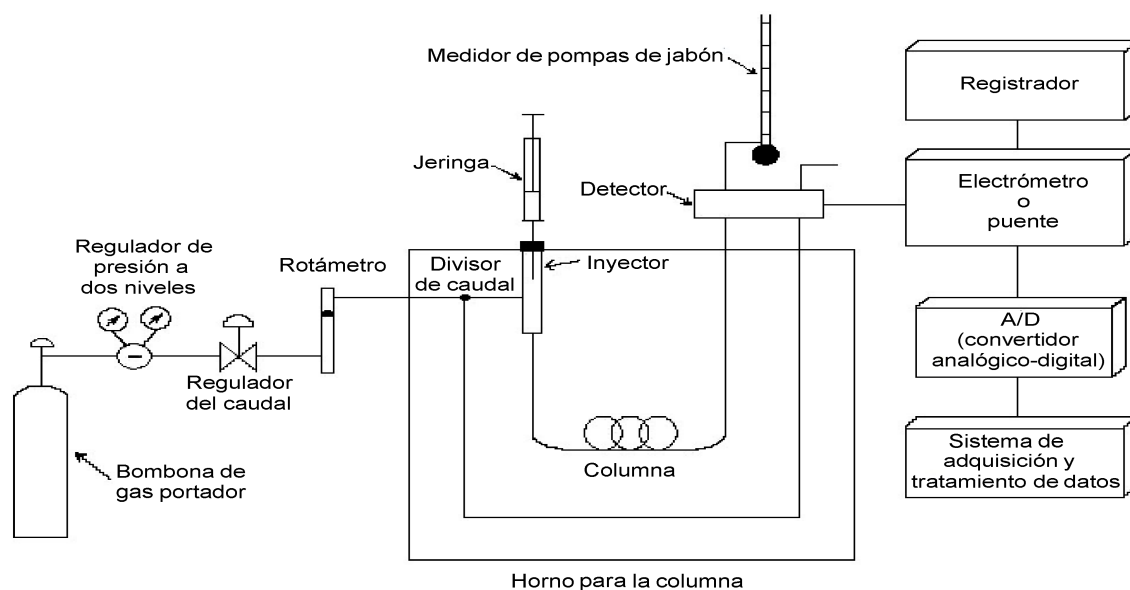
En GC, la fase estacionaria es sólida, mientras que la fase móvil es un gas (Nitrógeno, Helio o Hidrógeno) que circula en contacto con la fase estacionaria. La muestra se vaporiza en el sistema de inyección y es transportada por la fase móvil a través de la columna. El reparto de los componentes de la muestra con la fase estacionaria, se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada. Por lo tanto, los componentes de la mezcla se separan de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria. Las aplicaciones de esta técnica analítica en el estudio de los productos naturales, específicamente de los compuestos volátiles son innumerables.

Figura 8. Esquema de un cromatógrafo de gases.

---

<sup>98</sup> LOWRY, O.H. N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. R. J. Biol. Chem. 193: 1951 p. 265-275

<sup>99</sup> CORTÉS. Rubén. Cromatografía de gases, disponible en Internet:  
[www.relap.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/gas.htm](http://www.relap.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/gas.htm).



Fuente: Douglas, A, Skoog y colaboradores. 2001. principios de análisis instrumental.

2.3.2 Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS). La espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS) es una espectroscopia de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. La radiación adsorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. La espectroscopia UV-VIS se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.<sup>100</sup>

Los usos analíticos de la espectrofotometría UV-VIS, son muchos y muy variados. Estudios indican que para cuantificar la cafeína contenida en extractos de café se ha realizado una curva patrón con ocho valores distintos de concentración de cafeína 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 y 10.0 partes por millón (ppm), las lecturas de absorbancia se efectuaron a una longitud de onda de 273 nm, empleando un Espectrofotómetro UV. La totalidad de extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico presentaron un rendimiento superior a 1,3 g de cafeína por kg de café.<sup>101</sup>

### 3. METODOLOGÍA

<sup>100</sup> VERDE, C. José, R, y Colaboradores. Manual de prácticas de química analítica. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 1999 p, 78-84

<sup>101</sup> ORDÓÑEZ A, y Colaboradores, Op. cit., p. 8



### 3.1 PLAN EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS

Se tomó muestras de café *arábico*, procedente de las tres (3) zonas cafeteras del departamento de Nariño (ver figura 9). Para estimar la muestra adecuada y que cumpla con las especificaciones requeridas, se procedió a realizar un muestreo aleatorizado para cada zona cafetera.

3.1.1 Modelo del muestreo. El modelo desarrollado que garantizó la obtención de una muestra representativa y homogénea, y se aplicó dentro del proyecto de café denominado, “Estudio exploratorio físico-sensorial de café pergamino (*Coffea arábica*)”,<sup>102</sup> radicó básicamente en la toma de muestras en campo, mediante un muestreo de cada saco del lote, dicha muestra se homogenizó y por el método de cuarteo se escogió la muestra representativa de 1000 g, con un grado de humedad entre 10 – 12%. La muestra se almacenó en bolsa plástica con cierre hermético, de calibre dos y etiquetado con los siguientes datos: nombre del caficultor, cédula de ciudadanía, nombre de la finca, municipio, vereda, tipo de exposición, altitud y variedad de café. Para ser llevadas posteriormente al Laboratorio del Café, de la Gobernación de Nariño.

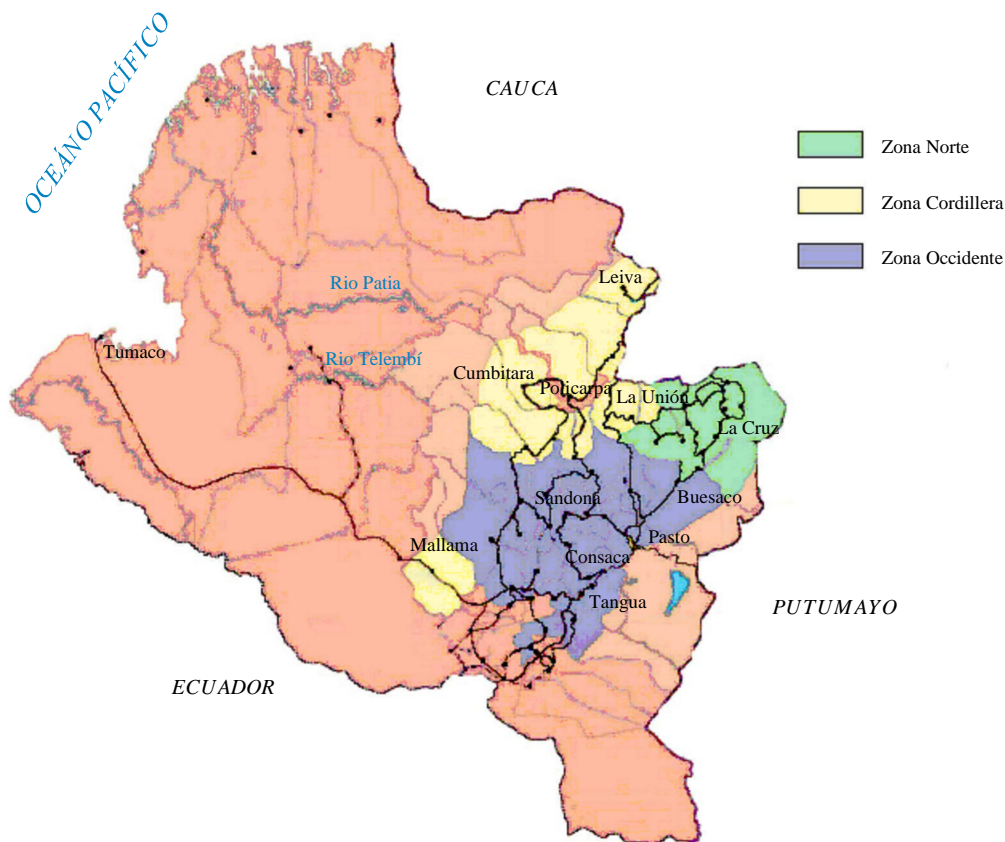
3.1.2 Modelo del muestreo para análisis químicos. Se realizó una toma de muestras aleatoria simple, con el fin de obtener una muestra homogénea y representativa para el Laboratorio del Café. A partir de 800 g de muestra de café, se procedió a aplicar el método conocido como apilar y dividir en cuartos.<sup>103</sup> Se tomó muestras de 200 g de cada uno de los cuartos (norte, sur, este y oeste), estas muestras se apilaron y dividieron en cuartos, se seleccionó cuartos opuestos y nuevamente se apiló y se repitió el proceso hasta obtener una muestra de ensayo de 100 g de café adecuada para trabajar en el Laboratorio del Café.

Figura 9. Zonas cafeteras del departamento de Nariño.

---

<sup>102</sup> \*GOBERNACION DE NARIÑO. Estudio exploratorio físico-sensorial de café pergamino (*Coffea arábica*). 2008

<sup>103</sup> RUBINSON. K, R. J. Análisis Instrumental. Ed, Prentice Hall. España. 2001 p. 70



Fuente: Gobernación de Nariño. 2009. características sensoriales del café producido en el departamento de Nariño por regiones.

3.1.3 Preparación de la muestra de ensayo de café para análisis químicos. La muestra de ensayo de café pergamino de 100 g, se sometió a un proceso de preparación: inicialmente se retiró corácea, fibrosa, de color amarillo-oro que protege la almendra, denominada el pergamino del café; a través de un equipo de trilla marca Quantik, modelo C-200. Seguidamente se pasó el café almendra obtenido de la trilla, a través de un juego de mallas de separación de rango 0-18 marca Quantik, tomando muestras de la malla N° 14, al café seleccionado por este proceso, se le determinó la humedad, por medio del équido detector de humedad marca Quantik N° 5308-224, cuyo rango fue de 10 – 12%. Posteriormente se llevó la muestra de café al equipo de tosti3n marca Quantik y se realizó la tosti3n en curva, con condiciones de 200 – 145 – 205 °C por un periodo de tiempo de 8 minutos. Seguidamente se enfri3 el producto y se llev3 a molienda utilizando un molino marca Grindmaster modelo 810, el cual se acondicion3 a molienda grado expreso. Finalmente se pes3 y envas3 en recipiente pl3stico de capacidad de 100 g sellado con parafilm, y se almacen3 a temperatura de 4 °C, para posteriores an3lisis qu3micos.

Las especificaciones finales de la muestra de ensayo de café, se resumen en la Tabla 3 y el proceso de preparaci3n de la muestra de ensayo de café tostado y

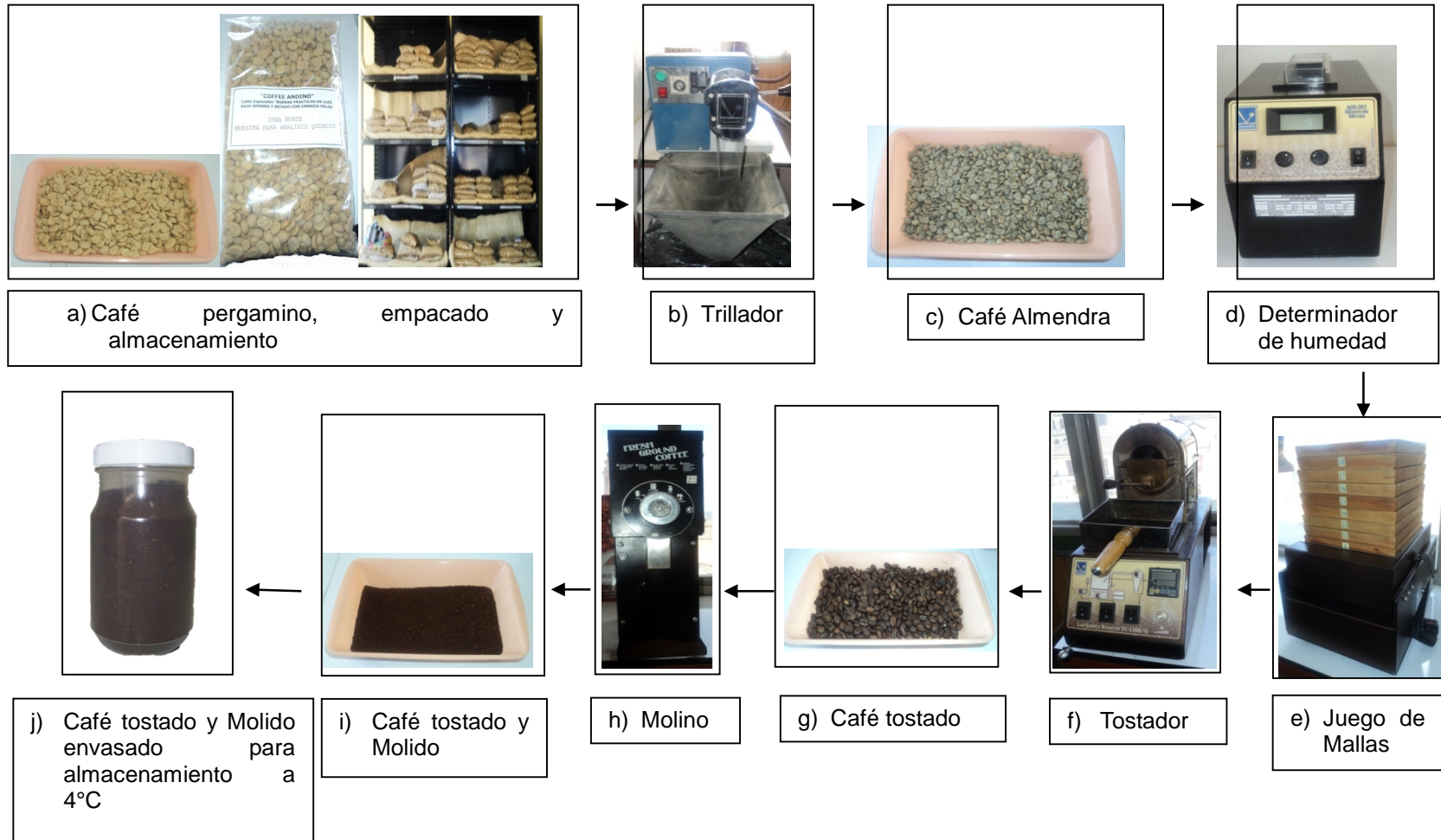
molido, se detalla en la figura 10.

Tabla 3. Características de la muestra de ensayo de café arábico.

Café del departamento de Nariño	
Especie	<i>Arábico</i>
Variedad	<i>Caturra y Castillo</i>
Origen	Norte, Occidente y Cordillera
Humedad	10 – 12 %
Grado de tostión	Curva 200 – 145 – 205 °C
Grado de molienda	Expresso
Intensidad de color	46,58 Agtron E10

Fuente: Estudio exploratorio físico-sensorial de café pergamino (*Coffea arábica*).

Figura 10. Proceso de preparación de la muestra de ensayo de café para análisis químicos



Fuente: Laboratorio del café. Gobernación de Nariño. 2009.

### 3.2 MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS QUÍMICOS.

Las técnicas analíticas de extracción y de análisis, realizados en el presente trabajo fueron desarrollados en diversos laboratorios pertenecientes a la Universidad de Nariño (Laboratorio del Grupo de Investigación de Productos de Importancia Biológica (GIPIB) – Laboratorios Especializados secciones de Cromatografía y Espectroscopía), y Gobernación de Nariño (Laboratorio del café).

#### 3.2.1 Material general de laboratorio.

- Micropipetas automáticas Transferpette de volumen variable (100 – 1000  $\mu$ L).
- Balanzas: balanza Adventured modelo 125.
- Agitadores: agitadores magnéticos Agimatic-N (P-Selecta).
- Planchas de calentamiento: plancha de calentamiento CORNING PC-4200.
- Equipos de extracción: equipo de destilación extracción simultanea (DES) de 250 mL – sistemas de reflujo de 100 mL – fibras de SPME Supelco ref.: Carboxen/PDMS 75  $\mu$ m, PDMS/DVB 65  $\mu$ m y DVB/Carboxen/PDMS 30  $\mu$ m.
- Equipos de análisis: cromatógrafo de gases Shimadzu GC17A, acoplado a un detector de ionización en llama (FID) – Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11, de rango de señal 190-900 nm.

3.2.2 Productos consumibles y reactivos químicos. Los productos químicos utilizados en todos los procesos fueron reactivos para análisis: metanol HPLC. – estándar de ácido tánico puro Sigma-Aldrich 16201 – estándar de cafeína puro Fluka – El agua empleada en la preparación de las disoluciones en los análisis, fue destilada en los equipos de los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño.

### 3.3 EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA EN CAFÉ ARÁBICO.

3.3.1 Extracción de cafeína de la muestra de ensayo de café tostado y molido. Se pesó 1 g de café tostado y molido, se colocó en un balón de fondo plano de 100 mL, al cual se le adicionó 60 mL de agua y se llevó ebullición en un sistema de reflujo, por 30 minutos con agitación constante (figura 11). Para eliminar los taninos, se adicionó 2,5 mL de HCl 0,01 M, seguido por 0,5 mL de  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  2 M, posteriormente se filtró. Al filtrado se adicionó 0,3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 M, para eliminar el exceso de Plomo por filtración. Finalmente se aforó a 100 mL, de esta solución se tomó una alícuota de 1 mL y se aforó a 25 mL, se tomó una alícuota

de 15 mL de la solución anterior y se aforó a 25 mL (este proceso se realizó por triplicado).<sup>104</sup> Esta solución final (C) se almacenó para posterior análisis espectrofotométrico.

Figura 11. Montaje para extracción de cafeína.



Fuente: esta investigación

3.3.2 Preparación de recta de calibrado para cafeína. Se preparó seis (6) patrones de cafeína con concentraciones conocidas, a partir de un estándar de cafeína pura marca Fluka referencia 27600, las especificaciones de la preparación de las soluciones patrón de cafeína se describen en la Tabla 4. Inicialmente se preparó una solución patrón stock de una concentración de 2000 mg/L, a partir de la cual se procedió a preparar las demás soluciones patrón, utilizando la ecuación de dilución (1).

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

$C_1$  = concentración inicial (solución patrón de cafeína [2000 mg/L]).

$V_1$  = alícuota usada (mL).

$C_2$  = concentración final (soluciones patrón de cafeína [mg/L]).

$V_2$  = volumen total (volumen final hasta aforo de 100 mL).

<sup>104</sup> SUTEERAPATARANON Siripat, y Colaboradores. Caffeine in Chiang Rai tea infusions: Effects of tea variety, type, leaf form, and infusion conditions. Food Chemistry, 114. 2009 p. 1335–1338.

Tabla 4. Especificaciones de la recta de calibración para cafeína.

*Solución Patrón	Volumen (mL) de Solución de cafeína [2000 mg/L]	Volumen final (mL)	Concentración final (mg/L)
1	0,1	100	2
2	0,2	100	4
3	0,3	100	6
4	0,4	100	8
5	0,5	100	10
6	0,6	100	12

\* Cada punto se preparó por triplicado en balones volumétricos de 100 mL grado "A".  
Fuente: esta investigación.

3.3.3 Análisis cuantitativo de cafeína en muestra de ensayo de café tostado y molido. La solución final (C), de café tostado y molido procedente de las variedades *Castillo* y *Caturra*, y las soluciones patrón de cafeína, se les determinó las absorbancias a una longitud de onda de 272,8 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11, de rango de señal 190-900 nm.

Figura 12. Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11.



Fuente: Sección de Laboratorios Especializados. Universidad de Nariño.

### 3.4 EXTRACCIÓN DE TANINOS TOTALES EN CAFÉ ARÁBICO.

3.4.1 Extracción de taninos totales en muestra de ensayo de café tostado y molido.<sup>105</sup> Se pesó 5 g de café tostado y molido, se colocó en un balón de fondo plano de 100 mL, al cual se le adicionó 90 mL solución de metanol – agua en

<sup>105</sup> RICCO Rafael A, y Colaboradores. Taninos condensados de *Ephedra Chilensis* K. Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires, República Argentina. 2002 p. 2

relación 1:1, se llevó a un sistema de baño de hielo y agitación constante por 3 horas, posteriormente se filtró, este proceso se repitió lo suficiente hasta “eliminar” (minimizar) los sólidos suspendidos. Finalmente se aforó a 100 mL con solución de metanol – agua en relación 1:1, esta solución final (T) se refrigeró a 4°C para posterior análisis espectrofotométrico.<sup>106</sup>

3.4.2 Análisis cualitativo de taninos totales en muestra de ensayo de café tostado y molido.<sup>107</sup> Se preparó tres tubos de ensayo, se adicionó por separado 2 mL de soluciones de: “muestra de ensayo de café”, “blanco” y “referencia de ácido tánico al 10%” respectivamente. A cada tubo de ensayo se adicionó para prueba colorimétrica, 5 gotas de cloruro férrico,  $\text{FeCl}_3$ , al 5% en ácido clorhídrico 0,5 M. Y para prueba de precipitación, se adicionó a cada tubo 1 mL de acetato de plomo,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10%.

3.4.3 Análisis cuantitativo de taninos totales en muestra de ensayo de café tostado y molido. De la solución final (T), se tomó una alícuota de 1 mL y se aforó a 50 mL. En un balón volumétrico de 10 mL, se adicionó, una alícuota de 1 mL de la solución anterior, 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y dejó en reposo por 2 horas, posteriormente se adicionó 2 mL de carbonato de sodio al 20%, se agitó y dejó reposar por 30 minutos, finalmente se aforó (Este proceso se realizó por triplicado).<sup>108</sup> Esta solución final se le determinó la absorbancia a una longitud de onda de 754,4 nm.<sup>109</sup> Utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11, de rango de señal 190-900 nm (ver figura 12).

3.4.4 Preparación de recta de calibrado para taninos totales.<sup>110</sup> Se preparó cinco (5) soluciones patrón de concentraciones conocidas, a partir de un estándar de ácido tánico puro Sigma-Aldrich 16201, las especificaciones de la preparación de las soluciones patrón de ácido tánico se describen en la Tabla 5. Inicialmente se preparó una solución patrón stock de ácido tánico de 200 mg/L, a partir de la cual se procedió a preparar las soluciones patrón, utilizando la ecuación de disolución (2).

---

<sup>106</sup> CAMUSSONI Georgina y C. E. Determinación comparativa del contenido de polifenoles en vinos tintos de origen argentino. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Argentina. 2004 p. 151-159

<sup>107</sup> VELASQUEZ V. Ángela M. Extracción de taninos presentes en el banano de rechazo. Revista Lasallista de investigación. 2006 p. 8-14

<sup>108</sup> VELASQUEZ V. Ángela M. Extracción de taninos presentes en el banano verde. Revista Lasallista de investigación. 2005 p. 17-22

<sup>109</sup> LASTRA V, Humberto y Colaboradores. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Rev Cubana Plant Med, 5(1), 2000 p. 17-22

<sup>110</sup> BOULEVARD, W.. Official methods of analyses 955.35 of the association of official agricultural chemists (AOAC). 1995 p. 14



$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Ecuación 2

Dónde:

$C_1$  = concentración inicial (solución patrón de ácido tánico [200 mg/L]).

$V_1$  = alícuota usada (mL).

$C_2$  = concentración final (soluciones patrón de ácido tánico [mg/L]).

$V_2$  = volumen total (volumen final hasta aforo de 10 mL).

Tabla 5. Especificaciones de la recta de calibración para taninos totales.

*Solución Patrón	Volumen (mL) de Solución de ácido tánico [200 mg/L]	Volumen final (mL)	Concentración final (mg/L)
1	0,8	10	16
2	1,2	10	24
3	2,0	10	40
4	3,5	10	70
5	5,0	10	100

\* Cada punto se preparó por triplicado en balones volumétricos de 10 mL grado "A".

Fuente: esta investigación

En cinco (5) balones volumétricos de 10 mL se adicionó, 1 mL de solución patrón de ácido tánico, 1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu, se agitó y dejó en reposo por 2 horas, posteriormente se adicionó 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 %, se agito y dejó reposar por 30 minutos. Finalmente estas soluciones patrón de ácido tánico, se enrazaron con agua destilada, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 754,4 nm. Utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11, de rango de señal 190-900 nm (ver figura 12).

### 3.5 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CAFÉ ARÁBICO.

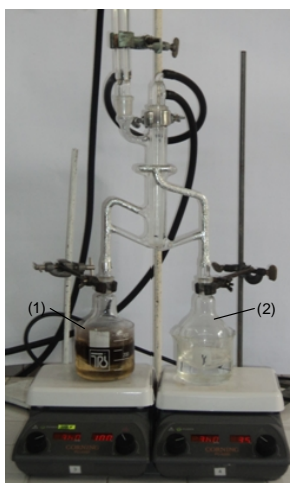
3.5.1 Técnica destilación extracción simultanea (DES). Para la extracción de COVs por la técnica de extracción destilación simultánea (DES), se tomó 8 g de muestra de ensayo de café *arábico*, se llevó a un balón de 250 mL (1), se adicionó 150 mL de agua destilada y se homogenizó. En el otro balón de 250 mL (2), se adicionó 9 mL de Diclorometano, el montaje se especifica en la figura 13. Todo el sistema se llevó a calentamiento y agitación constante, para cada proceso, las especificaciones se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Especificaciones de extracción técnica DES.

Resumen del Diseño.	
Clase del diseño	Categorico de único Factor
Número de extracciones	12 aleatorizadas
Factor experimental	Tiempo
Niveles experimentales	30, 60, 90 y 120 minutos
Variable de respuesta	Número de COVs

Fuente: esta investigación, paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI Para Windows. Versión 15.2.06

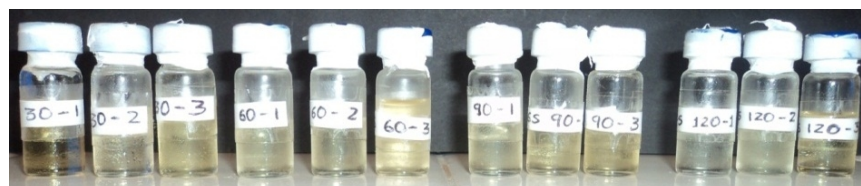
Figura 13. Montaje técnica destilación extracción simultanea (DES).



Fuente: Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica (GIPIB).

El extracto (COVs y Diclorometano) se llevó a concentración, utilizando un rotaevaporador marca Heidolph, con sistema de vacío y un baño de agua de 20°C, se mantuvo el proceso hasta obtener un volumen final de 1,5 mL, (ver figura 14) que se almacenó a 4°C para posterior análisis cromatográfico.

Figura 14. Extractos obtenidos por la técnica DES.



Fuente: esta investigación

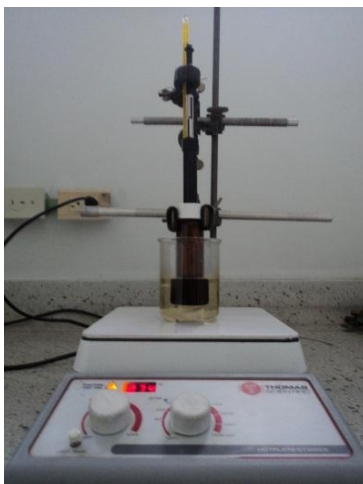
3.5.2 Técnica Microextracción en fase solida (SPME). La técnica de Microextracción en fase solida de espacio de cabeza (HS-SPME), fue utilizada para la extracción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) de la muestra de ensayo de café arábico variedades *Caturra* y *Castillo*. Se tomó 5 g de muestra de ensayo de café tostado y molido, se llevó a un vial de 40 mL con septa de goma de cierre hermético. Con las fibras (3) de SPME previamente acondicionadas a los parámetros de análisis del cromatógrafo de gases, se perforó la septa de goma y se llevó a un sistema de calentamiento y agitación constante para cada extracción, el montaje se detalla en la figura 15. Las especificaciones de extracción y el diseño estadístico se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Especificaciones de extracción técnica HS-SPME.

Resumen del Diseño.		
Clase del diseño	Superficie de respuesta	Factorial completo de 3 Factores a 3 niveles
Número de extracciones	54 aleatorizadas	
Factores experimentales	Temperatura Tiempo Fibra	3 niveles (30, 60 y 90 °C) 3 niveles (20, 40 y 60 minutos) 3 niveles (DVB/Carboxen/PDMS, PDMS/DVB y Carboxen/PDMS)
Variable de respuesta	Número de COVs	

Fuente: esta investigación: paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI para Windows. Versión 15.2.06

Figura 15 . Montaje técnica Microextracción en fase sólida (SPME).



Fuente: Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica (GIPIB).

### 3.6 TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICOS DE COMPUESTOS VOLÁTILES.

Los compuestos orgánicos volátiles extraídos por Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME), y destilación extracción simultanea (DES), se analizaron en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC17A, acoplado a un detector de ionización en llama (FID) (ver figura 16). Columna cromatográfica polar, DB-wax, fase estacionaria poli-etileno-glicol, 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ . Con condiciones del gas de arrastre (He): presión 134 kPa, velocidad lineal de 40cm/seg., flujo interno 1ml/min, razón Splitless/Split (closed 0,5 min). Con programación de temperatura de 40°C (5min) @ 4°C/min hasta 230°C, para un tiempo total de corrida de 62 minutos. Para la desorción de los compuestos orgánicos volátiles extraídos por HS-SPME se aplicó un tiempo de 5 minutos a 270 °C.

Figura 16. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC17A.



Fuente: Laboratorios especializados. Universidad de Nariño.

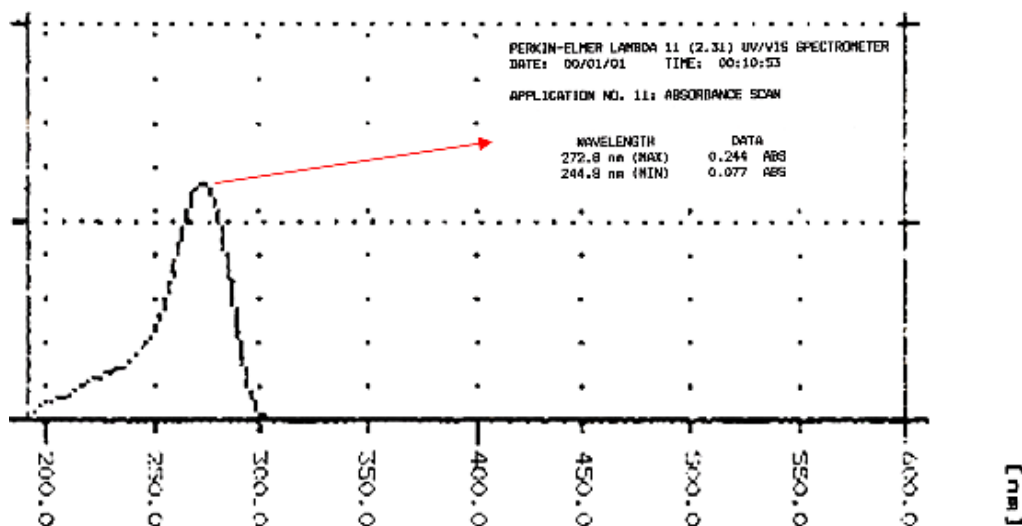
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA EN CAFÉ ARÁBICO.

La cuantificación de cafeína por la técnica de análisis de espectrofotometría (UV-VIS), se realizó mediante el proceso de establecer una concentración desconocida de un compuesto a partir de una solución conocida. Implicó preparar una serie de soluciones patrón con concentraciones conocidas de la solución estándar de cafeína, para su detección por el espectrofotómetro. Los resultados (absorbancias) de estas concentraciones dieron una serie de datos que se correlacionan con la concentración de cafeína en la muestra de ensayo de café, es decir, las absorbancias de cada solución patrón, tendrán una relación lineal con la concentración de esta, lo que originó una recta de calibrado absoluta.

4.1.1 Determinación de la longitud de onda fija y adecuada. Se empleó un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11, de rango de señal 190 – 900 nm para determinar la longitud de onda más adecuada para las lecturas de las absorbancias de las soluciones patrón de cafeína, como para las muestras de ensayo de café. Con la solución patrón 2 (4 mg/L), se realizó un barrido por toda la región ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro, lo cual originó el siguiente espectro de absorción, gráfica 2.

Gráfica 2. Espectro de solución patrón de cafeína.



Fuente: Esta investigación.

La cafeína presentó su mayor absorción a una longitud de onda de 272,8 nm, que es adecuada y fija para los análisis de las soluciones patrón de cafeína y las muestras de ensayo de café.

4.1.2 Recta de calibrado. Los datos de las absorbancias a partir de las soluciones patrón de cafeína se especifican en la Tabla 8.

Tabla 8. Absorbancias a partir de las soluciones patrón de cafeína a 272,8 nm.

*T	Concentración Teórica de patrones de Cafeína [ppm]	Lecturas de absorbancias				s	% CV	IC 95 %
		1	2	3	Promedio			
T1A	2	0,130	0,128	0,133	0,130	0,0025	1,931	0,126 – 0,139
T1B		0,131	0,135	0,134	0,133	0,0021	1,561	
T1C		0,135	0,137	0,133	0,135	0,0020	1,481	
T2A	4	0,236	0,232	0,234	0,234	0,0020	0,855	0,228 – 0,243
T2B		0,236	0,235	0,232	0,234	0,0021	0,888	
T2C		0,239	0,240	0,237	0,239	0,0015	0,640	
T3A	6	0,335	0,338	0,332	0,335	0,0030	0,896	0,324 – 0,339
T3B		0,328	0,327	0,333	0,329	0,0032	0,976	
T3C		0,331	0,329	0,333	0,331	0,0020	0,604	
T4A	8	0,433	0,430	0,425	0,429	0,0040	0,941	0,420 – 0,433
T4B		0,423	0,421	0,428	0,424	0,0036	0,850	
T4C		0,427	0,430	0,423	0,427	0,0035	0,823	
T5A	10	0,541	0,536	0,537	0,538	0,0026	0,492	0,521 – 0,546
T5B		0,525	0,528	0,532	0,528	0,0035	0,665	
T5C		0,533	0,537	0,531	0,534	0,0031	0,572	
T6A	12	0,628	0,631	0,626	0,628	0,0025	0,401	0,618 – 0,645
T6B		0,628	0,626	0,633	0,629	0,0036	0,573	
T6C		0,639	0,635	0,642	0,638	0,0033	0,510	

\*T: Tratamiento igual para todos los análisis, por triplicado y en diferentes días de análisis.

Fuente: esta investigación

A partir de los datos obtenidos se define los parámetros estadísticos que garantizan la validación del método espectrofotométrico UV-VIS.

4.1.2.1 Precisión. La precisión de los datos se representada estadísticamente, tomando los intervalos de confianza al 95 % y la desviación estándar relativa (Coeficiente de Variación) expresado en porcentaje, indica la variabilidad, dispersión de los datos y la repetibilidad que tiene el método. Donde se puede apreciar porcentajes de coeficientes de variación (% CV) e intervalos de confianza

(IC 95%), aceptables dentro de la técnica de análisis, indicando que la lectura real de las absorbancias está dentro del rango con una probabilidad del 95%. El cálculo de la desviación estándar (s) para los datos reportados, indica el grado de dispersión de cada una de las lecturas de absorbancias con respecto a la media de estas.

4.1.2.2 Exactitud. A partir de los promedios de las absorbancias, de cada solución patrón de cafeína, se construyó rectas de calibrado (3), a partir de las cuales se calculó las concentraciones experimentales, permitiendo verificar el grado de exactitud del método, utilizando el cálculo estadístico del error relativo expresado en porcentajes. La Tabla 9, indica los datos estadísticos para este proceso.

Tabla 9. Concentraciones experimentales de las soluciones patrón de cafeína.

*T	Concentración Teórica de patrones de Cafeína [ppm]	Lecturas de absorbancias			Concentraciones Experimentales de patrones de Cafeína [ppm]			Error Relativo Porcentual (ER%)		
		Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3
T1	2	0,130	0,133	0,135	1,95	2,01	2,02	-2,43	0,53	0,92
T2	4	0,234	0,234	0,239	4,03	4,05	4,09	0,67	1,24	2,33
T3	6	0,335	0,329	0,331	6,05	5,98	5,94	0,82	-0,32	-0,98
T4	8	0,429	0,424	0,427	7,94	7,90	7,86	-0,78	-1,28	-1,80
T5	10	0,538	0,528	0,534	10,11	10,01	10,00	1,13	0,11	-0,02
T6	12	0,628	0,629	0,638	11,92	12,05	12,09	-0,65	0,42	0,77
Media (ER%)								-0,21	0,12	0,21

Fuente: esta investigación.

A través de la media del error relativo (ER%), se estima la exactitud del método, verificando el grado de aproximación de las concentraciones experimentales con respecto a cada una de las concentraciones teóricas tenidas en cuenta en la metodología de la técnica analítica.

Se tomó los promedios de las lecturas de absorbancias, utilizadas en cada recta de cada tratamiento, a partir de las cuales se promedió y se consolidó un solo valor de absorbancia por tratamiento, lo que permitió construir la curva de calibración absoluta (ver gráfica 3). Los datos se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Absorbancias finales de las soluciones patrón de cafeína.

Tratamientos	Concentración Teórica de patrones de Cafeína [ppm]	Lecturas de absorbancias				s	% CV
		Recta 1	Recta 2	Recta 3	Promedio		
T1	2	0,130	0,133	0,135	0,133	0,0024	1,780
T2	4	0,234	0,234	0,239	0,236	0,0027	1,144
T3	6	0,335	0,329	0,331	0,332	0,0029	0,878
T4	8	0,429	0,424	0,427	0,427	0,0027	0,625
T5	10	0,538	0,528	0,534	0,533	0,0048	0,908
T6	12	0,628	0,629	0,638	0,632	0,0056	0,885
Promedio	7	Promedio			0,382		

Fuente: esta investigación.

4.1.2.3 Linealidad y rango. Se entiende por linealidad a la capacidad del método espectrofotométrico para proporcionar resultados, que son directamente proporcional a la concentración del analito (cafeína) en la muestra de ensayo de café dentro de un rango establecido. Y rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito (cafeína) para la cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Teniendo en cuenta que existe una relación lineal entre la señal analítica de absorbancia ( $y$ ), y concentración de cafeína en mg/L ( $x$ ), se calculó la “mejor” línea recta a través de los puntos de la gráfica de calibrado, cada uno de los cuales está sujeto a errores experimentales aleatorios en la señal del equipo (espectrofotómetro). Para minimizar estas desviaciones entre las absorbancias experimentales y teóricas se recurrió a aplicar el cálculo de los mínimos cuadrados, que permite verificar la linealidad y el rango del método, Además se encontró el “centro de gravedad” ( $\bar{x}, \bar{y}$ ) de los datos de la relación lineal (absorbancias y concentración), cuyos resultados se resumen en la Tabla 11.

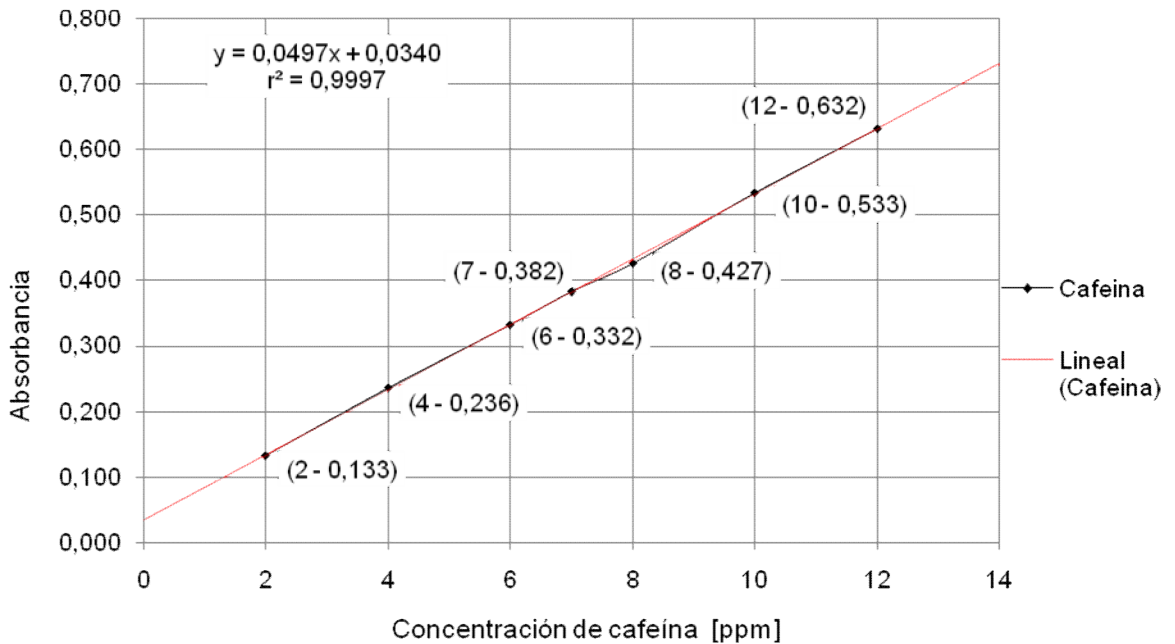
Tabla 11. Datos estadísticos de regresión lineal para cafeína.

Parámetro	Estimación
Error Estándar de las Absorbancias ( $S_{y/s}$ )	0,00275
Ordenada	0,0340 ± 0,006
Pendiente	0,0497 ± 0,001
Coefficiente de Correlación (r)	0,999891
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0,999782
“Centro de gravedad” ( $\bar{x}, \bar{y}$ )	(7,0 - 0,382)

Fuente: esta investigación.



Gráfica 3. Recta de calibración para de cafeína a 272,8 nm.



Fuente: esta investigación.

La ecuación de la regresión lineal para la recta de calibración es:

$$\text{Absorbancia} = 0,0497 * \text{Concentración} + 0,0340 \quad \text{Ecuación 3}$$

4.1.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación. Se entiende por límite de cuantificación (LC), para el método de espectrofotometría UV-VIS, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, es por lo tanto un término cuantitativo. Y por límite de detección (LD), la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El método utilizado, se basa en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.<sup>111</sup>

Para determinar los límites de LC y LD se aplicó la siguiente ecuación:

$$L_{C,D} = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{(b * \sqrt{n})} \quad \text{Ecuación 4}$$

<sup>111</sup> \*ASOCIACION ESPAÑOLA DE FARMACEUTICOS DE LA INDUSTRIA (A.E.F.I.). Validación de métodos analíticos. 2001 p. 87-94

Donde:

- $L_{C,D}$  = Límite de cuantificación ó límite de detección
- $K$  = Factor
- $b$  = Pendiente
- $n$  = Número de replicas
- $S_{bl}$  = Desviación estándar de la señal del ruido
- $Y_{bl}$  = Señal de ruido

Para su determinación, se tomó las tres (3) concentraciones que presentaron el mejor rango de linealidad en la recta de calibrado; en la Tabla 12 se presenta los datos a evaluar.

Tabla 12. Concentraciones de las soluciones patrón de cafeína para determinar LC y LD.

Concentración Teórica de patrones de cafeína [ppm]	Lecturas de absorbancias				S
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Promedio	
8	0,429	0,424	0,427	0,427	0,0027
10	0,538	0,528	0,534	0,533	0,0048
12	0,628	0,629	0,638	0,632	0,0056

Fuente: esta investigación.

Tomando las absorbancias promedio y las concentraciones, se verificó la relación lineal que existe. A partir de cálculos de regresión lineal se obtuvo los datos estipulados en la Tabla 13.

Tabla 13. Datos estadísticos de la regresión lineal para determinar LC y LD.

Parámetro	Estimación
Ecuación de la recta	Absorbancia = 0,05275*Concentración + 0,00517
Punto de corte ( $Y_{bl}$ )	0,00517
Pendiente (b)	0,05275
Coefficiente de correlación (r).	0,999996
Coefficiente de determinación ( $r^2$ ).	0,999993

Fuente: esta investigación.

Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se construyó la recta calculada tomando como eje de ordenadas las desviaciones

estándares de las absorbancias, y como eje de las abscisas las concentraciones estudiadas. De esta forma se obtiene una recta de ecuación:

$$\text{Desviación estandar} = 0,000725 * \text{Concentración} - 0,00315 \quad (r^2 = 0,996)$$

Se considera que la desviación estándar de las absorbancias corresponde al valor de la ordenada en el origen de esta recta:

$$S_{bl} = 0,00315$$

Una vez calculado el valor de la señal de ruido por extrapolación y la desviación estándar de esta señal, se puede calcular los límites teóricos de detección y cuantificación aplicando la ecuación (4):

$$LD(K = 3) \quad LD = \frac{0,00517 + (3 * 0,00315)}{(0,05275 * \sqrt{3})}$$

$$LD = 0,16 \text{ mg/L}$$

$$LC(K = 10) \quad LC = \frac{0,00517 + (10 * 0,00315)}{(0,05275 * \sqrt{3})}$$

$$LC = 0,40 \frac{mg}{L}$$

#### 4.1.3 Análisis de muestras de ensayo de café arábico tostado y molido.

4.1.3.1 Muestra de ensayo de café *Caturra* y *Castillo*. Se tomaron muestras de ensayo de café tostado y molido procedente de las zonas cafeteras del departamento de Nariño, en la Tabla 14 se especifica los municipios tenidos en cuenta.

Tabla 14. Municipios de muestreo para cafeína y taninos totales.

Variedad	Zona	Municipios
<i>Caturra</i>	Norte	La Unión, San José de Albán, La Cruz, San Pedro de Cartago, San Bernardo y El Tablón.
	Occidente	Sandona, La Florida, Consaca, Buesaco, Chachagui, Tangua, Linares, Ancuya, El Tambo y Samaniego.
<i>Castillo</i>	Occidente - Cordillera	Buesaco y Cumbitara.

Fuente: esta investigación.

El muestreo para este estudio, se realizó en más del 50 % de los municipios de las zonas Occidente y Norte para la variedad *Caturra*, siendo esta variedad la de mayor cultivo del departamento (ver gráfica 1). Mientras que la variedad *Castillo*, es una variedad en desarrollo, los cultivos son minoritarios y la producción es escasa, lo que originó tomar muestras de dos municipios (Buesaco y Cumbitara), ubicados en dos zonas cafeteras del departamento (Occidente y Cordillera respectivamente). Aspectos importantes que se tuvieron en cuenta, para determinar el comportamiento estimativo a las diferencias significativas, respecto al contenido medio (%) de cafeína y taninos totales, de las variedades de café objetos de estudio en las regiones cafeteras del departamento de Nariño.

Las muestras preparadas por triplicado, se analizaron bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente en el proceso de calibrado. Los datos registrados se indican en las Tablas 15 y 16 para las dos variedades de café *Caturra* y *Castillo*.

Tabla 15. Datos de absorbancias para muestras de café *arábico* variedad *Caturra*.

Zona	C	Lecturas de absorbancias				s	% CV
		1	2	3	Promedio		
Occidente	C1	0,165	0,163	0,167	0,165	0,0020	1,212
	C2	0,163	0,161	0,165	0,163	0,0020	1,227
	C3	0,161	0,162	0,158	0,160	0,0021	1,298
					Media	0,163	0,0023
Norte	C1	0,183	0,177	0,181	0,180	0,0031	1,694
	C2	0,190	0,185	0,188	0,188	0,0025	1,341
	C3	0,193	0,189	0,195	0,192	0,0031	1,588
					Media	0,187	0,0060

Fuente: esta investigación.

Tabla 16. Datos de absorbancias para muestra de café *arábico* variedad *Castillo*.

Zona	C	Lecturas de absorbancias				s	% CV
		1	2	3	Promedio		
Occidente - Cordillera	C1	0,163	0,158	0,160	0,160	0,0025	1,570
	C2	0,170	0,166	0,164	0,167	0,0031	1,833
	C3	0,164	0,160	0,163	0,162	0,0021	1,282
					Media	0,163	0,0024

Fuente: esta investigación.

Se calculó el coeficiente de variación y la desviación estándar, para verificar la precisión de las determinaciones y la repetibilidad. Se tomó la media general de las lecturas de absorbancias y se procedió a calcular la concentración real, a partir de la ecuación de la recta de calibrado absoluta de cafeína (ecuación 3).

$$\text{Absorbancia} = 0,0497 * \text{Concentración} + 0,0340$$

A partir de esta ecuación:

$$\text{Concentración} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0340}{0,0497} \quad \text{Ecuación 5}$$

Aplicando la ecuación (5), se realizaron los cálculos para las concentraciones medias de cafeína, a través del programa de office Excel 2007. Los datos se

resumen en la Tablas 17 y 18 para las dos variedades de café arábico.

Tabla 17. Contenido medio de cafeína en muestra de ensayo de café arábico variedad *Caturra*.

Zona	Parámetro	Estimación
Occidente	<b>Concentración de cafeína</b>	$2,591 \pm 0,103 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$
		$10,796 \pm 0,429 \text{ mg} \frac{\text{g}}{\text{g}} \text{ de Café}$
Norte	<b>Porcentaje de cafeína</b>	$1,080 \pm 0,043 \%$
	<b>Concentración de cafeína</b>	$3,074 \pm 0,098 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$
	<b>Porcentaje de cafeína</b>	$12,808 \pm 0,408 \text{ mg} \frac{\text{g}}{\text{g}} \text{ de Café}$ $1,281 \pm 0,041 \%$

Fuente: esta investigación.

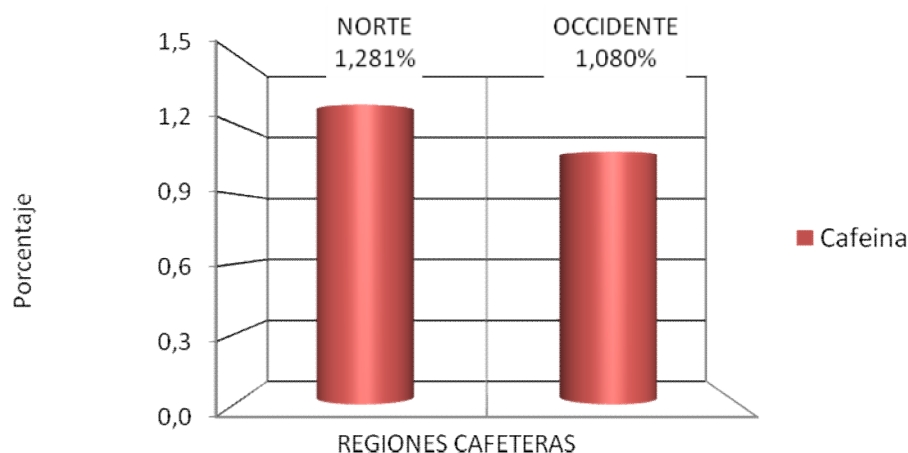
Tabla 18. Contenido medio de cafeína en muestra de ensayo de café arábico variedad *Castillo*.

Zona	Parámetro	Estimación
Occidente - Cordillera	<b>Concentración de cafeína</b>	$2,598 \pm 0,103 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$
		$10,824 \pm 0,429 \text{ mg} \frac{\text{g}}{\text{g}} \text{ de Café}$
	<b>Porcentaje de cafeína</b>	$1,082 \pm 0,043 \%$

Fuente: esta investigación.

Tomando los porcentajes de cafeína en variedad *Caturra* de cada una de las regiones cafeteras del departamento y graficando, se puede apreciar la diferencia en el contenido porcentual medio de cafeína entre las 2 zonas cafeteras.

Gráfica 4. Contenido de cafeína en dos regiones cafeteras del departamento de Nariño para la variedad *Caturra*.



Fuente: esta investigación.

Para contrastar la presencia de diferencias significativas, se tomó como hipótesis nula: las muestras se extraen de una población con media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$  iguales, y como hipótesis alternativa: las medias no son todas iguales. Aplicando un análisis de varianza (ANOVA), se puede observar que existe una diferencia significativa para las medias muestrales, cuya diferencia no se puede atribuir solamente a errores aleatorios del método en general, sino que existen factores fijos, como la procedencia de las muestras de ensayo al ser de regiones cafeteras diferentes, que contribuyen con la diferencia significativa de los resultados. Los resultados estadísticos se detallan en la Tabla 19.

Tabla 19. ANOVA para cafeína en dos regiones cafeteras del departamento de Nariño para la variedad *Caturra*.

Regiones cafeteras (RC)	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre RC	0,06080270	1	0,06080270	41,6077	0,0030
Dentro de RC	0,00584533	4	0,00146133		
Total (Corr.)	0,06664800	5			

Fuente: esta investigación.

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre regiones cafeteras y un componente dentro de las regiones cafeteras. La razón F (ver Anexo G), que en este caso es igual a 41,6077, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba F es (0,0030) menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 regiones cafeteras del departamento, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Además para estimar el grado de variabilidad de las 2 regiones cafeteras entre sí, se determinó la mínima diferencia significativa a partir de la Tabla 20.

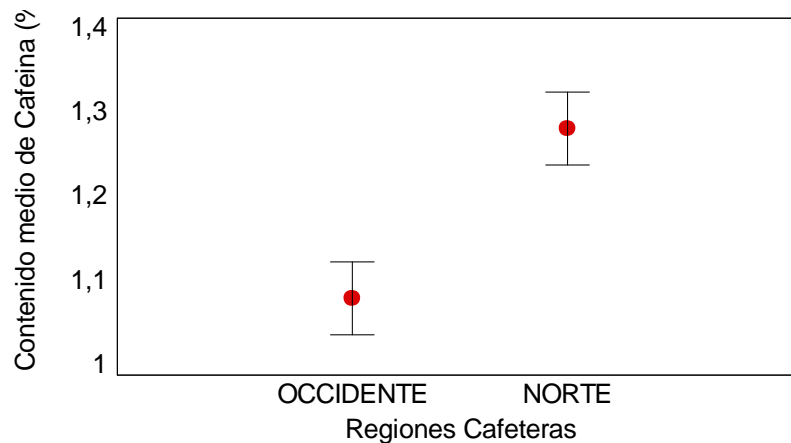
Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos.

Contraste	Significancia	Diferencia	+/- Límites
OCCIDENTE - NORTE	*	-0,201333	0,0866601
Método: 95,0 porcentaje LSD			
Zonas	Número de replicas	Media	Grupos Homogéneos
OCCIDENTE	3	1,07933	X
NORTE	3	1,28067	X

Fuente: esta investigación.

Los datos de la tabla anterior, se obtuvieron mediante un proceso de comparación múltiple, para determinar si las medias son significativamente diferentes. El asterisco (\*) que se encuentra al lado del par de regiones cafeteras, indica una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte inferior, se ha identificado 2 grupos homogéneos según la alineación (X's) de los contenidos (%) de cafeína en cada región cafetera. No existen diferencias estadísticamente significativas entre contenidos (%) de cafeína dentro de una región cafetera. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (ver Anexo G). Debido a que los intervalos para las muestras de las dos regiones, no se traslapan, se estima que las medias de cada región son significativamente diferentes. Esto se representa en la siguiente gráfica 5.

Gráfica 5. Medias de Fisher (LSD), para el contenido medio de cafeína.



Fuente: esta investigación.

#### 4.2 DETERMINACIÓN DE TANINOS TOTALES EN CAFÉ ARÁBICO



A través de la técnica de análisis de espectrofotometría (UV-VIS), se realizó la cuantificación de taninos totales, cabe indicar, que el método no es específico y mide el número de grupos fenólicos potencialmente oxidables (-OH) presentes en la muestra, la diversidad de taninos darán diferentes respuestas. Los valores obtenidos se expresan en equivalentes en ácido tánico (EAT), estándar utilizado en la realización de la recta de calibrado.<sup>112</sup>

El proceso implicó, preparar cinco (5) soluciones patrón con concentraciones conocidas de la solución estándar de ácido tánico, simultáneamente se preparó las soluciones de la muestra de ensayo de café tostado y molido. Para la cuantificación se basó en la reacción de Folin Ciocalteu, cuyo fundamento radica básicamente en los grupos fenólicos, que son oxidados por el reactivo de Folin Ciocalteu, que utiliza, un heteropolianión fosfórico de molibdeno y wolframio que oxida los fenoles con mayor especificidad ( $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$  y  $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 4\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ ). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causó la aparición de un compuesto con coloración azul que presentó un máximo de absorción a 754,4 nm (ver gráfica 6), y que se cuantificó por espectrofotometría UV-VIS, en base a una recta patrón de ácido tánico.<sup>113</sup> Esta coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra de ensayo.

Las señales del equipo (absorbancias) de estas concentraciones teóricas conocidas dieron una serie de datos que se correlacionan con la concentración de los compuestos de interés (taninos totales en la muestra de ensayo de café tostado y molido), es decir, las absorbancias de cada solución patrón, tendrá una relación lineal con la concentración de estos, lo que originó una recta de calibrado absoluta.

4.2.1 Análisis cualitativo de taninos totales. Inicialmente se determinó preliminar la presencia de taninos totales a partir de técnicas cualitativas, basadas en reacciones colorimétricas en función a la presencia de compuestos fenólicos. La adición de gotas (5) de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 5% en ácido clorhídrico (HCl), originó reacciones de cambio de color, tanto en la muestra de ensayo de café como en la solución de referencia de ácido tánico al 10% (ver figura 17). Se evaluó los resultados, de acuerdo a la carta colorimétrica para identificación cualitativa de taninos totales, Tabla 21.<sup>114</sup> Adicionalmente se realizó la prueba con  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10%, que produjo reacción de precipitación.

Figura 17. Reacciones colorimétricas y de precipitación para taninos.

---

<sup>112</sup> PALADINO Silvia C. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitisvinifera* L.) Tesis de Maestría en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidades Nacionales de Cuyo. 2008 p. 93

<sup>113</sup> Ibid., p. 92

<sup>114</sup> VELASQUEZ V. Ángela M. Extracción de taninos presentes en el banano verde, Op. cit., p. 19



Solución de referencia  
Ácido tánico al 10%  
con  $\text{FeCl}_3$

Muestra de ensayo  
de café con  $\text{FeCl}_3$

Muestra de ensayo de  
café con  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Fuente: esta investigación.

Tabla 21. Carta colorimétrica para identificación cualitativa de taninos.

Color	Contenido	Tipo de tanino
Amarillo	Baja o nulo contenido de taninos	—
Azul oscuro	Contenido medio de taninos	Taninos pirogálicos (taninos hidrosolubles)
Verde oscuro	Alto contenido de taninos	Taninos concentrados

Fuente: VELASQUEZ V. Ángela M. Extracción de taninos presentes en el banano verde p. 19.

El contenido de compuestos fenólicos en café tostado y molido se ve directamente afectado por el proceso de tostión, alcanzando niveles máximos hasta del 4,5 % encontrándose valores de 200 – 500 mg por taza,<sup>115, 116, 117</sup> e identificándose como compuestos fenólicos mayoritarios los ácidos clorogénicos.<sup>118, 119, 120</sup> Una taza de 200 ml de café tostado y molido proporcionó entre 70 y 350 mg de ácido clorogénico. Encontrándose que la máxima actividad antioxidante se detectó en el café medianamente tostado.<sup>121</sup>

4.2.2 Determinación de la longitud de onda fija y adecuada. Se empleó un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 11, de rango de señal 190-900

<sup>115</sup> LAKENBRINK, C y Colaboradores. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem* 48, 2000 p. 2448-2452

<sup>116</sup> GUTIÉRREZ M. A., Op. cit., p. 72-81

<sup>117</sup> ENGELHARDT, U.H. y Colaboradores. , H.G. Säuren des Kaffees. XII. Anteil einzelner Säuren am sauren titrierbaren Gesamtsäure. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 181. 1985b p. 206-209

<sup>118</sup> MATTILA, P, y Colaboradores. Phenolic acids in berries, fruits and beverages. *J Agric Food Chem*, 54. 2006 p. 7193-7199.

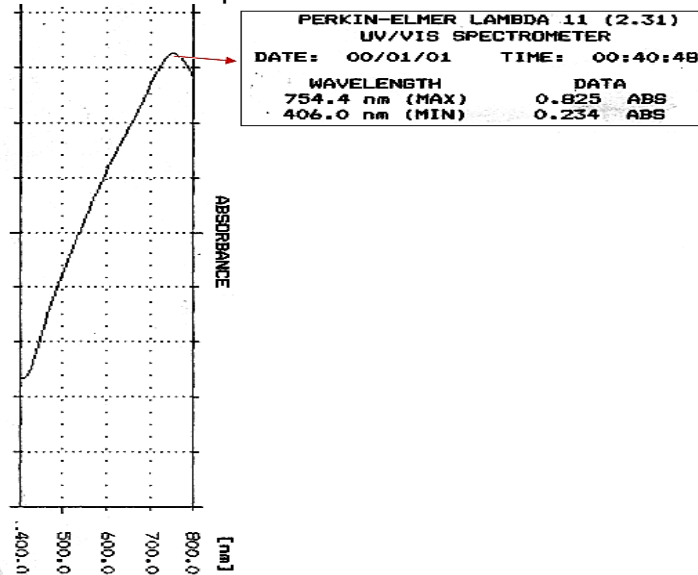
<sup>119</sup> GOTTELAND Martín, Op. cit., p. 105-115

<sup>120</sup> SPILLER, M. A, Op. cit., p. 103-167

<sup>121</sup> GOTTELAND, Martín, De Pablo Saturnino. *Café y salud*. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. 2008 p. 1-7

nm para determinar la longitud de onda más adecuada para las lecturas de las absorbancias de las soluciones patrón de ácido tánico, como para las muestras de ensayo de café. Con la solución patrón 4 (7,0 mg/L), se realizó un barrido por toda la región ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro, lo cual originó el siguiente espectro de absorción, gráfica 6.

Gráfica 6. Espectro de solución patrón de ácido tánico.



Fuente: esta investigación.

La solución patrón de ácido tánico presentó su mayor absorción a una longitud de onda de 754,4 nm, que es adecuada y fija para los análisis de las soluciones patrón de ácido tánico y las muestras de ensayo de café.

4.2.3 Recta de calibrado. Los datos de las absorbancias a partir de las soluciones patrón de ácido tánico se especifican en la Tabla 22.

Tabla 22. Absorbancias a partir de soluciones patrón de ácido tánico a 754,4 nm.

*T	Concentración teórica de patrones de ácido tánico [ppm]	Lecturas de absorbancias				s	% CV	IC 95 %
		1	2	3	Promedio			
TA1	1,6	0,181	0,175	0,178	0,178	0,0030	1,685	0,174 – 0,189
TA2		0,179	0,181	0,185	0,182	0,0031	1,682	
TA3		0,184	0,187	0,181	0,184	0,0030	1,630	
TB1	2,4	0,301	0,294	0,296	0,297	0,0036	1,214	0,289 – 0,314
TB2		0,305	0,301	0,297	0,301	0,0040	1,329	
TB3		0,310	0,307	0,303	0,307	0,0035	1,145	
TC1	4,0	0,481	0,479	0,475	0,478	0,0031	0,639	0,469 – 0,494
TC2		0,476	0,480	0,485	0,480	0,0045	0,939	
TC3		0,490	0,483	0,487	0,487	0,0035	0,722	
TD1	7,0	0,826	0,828	0,832	0,829	0,0031	0,369	0,816 – 0,838
TD2		0,818	0,822	0,825	0,822	0,0035	0,427	
TD3		0,833	0,827	0,830	0,830	0,0030	0,361	
TE1	10,0	1,171	1,165	1,183	1,173	0,0092	0,781	1,157 – 1,180
TE2		1,158	1,169	1,181	1,169	0,0115	0,984	
TE3		1,166	1,156	1,161	1,161	0,0050	0,431	

\*T: Tratamiento igual para todos los análisis, por triplicado y en diferentes días de análisis.

Fuente: esta investigación.

A partir de los datos obtenidos se define los parámetros estadísticos que garantizan la validación del método espectrofotométrico UV-VIS.

4.2.3.1 Precisión. La precisión de los datos representada estadísticamente, tomando los intervalos de confianza al 95 % y la desviación estándar relativa (Coeficiente de Variación) expresado en porcentaje, indican la variabilidad, dispersión de los datos y la repetibilidad que tiene el método. Donde se puede apreciar porcentajes de coeficientes de variación (% CV) e intervalos de confianza (IC 95%), aceptables dentro de la técnica de análisis, indicando que la lectura real de las absorbancias está dentro del rango con una probabilidad del 95 %. El cálculo de la desviación estándar (s) para los datos reportados, indica el grado de dispersión de cada una de las lecturas de absorbancias con respecto a la media de estas.

4.2.3.2 Exactitud. A partir de los promedios de las absorbancias, de cada solución patrón de ácido tánico, se construyó rectas de calibrado (3), a partir de las cuales se calculó las concentraciones experimentales, permitiendo verificar el grado de exactitud del método, utilizando el cálculo estadístico del error relativo expresado en porcentajes. La Tabla 23, indica los datos estadísticos para este proceso.

Tabla 23. Concentraciones experimentales de soluciones patrón de ácido tánico.

T	Concentración teórica de patrones de ácido tánico [ppm]	Lecturas de absorbancias			Concentraciones experimentales de patrones de ácido tánico [ppm]			Error Relativo Porcentual (ER%)		
		Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3
TA	1,6	0,178	0,182	0,184	1,48	1,48	1,44	-7,46	-7,77	-9,90
TB	2,4	0,297	0,301	0,307	2,50	2,50	2,51	3,97	4,32	4,39
TC	4,0	0,478	0,480	0,487	4,03	4,05	4,07	0,82	1,21	1,66
TD	7,0	0,829	0,822	0,830	7,02	6,99	7,04	0,40	-0,16	0,62
TE	10,0	1,173	1,169	1,161	9,96	9,98	9,94	-0,36	-0,16	-0,57
							Media (ER%)	-0,53	-0,51	-0,76

Fuente: esta investigación.

A través de la media del error relativo (ER%), se estima la exactitud del método, verificando el grado de aproximación de las concentraciones experimentales con respecto a cada una de las concentraciones teóricas tenidas en cuenta en la metodología de la técnica analítica.

Se tomó los promedios de las lecturas de absorbancias, utilizadas en cada recta de cada tratamiento, a partir de las cuales se promedió y se consolidó un solo valor de absorbancia por tratamiento, lo que permitió construir la recta de calibración absoluta (ver gráfica 8). Los datos se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24. Absorbancias finales de soluciones patrón de ácido tánico.

Tratamiento	Concentración teórica de patrones de ácido tánico [ppm]	Lecturas de absorbancias				s	% CV
		Recta 1	Recta 2	Recta 3	Promedio		
TA	1,6	0,178	0,182	0,184	0,181	0,0030	1,669
TB	2,4	0,297	0,301	0,307	0,302	0,0049	1,611
TC	4,0	0,478	0,480	0,487	0,482	0,0044	0,990
TD	7,0	0,829	0,822	0,830	0,827	0,0045	0,541
TE	10,0	1,173	1,169	1,161	1,168	0,0061	0,372
Promedio	5,0		Promedio		0,592		

Fuente: esta investigación.

4.2.3.3 Linealidad y rango. Teniendo en cuenta que existe una relación lineal entre la señal analítica de absorbancia ( $y$ ), y concentración de ácido tánico en mg/L ( $x$ ), se calculó la “mejor” línea recta a través de los puntos de la gráfica de calibrado, cada uno de los cuales está sujeto a errores experimentales aleatorios en la señal del equipo (espectrofotómetro). Para minimizar estas desviaciones entre las absorbancias experimentales y teóricas se recurrió a aplicar el cálculo de los

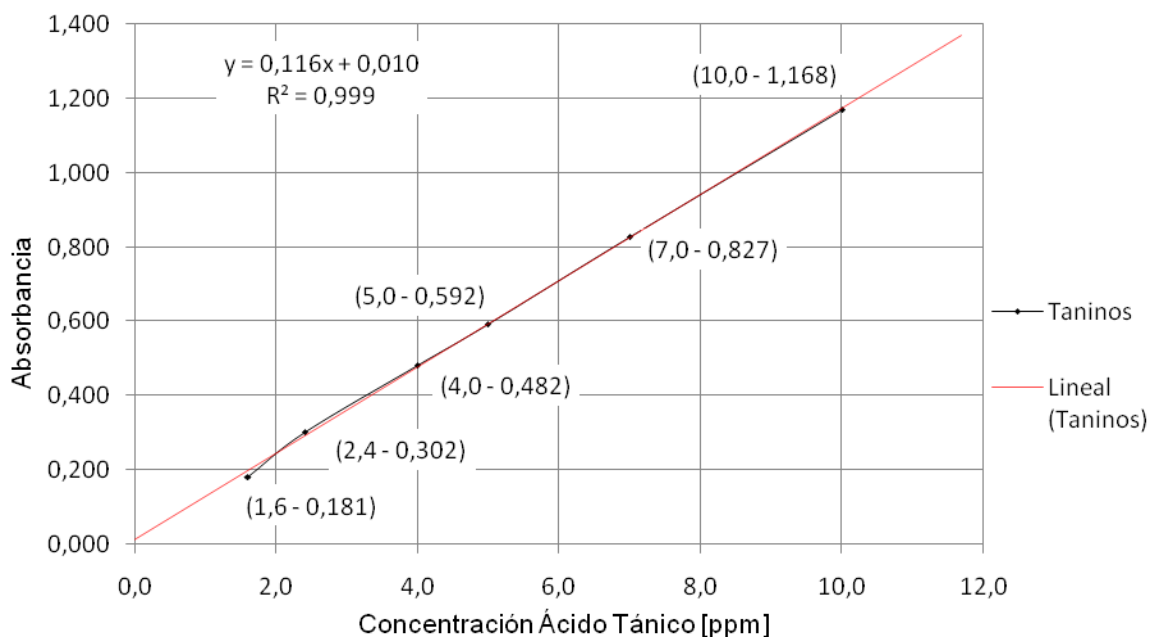
mínimos cuadrados, que permite verificar la linealidad y el rango del método, Además se encontró el “centro de gravedad”  $(\bar{x}, \bar{y})$  de los datos de la relación lineal (absorbancias y concentración), cuyos resultados se resumen en la Tabla 25.

Tabla 25. Datos estadísticos de regresión lineal para ácido tánico.

Parámetro	Estimación
Error Estándar de la Absorbancias	0,01061
Ordenada	0,0108 ± 0,022
Pendiente	0,1162 ± 0,004
Coefficiente de correlación (r)	0,999656
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0,999311
“Centro de gravedad” $(\bar{x}, \bar{y})$	(5,0 - 0,592)

Fuente: Esta investigación.

Gráfica 7. Recta de calibración para ácido tánico a 754,4 nm.



Fuente: esta investigación.

La ecuación de la regresión lineal para la recta de calibración es:

$$\text{Absorbancia} = 0,1162 * \text{Concentración} + 0,0108 \quad \text{Ecuación 6}$$

4.2.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación.<sup>122</sup> Para determinar los

<sup>122</sup> \*ASOCIACION ESPAÑOLA DE FARMACEUTICOS DE LA INDUSTRIA (A.E.F.I.), Op. cit., p. 87-94

límites de cuantificación (LC), y límite de detección (LD), del método de determinación de taninos totales, se aplicó la ecuación (4). Se tomaron las tres (3) concentraciones del proceso de calibración, que presentaron el mejor rango de linealidad; en la tabla 26, se presenta los datos a evaluar.

Tabla 26. Concentraciones de las soluciones patrón de ácido tánico para determinar LC y LD.

Concentración Teórica de Patrones de ácido tánico [ppm]	Lecturas de absorbancias				s
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Promedio	
4,0	0,478	0,480	0,487	0,482	0,0044
7,0	0,829	0,822	0,830	0,827	0,0045
10,0	1,173	1,169	1,161	1,168	0,0061

Fuente: Esta investigación.

Tomando las absorbancias promedio y las concentraciones, se verificó la relación lineal que existe y procediendo de igual forma a lo estipulado en el numeral 4.1.2.4. Los cálculos se resumen en la Tabla 27.

Tabla 27. Datos de determinación de LC y LD para ácido tánico.

Parámetro	Estimación
Ecuación de la recta 1	Absorbancia = 0,11467 * Concentración + 0,02300
Punto de corte (Y <sub>bi</sub> )	0,02300
Pendiente (b)	0,11467
Coefficiente de correlación (r).	0,999994
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> ).	0,999997
Ecuación de la recta 2	Desviación estándar = 0,00028 * Concentración + 0,00302
Punto de corte (S <sub>bi</sub> )	0,00302
Límite de detección	0,16 mg/L
Límite de cuantificación	0,27 mg/L

Fuente: esta investigación.

#### 4.2.4 Análisis de muestras de ensayo de café arábico tostado y molido.

4.2.4.1 Muestra de ensayo de café *Caturra* y *Castillo*. El muestreo se basa en los datos estipulados en la Tabla 14. Las muestras preparadas por triplicado se analizaron, bajos las mismas condiciones que se utilizó para la curva de calibración. Los datos registrados se indican en las Tablas 28 y 29 para las dos variedades de café *Caturra* y *Castillo* respectivamente.

Tabla 28. Datos de absorbancias para taninos totales en muestras de café *arábico* variedad *Caturra* para las dos zonas cafeteras.

Zona	T	Lecturas de absorbancias				s	% CV
		1	2	3	Promedio		
Occidente	T1	0,451	0,459	0,462	0,457	0,0057	1,243
	T2	0,461	0,455	0,453	0,456	0,0042	0,912
	T3	0,456	0,448	0,451	0,452	0,0040	0,895
				Media	0,455	0,0030	0,665
Norte	T1	0,471	0,477	0,482	0,477	0,0055	1,155
	T2	0,469	0,476	0,477	0,473	0,0057	1,196
	T3	0,479	0,474	0,470	0,474	0,0045	0,951
				Media	0,475	0,0019	0,391

Fuente: esta investigación.

Tabla 29. Datos de absorbancias para muestra de café *arábico* variedad *Castillo*.

Zona	T	Lecturas de absorbancias				s	% CV
		1	2	3	Promedio		
Occidente - Cordillera	T1	0,439	0,436	0,441	0,439	0,0025	0,574
	T2	0,446	0,449	0,443	0,446	0,0030	0,673
	T3	0,450	0,456	0,447	0,451	0,0046	1,016
				Media	0,445	0,0062	1,393

Fuente: esta investigación.

Se calculó el coeficiente de variación y la desviación estándar, para verificar la precisión de las determinaciones y la repetibilidad. Se tomó la media de los promedios de las lecturas de absorbancias y se procedió a calcular la concentración real, a partir de la ecuación de la recta en la curva de calibración absoluta (ecuación 6).

$$\text{Absorbancia} = 0,1162 * \text{Concentración} + 0,0108$$

A partir de esta ecuación:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0108}{0,1162} \quad \text{Ecuación 7}$$

Aplicando la ecuación 7, se realizó los cálculos para las concentraciones de taninos totales, expresados en equivalentes en ácido tánico (EAT) como estándar de cuantificación. Para lo cual se utilizó el programa de office Excel 2007. Los datos se resumen en la Tablas 30 y 31 para las dos variedades de café.



Tabla 30. Contenido medio de taninos totales en muestra de café *arábico* variedad *Caturra*.

Zona	Parámetro	Estimación
Occidente	<b>Concentración de Taninos totales</b>	$3,823 \pm 0,128 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$
		$38,23 \pm 1,280 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de Café}$
Norte	<b>Concentración de Taninos totales</b>	$3,823 \pm 0,128 \%$
		$3,991 \pm 0,126 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$
	<b>Porcentaje de Taninos totales</b>	$39,92 \pm 1,264 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de Café}$
	<b>Porcentaje de Taninos totales</b>	$3,991 \pm 0,126 \%$

Fuente: esta investigación.

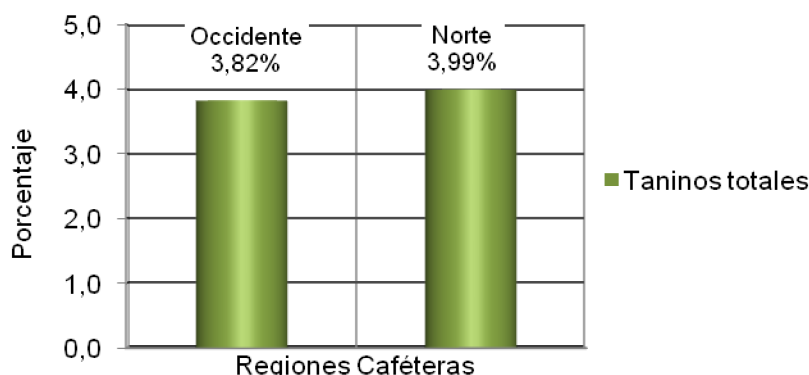
Tabla 31. Contenido medio de taninos totales en muestra de café *arábico* variedad *Castillo*.

Zona	Parámetro	Estimación
Occidente - Cordillera	<b>Concentración de Taninos totales</b>	$3,738 \pm 0,129 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$
		$37,38 \pm 1,289 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de Café}$
	<b>Porcentaje de Taninos totales</b>	$3,738 \pm 0,129 \%$

Fuente: esta investigación.

Se tomó los porcentajes de taninos totales de la variedad *Caturra* de cada región cafetera del departamento y se graficó, se puede apreciar la diferencia en el contenido de taninos totales en las 2 zonas cafeteras.

Gráfica 8. Contenido de Taninos totales en 2 regiones cafeteras del departamento de Nariño.



Fuente: esta investigación.

Para contrastar la presencia de diferencias significativas, se tomó como hipótesis nula: las muestras se extraen de una población con media  $\mu$  y varianza  $\sigma_0^2$  iguales, y como hipótesis alternativa: las medias no son todas iguales. Aplicando un análisis de varianza (ANOVA), se puede observar que existe una diferencia significativa para las medias muestrales, cuya diferencia no se puede atribuir solamente a errores aleatorios del método en general, sino que existen factores fijos, como la procedencia de las muestras de ensayo al ser de regiones cafeteras diferentes, que contribuyen con la diferencia significativa de los resultados. Los resultados estadísticos se detallan en la Tabla 32.

Tabla 32. ANOVA para taninos totales en dos regiones cafeteras.

Regiones cafeteras (RC)	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre RC	0,0426727	1	0,0426727	90,34	0,0007
Dentro de RC	0,0018893	4	0,0004723		
Total (Corr.)	0,0445620	5			

Fuente: esta investigación.

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre Regiones cafeteras y un componente dentro de Regiones cafeteras. La razón F, que en este caso es igual a 90,3444, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba F es (0,0007) menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 regiones cafeteras del departamento, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Además para estimar el grado de variabilidad de las 2 regiones cafeteras entre sí, se determinó la mínima diferencia significativa a partir de la Tabla 33.

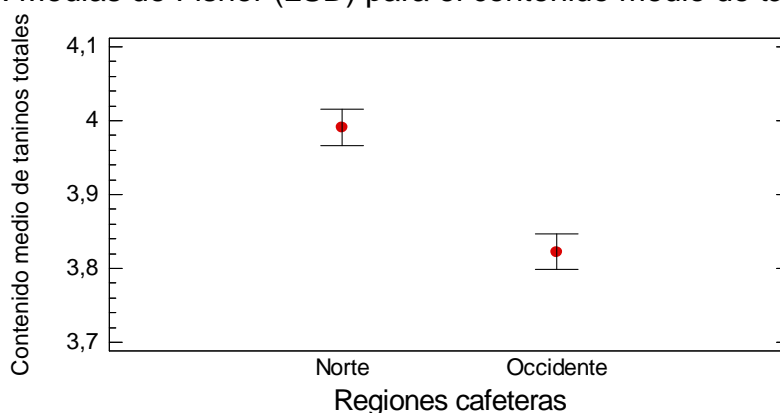
Tabla 33. Pruebas de Múltiple Rangos.

Contraste		Significancia	Diferencia	+/- Límites
Norte - Occidente		*	0,168667	0,0492685
Método: 95,0 porcentaje LSD				
Zonas	Número de replicas	Media	Grupos Homogéneos	
Occidente	3	3,82267	X	
Norte	3	3,99133	X	

Fuente: esta investigación.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar si las medias son significativamente diferentes. El asterisco (\*) que se encuentra al lado del par de regiones cafeteras, indica que muestra una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte inferior, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación (X's) de los contenidos (%) de taninos totales en cada región cafetera. No existen diferencias estadísticamente significativas entre contenidos (%) de taninos totales dentro de una región cafetera. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Debido a que los intervalos para las muestras de las dos regiones, no se traslapan, se estima que las medias de cada región son significativamente diferentes. Esto se representó en la siguiente gráfica 9.

Gráfica 9. Medias de Fisher (LSD) para el contenido medio de taninos totales.



Fuente: esta investigación.

#### 4.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EN CAFÉ ARÁBICO.

Para la identificación de los compuestos volátiles, fue necesario montar la técnica de extracción SPME y se comparó con la técnica alternativa de destilación

extracción simultánea (DES), para lo cual se tomaron muestra de ensayo de una de las tres regiones cafeteras del departamento de Nariño, cuyas especificaciones de la muestra se detallan en la Tabla 34.

Tabla 34. Muestra de ensayo para compuestos volátiles.

Muestra de ensayo de café <i>arábico</i> tostado y molido	
Variedad	<i>Caturra</i>
Origen	Zona Occidente (Sotomayor, Chachagui, Samaniego y Consaca)
Humedad (%)	9,8
Grado de Tostión	Oscuro
Grado de molienda	Fina

Fuente: esta investigación.

4.3.1 Análisis de COVs por Microextracción en Fase Sólida (SPME). La técnica más utilizada en la extracción de COVs en diferentes matrices, es la Microextracción en Fase Sólida con espacio de cabeza (HS-SPME de la sigla en ingles),<sup>123</sup> técnica que permitió maximizar la extracción de los COVs de la muestra de ensayo de café, a partir del diseño experimental de Superficie de Respuesta.

4.3.1.1 Optimización de las condiciones de extracción de COVs. Las técnicas de Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), permitió el modelado y el análisis de los datos en los que la extracción de COVs se ven influenciados por factores experimentales de: Temperatura (30, 60 y 90°C), Tiempo (20, 40 y 60 min.) y Fibra (Carboxen/PDMS = 1,0, PDMS/DVB = 2,0 y DVB/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS = 3,0). El mayor rendimiento de COVs es una función de los niveles de cada uno de los factores experimentales.

Para realizar la optimización, se tuvo en cuenta como variables de respuesta las siguientes: a), número de COVs con un área 500 cuentas (COVs 500), b) número de COVs con un área 1000 cuentas (COVs 1000), c) número de COVs con un área 25000 cuentas (COVs 25000) y d) la mayor área total de cada extracción de COVs (COVs TOTAL). Los cálculos matemáticos y estadísticos para la optimización de múltiples respuestas se realizaron con la utilización del paquete estadístico de STATGRAPHICS Centurion XV.

Inicialmente, se construyó un modelo de optimización para cada variable de respuesta anteriormente mencionadas. Se tomó como variable de respuesta el número de COVs extraídos con un área 500 cuentas, valor mínimo estimado, por presentar el mayor número de COVs, y que permitió notar el comportamiento de los efectos principales y sus interacciones, posterior a la técnica cromatográfica.

<sup>123</sup> \*SUPELCO. Bulletin 929. A practical guide to quantitation with solid phase microextraction. 2001 p. 1-8

Se determinó, inicialmente las estimaciones para cada uno de los efectos experimentales y sus interacciones. Lo que permitió establecer el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual midió su error de experimental. Tabla 35.

Tabla 35. Efectos estimados en la extracción COVs 500.

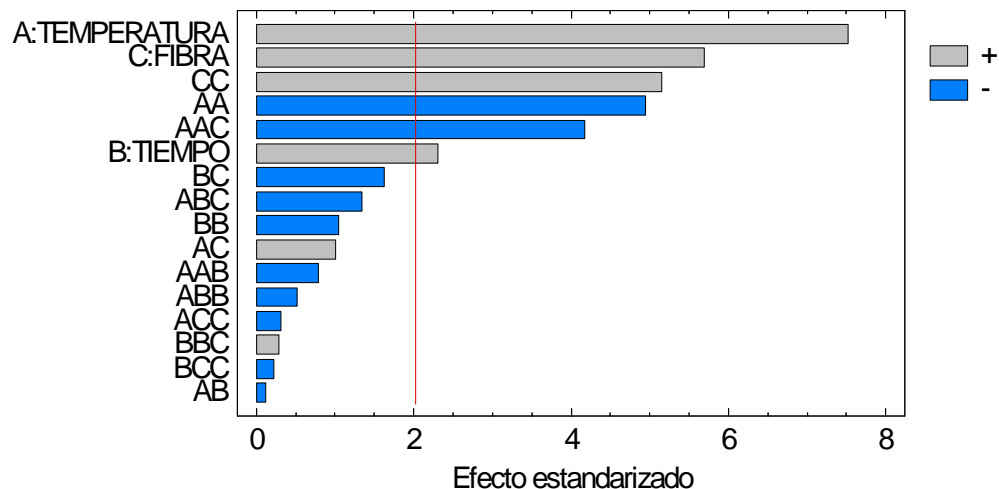
Efectos experimentales y sus interacciones	Estimado del número de COVs	Error Estándar
Promedio global del análisis cromatográfico	135,167	2,48192
A:TEMPERATURA	38,6667	5,13807
B:TIEMPO	11,8889	5,13807
C:FIBRA	29,2222	5,13807
AA	-19,6667	3,97993
AB	-0,33333	2,81423
AC	2,83333	2,81423
BB	-4,16667	3,97993
BC	-4,58333	2,81423
CC	20,5000	3,97993
AAB	-3,83333	4,87440
AAC	-20,3333	4,87440
ABB	-2,50000	4,87440
ABC	-4,62500	3,44672
ACC	-1,50000	4,87440
BBC	1,41667	4,87440
BCC	-1,08333	4,87440
Bloque	-2,11111	1,87616

Fuente: esta investigación.

En la tabla anterior, se observa que el promedio global de los 54 análisis cromatográficos, es de 135,167 COVs extraídos, con un área 500 cuentas. Este valor estimado, permitió establecer el comportamiento de los factores principales y sus interacciones, mediante el cambio en el promedio global como variable respuesta, al pasar el factor de un nivel bajo a un nivel alto. Se encontró que la TEMPERATURA, TIEMPO y el TIPO FIBRA utilizados, son determinantes en la extracción de los COVs. Además se notó que las interacciones (AC, CC y BBC),

presentan un efecto de aumento (signo +) en la extracción de COVs expresados en unidades (número de COVs) por término medio. Es decir, la interacción CC indicó que el cambio del tipo de fibra es significativo, al utilizar una fibra de extracción con recubrimiento de Carboxen/PDMS a una fibra con recubrimiento de DVB/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS, y el aumento se da en 20,5 COVs extraídos más que el promedio global. La totalidad de estos efectos estimados en orden decreciente de importancia, se aprecian de mejor forma en el diagrama de Pareto (ver gráfica 10), Para probar la significancia estadística de los efectos, se realizó una ANOVA. Tabla 36.

Gráfica 10. Diagrama de Pareto para extracción de COVs 500.



Fuente: esta investigación.

Tabla 36. Análisis de Varianza para la extracción de COVs 500.

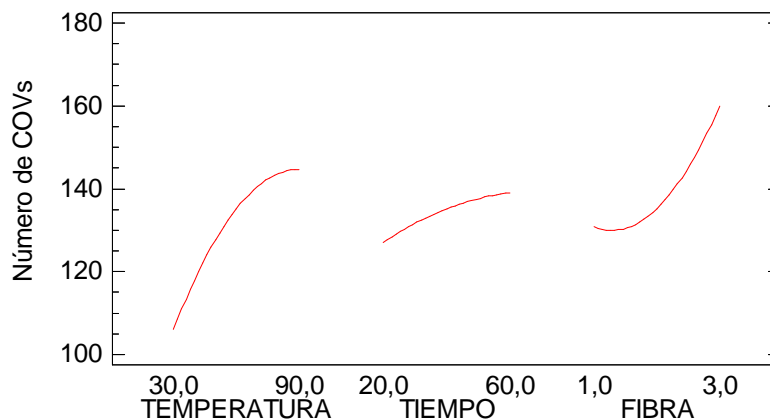
Factores experimentales	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:TEMPERATURA	2691,2	1	2691,20	56,63	0,0000
B:TIEMPO	254,422	1	254,422	5,35	0,0265
C:FIBRA	1537,09	1	1537,09	32,35	0,0000
AA	1160,33	1	1160,33	24,42	0,0000
AB	0,66667	1	0,66667	0,01	0,9064
AC	48,1667	1	48,1667	1,01	0,3208
BB	52,0833	1	52,0833	1,10	0,3021
BC	126,042	1	126,042	2,65	0,1121
CC	1260,75	1	1260,75	26,53	0,0000

AAB	29,3889	1	29,3889	0,62	0,4368
AAC	826,889	1	826,889	17,40	0,0002
ABB	12,5	1	12,5000	0,26	0,6112
ABC	85,5625	1	85,5625	1,80	0,1880
ACC	4,5	1	4,50000	0,09	0,7601
BBC	4,01389	1	4,01389	0,08	0,7730
BCC	2,34722	1	2,34722	0,05	0,8254
Bloques	60,1667	1	60,1667	1,27	0,2679
Error total	1710,7	36	47,5195		
Total (corr.)	20198,8	53			

Fuente: esta investigación.

La tabla ANOVA particionó la variabilidad de COVS 500 en bloques separados para cada uno de los efectos. Lo que permitió probar la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 3 factores principales y 3 interacciones (AA, CC y AAC), tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Estableciendo que la TEMPERATURA, TIEMPO y el TIPO de FIBRA, tuvieron un efecto significativo durante el proceso de extracción, esto se evidenció a partir del gráfico de efectos principales, (ver gráfica 11).

Gráfica 11. Factores principales de la extracción de COVs 500.



Fuente: esta investigación.

Se pudo establecer, que a niveles altos de temperatura (90°C) y tiempo (60 min), favorecen la extracción de COVs, y que existió una diferencia bien definida en el tipo de Fibra que se utilizó, en este caso, la más adecuada fue fibra con tres revestimientos DVB/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS de carácter bipolar.

Lo anterior permitió establecer, cuáles son los principales factores experimentales a tener en cuenta para la optimización del proceso de extracción de COVs 500.

Estos factores presentaron un modelo ajustado de segundo orden, que permitió estimar el comportamiento a seguir para alcanzar la región de optimización. La Tabla 37 indica estos detalles.

Tabla 37. Coeficientes de regresión para COVS 500.

Coeficiente	Estimado
Constante	142,0
A:TEMPERATURA	-0,8
B:TIEMPO	0,215278
C:FIBRA	-66,5833
AA	0,0116667
AC	1,35556
CC	10,25
ABC	-0,0112963

Fuente: esta investigación.

Lo anterior permitió estimar la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Número de COVs} = [(142) - (0,8 \times \text{Temperatura}) + (0,215278 \times \text{Tiempo}) - (66,5833 \times \text{Fibra})]$$

Ecuación 8

La ecuación indicó la relación significativa que existe en la interacción de los tres factores experimentales principales.

Establecidos estos datos estadísticos, se procedió a optimizar el proceso de extracción de los COVs, a partir de las demás variables de respuesta. Se utilizó el proceso de optimización de múltiples respuestas, la prioridad del análisis, es de alcanzar la mayor deseabilidad (expresa un valor de respuesta igual a  $y$  sobre una escala de 0 a 1 en la ecuación de un polinomio de segundo grado), en la extracción del número de los COVs, a partir de la evaluación de las cuatro variables de respuestas.

El proceso estadístico permitió determinar la combinación de los factores experimentales, que simultáneamente optimizan las cuatro variables de respuestas. Los hace maximizando la función de deseabilidad. El Anexo A, muestra la función de deseabilidad evaluada en cada punto del diseño experimental. Entre los puntos del diseño, la deseabilidad máxima experimental, se alcanzó en la corrida de análisis 26, con un valor de 0,830849; con niveles experimentales de 60 °C, 60 min y Fibra DBV/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS, parámetros que se acercan a la región óptima del diseño experimental.

El proceso de determinación de la máxima deseabilidad, permitió establecer parámetros teóricos óptimos para el proceso de extracción de COVs, basados en la determinación de la deseabilidad global óptima (Anexo G), Se detalla las condiciones óptimas en la siguiente Tabla 38.



Tabla 38. Deseabilidad global optima para extracción de COVs para SPME.

Valor óptimo = 0,855515

Factor experimentales	Niveles			Variables de respuesta	Valores óptimos
	Bajo	Alto	Óptimo		
Temperatura (°C)	30	90	70,8356	COVs 500	167,3050
Tiempo (min.)	20	60	60,0000	COVs 1000	166,5810
Fibra (Polaridad)	1	3	2,99988	COVs 25000	73,1225
				COVs TOTAL	8821170

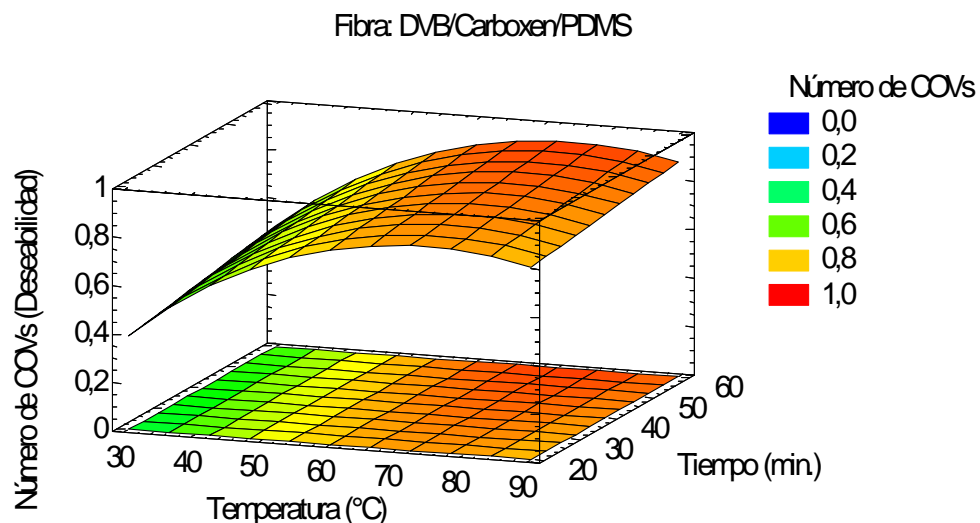
Fuente: esta investigación.

Lo que permitió establecer, que los cuatro factores experimentales, presentan su mayor significancia en los siguientes niveles del diseño experimental (71 °C, 60 min. y 3), donde los valores teóricos de extracción del número de COVs es de 167,3050, 166,5810 y 73,1225 para las variables de respuesta COVs 500, 1000 y 25000 respectivamente, y de una AREA TOTAL de 8821170 cuentas para COVs TOTAL.

La literatura precisa, que un aumento de temperatura favorece el alcance de equilibrio entre las tres fases presentes en la extracción de COVs por la técnica de HS-SPME<sup>124</sup>. Se graficó el comportamiento estimado en la combinación de dos factores (Tiempo y Temperatura), y manteniendo constante el tipo de fibra DBV/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS, Ver gráfica 12. Lo que permitió establecer finalmente los niveles óptimos de extracción de los COVs, mediante la interacción de los tres factores experimentales principales. Estos valores se detallan en la Tabla 39.

Gráfica 12. Superficie de Respuesta Estimada para extracción de los COVs.

<sup>124</sup> ROJAS Gina M E, Op. cit., p. 43



Fuente: esta investigación

Tabla 39. Condiciones óptimas de extracción de los COVs por la técnica de SH-SPME.

Factores Experimentales Principales	Niveles
Temperatura (°C)	71
Tiempo (min.)	60
Fibra	DBV/Carboxen™/PDMS

Fuente: esta investigación.

4.3.2 Análisis de COVs por destilación extracción simultanea (DES). A partir del diseño muestral categórico de factor único; debido a que la variación del número de COVs se ve afectada, por la variación de los niveles del tiempo de extracción (único factor), se procedió a tomar como parámetro para encontrar el mejor nivel del tiempo de extracción de la técnica, la variable de respuesta del mayor número de COVs con un área mayor o igual a 500 cuentas. Los datos se reportan en la Tabla 40.

Tabla 40. Número de COVs por la técnica DES.

Número	Número de replica	Niveles de tiempo de extracción (min).			
		30	60	90	120
COVs	1	40	45	51	31
	2	40	52	49	31
	3	40	50	53	31
Total COVs*		21	38	33	26

\* El total de COVs: número de compuestos repetibles en las tres réplicas de la técnica.

Fuente: esta investigación.

La Tabla anterior indica, el número de COVs extraídos por replica en cada nivel del tiempo del extracción, adicionalmente se reportó el número total de COVs que son repetibles en las tres replicas para cada nivel del tiempo de extracción. De donde se observó, que el nivel de 60 minutos, es el de mayor extracción de COVs repetibles (38 COVs). Para comprobar lo anterior, se realizó un análisis estadístico para los cuatro niveles del tiempo de extracción, utilizando el paquete estadístico de STATGRAPHICS Centurion XVI. Los datos estadísticos se resumen en la Tabla 41.

Tabla 41. Resumen estadístico para la técnica DES.

Niveles de Tiempo extracción (min)	Número de replicas	Promedio	S	CV (%)	Mínimo	Máximo	Rango
30	3	40,0	0,00	0,00	40,00	40,00	0,00
60	3	49,0	3,61	7,36	45,00	52,00	7,00
90	3	51,0	2,00	3,92	49,00	53,00	4,00
120	3	31,0	0,00	0,00	31,00	31,00	0,00
Total	12	42,75	8,49	19,85	31,00	53,00	22,00

Fuente: esta investigación.

La precisión y la repetibilidad de la técnica se estimó por la desviación estándar,  $s$ , y el coeficiente de variación (CV%), alcanzando intervalos de [0,00 – 3,61] y de [0,00 – 7,36], respectivamente. Adicionalmente la tabla permitió evidenciar, que los niveles del tiempo de extracción de 60 y 90 minutos, presentaron promedios altos en el número de COVs extraídos, en comparación con los niveles del tiempo de extracción de 30 y 120 minutos. Aspecto importante en la determinación del mejor nivel del tiempo de extracción.

Para verificar el grado de variabilidad entre los niveles de tiempos de extracción se realizó el análisis estadístico de ANOVA, que descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre los cuatro niveles del tiempo de extracción, y el otro componente dentro de cada nivel del tiempo de extracción. La Tabla 42, indica el análisis estadístico.

Tabla 42. ANOVA para la técnica DES.

Niveles del tiempo de extracción (NTE)	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre NTE	758,25	3	252,75	59,47	0,0000
Dentro de NTE	34,00	8	4,25		
Total (Corr.)	792,25	11			

Fuente: esta investigación.

La razón-F, que en este caso es igual a 59,47, es el cociente entre cuadrado medio estimado entre niveles del tiempo de extracción y el cuadrado medio estimado dentro de cada nivel del tiempo de extracción. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las promedios de los 4 niveles del tiempo de extracción con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles promedios son significativamente diferentes entre si, se realizó el test estadístico de pruebas de múltiples rangos, el cual se indican en la Tabla 43.

Tabla 43. Pruebas de múltiples rangos para la técnica DES.

Niveles de tiempo de extracción (min.)	Número de replicas	Promedio	Grupos Homogéneos
30	3	40,0	X
60	3	49,0	X
90	3	51,0	X
120	3	31,0	X

Fuente: esta investigación.

Se utilizó el proceso de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para discriminar entre los promedios de los niveles del tiempo de extracción con una probabilidad del 95%. La Tabla anterior indicó, que existen 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Es decir, son grupos que difieren significativamente entre si. Además se pudo establecer, que no existen diferencias estadísticamente significativas, entre los niveles del tiempo de extracción de 60 y 90 minutos, debido a la alineación de sus X's en un mismo grupo homogéneo, adicionalmente se pudo corroborar lo anterior, al observar los promedios del número COVs, que son cercanos para los tiempos de extracción de 60 y 90 minutos, con valores de 49 y 51 COVs, respectivamente.

Para determinar las diferencias estimadas entre los niveles del tiempo de extracción, se procedió a agrupar en pares de niveles del tiempo de extracción. Con base en el promedio individual COVs extraídos, se procedió a estimar cuáles de estos pares, son significativamente diferentes entre si, de acuerdo al límite establecido a un nivel de confianza del 95 %, siendo este valor de 3,88159. El proceso indicó, que el par de niveles del tiempo de extracción de 60 y 90 minutos, no es significativamente diferente con respecto al número de COVs extraídos por cada nivel del tiempo de extracción, siendo esta diferencia entre niveles, de -2 COVs extraídos, valor menor que el limite establecido ( $-2 < 3,88159$ ). Estas diferencias significativas, se representan con un asterisco que se encuentra al lado de 5 pares de los niveles del tiempo de extracción, e indicó que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95 % de confianza. La Tabla 44 resume estas estimaciones.

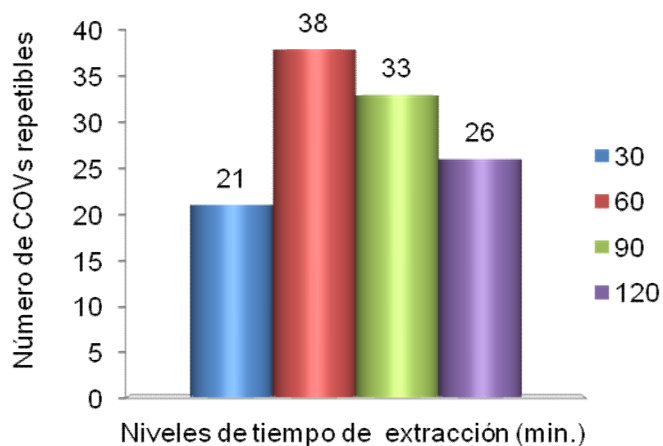
Tabla 44. Diferencias entre par de niveles de tiempo de extracción.

Pares de niveles de tiempo de extracción (min.)	Significancia	Diferencia	+/- Límites
30 - 60	*	-9,0	3,88159
30 - 90	*	-11,0	3,88159
30 - 120	*	9,0	3,88159
60 - 90		-2,0	3,88159
60 - 120	*	18,0	3,88159
90 - 120	*	20,0	3,88159

\* indica una diferencia significativa.  
Fuente: esta investigación.

Lo anterior permitió establecer, que la mejor región para la extracción de COVs de la muestra de café tostado y molido, por la técnica de destilación extracción simultánea (DES), esta entre los niveles del tiempo de extracción de 60 y 90 minutos. Si se tiene en cuenta el grado de repetibilidad y el total de los COVs extraídos, en estos dos niveles del tiempo de extracción (ver Tabla 40), se logró estimar que el nivel de 60 minutos presentó un mayor número de COVs repetibles extraídos. Concluyendo, que es el mejor nivel del tiempo de extracción para esta técnica (DES). Se especifica mas explícitamente en la gráfica 13.

Gráfica 13. Niveles de tiempo de extracción y número de COVs por la técnica DES.



Fuente: esta investigación.

4.3.3 Identificación de los COVs mayoritarios en café tostado y molido. Establecidas las condiciones óptimas de extracción de las técnicas DES y HS-SPME, se procedió a extraer los COVs de las siguientes muestras de café tostado y molido. Ver Tabla 45.

Tabla 45. Técnicas de extracción de COVs en muestras de café tostado y molido.

Código	Variedad	Zona	Origen	Técnica de extracción
Ca1H	<i>Caturra</i>	Cordillera	El Rosario (La Montana – El mango)	HS-SPME
Ca2H	<i>Caturra</i>	Occidente	Sandona (El Ingenio – M.E.)	
Co3H	<i>Castillo</i>	Norte	San José de Albán (La Viña – Bella Vista)	
Co4H	<i>Castillo</i>	Cordillera	El Rosario (La Montana – El diviso)	
Co5H	<i>Castillo</i>	Occidente	Chachagui (Casabuy)	
Ca1D	<i>Caturra</i>	Cordillera	El Rosario (La Montana – El mango)	DES
Co3D	<i>Castillo</i>	Norte	San José de Albán (La Viña – Bella Vista)	

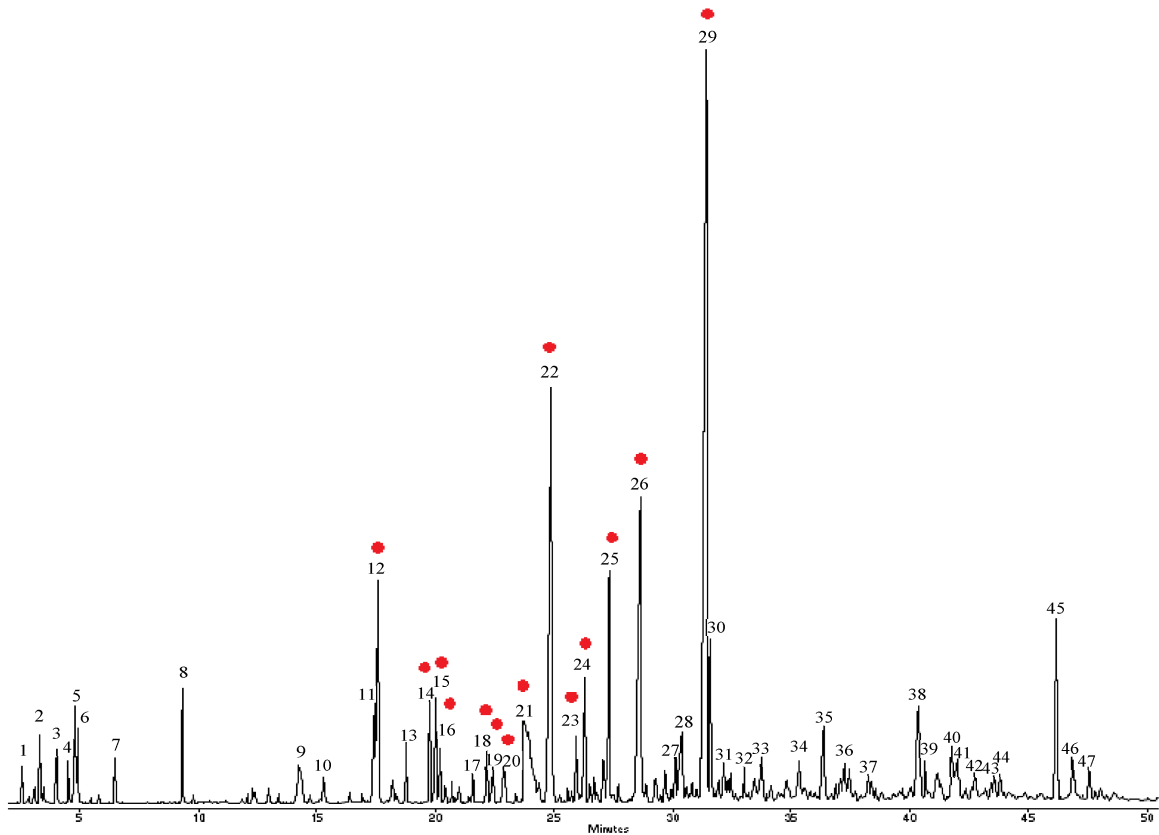
Fuente: esta investigación.

Los cromatogramas obtenidos (Anexo B), se compararon con el cromatograma del trabajo publicado por SUPELCO (ver gráfica 15), relacionado con la extracción de COVs por SPME en muestra de granos de café tostado, y analizados con la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Este estudio sirvió de base para la identificación de los COVs en las muestras anteriormente mencionadas.

Las condiciones de análisis de reportadas por SUPELCO son de: 5 g de muestra de granos de café tostado en vial de 40 mL, fibra de extracción DVB/Carboxen/PDMS, modo de extracción, temperatura y tiempo de extracción de: headspace, 65°C y 30 min, respectivamente; desorción a 270°C por 5 min, columna Supelcowax 10 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), programación de 40°C por 5 min y de 4°C/min hasta 230°C, inyección splitless/split con cierre a 0,5 min, 270°C, con liner de 0,75 mm, detector espectrometro de masas con trampa de iones, m/z = 30-350 a 0,6 sec/scan. Mientras que las condiciones de análisis utilizadas para esta investigación fueron de: 5 g de muestra de café tostado y molido, en vial de 40 mL, fibra de extracción DBV/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS, modo de extracción, temperatura y tiempo de extracción de: headspace, 71°C y 60 min, respectivamente; desorción a 270°C por 5 min, columna DB-wax (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), programación de 40°C por 5 min y de 4°C/min hasta 230°C, inyección splitless/split con cierre a 0,5 min, 270°C, con liner de 0,75 mm, detector de ionización en llama (FID).

A partir de la extracción por SPME, se logró separar 47 COVs (ver gráfica 14), sus tiempos de retención e índices de Kovat's, se especifican en el Anexo C.

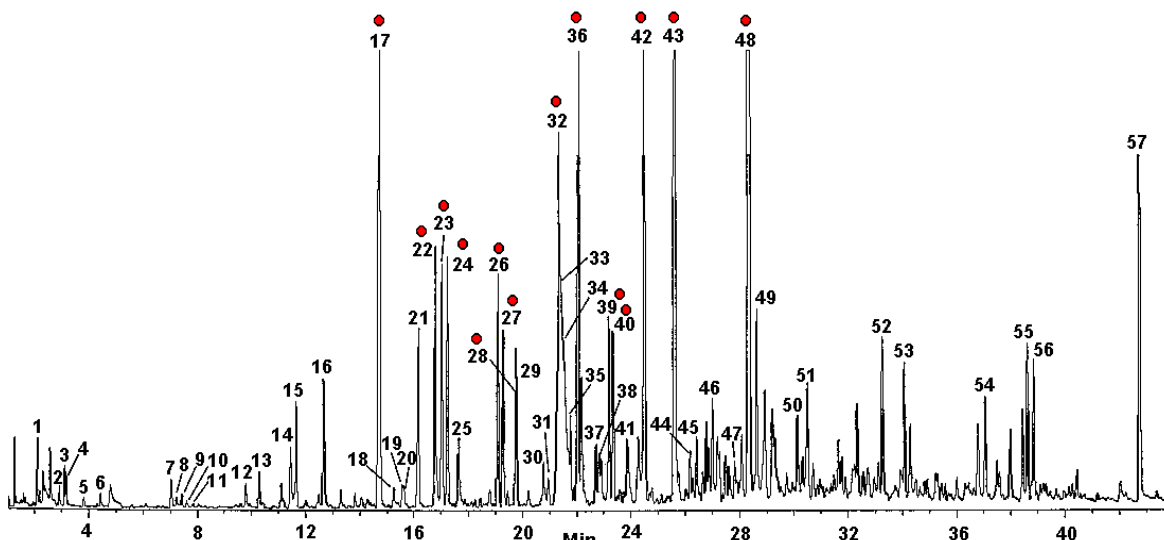
Gráfica 14. Cromatograma de COVs en muestra de café variedad *Caturra* extraído por SPME-GC-FID.



Fuente: esta investigación

Gráfica 15. Cromatograma de Supelco para COVs de granos de café tostado por SPME-GC-MS.<sup>125</sup>

<sup>125</sup> MINDRUP Ray, SHIREY E. Robert. 2001. Improved performance of SPME fibers and applications Supelco, Supelco Park, Bellefonte, PA, 16823 USA. 2001



Fuente: SUPELCO. Productos cromatográficos para análisis y purificación. Catálogo 2000 p. 510

En los cromatogramas anteriores se marcó con círculo rojo las señales cromatográficas (COVs) que presentaron una alta similitud, con respecto a las muestras de café de esta investigación. Los cuales se detallan de forma más precisa en la Tabla 46, los demás COVs identificados por Supelco se relacionan en el Anexo D.

Tabla 46. COVs identificados por GC-MS de Supelco en muestra de café tostado.

Nº pico	Compuesto identificado
17	Metil Pirazina
22	2,5-Dimetilpirazina
23	2,3-Dimetilpirazina
24	2-Etilpirazina
26	2-Etil-6-Metilpirazina
27	2-Etil-5-Metilpirazina
28	Trimetilpirazina
32	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina
36	2-Furancarboxaldehído
39	Furfural Formiato
40	2-Furonil Etanona
42	Furanmetanol Acetato
43	5-Metil-2-Furancarboxaldehído
48	Furanmetanol

Fuente: SUPELCO. Productos cromatográficos para análisis y purificación. Catálogo 2000 p. 510  
 Para identificar los COVs presentes en las muestras, se procedió a registrar los tiempos de retención de los COVs extraídos por las dos técnicas, que en su orden se enumeran de la siguiente manera. Ver Tabla 47.



Tabla 47. Repetibilidad y precisión de la técnica cromatográfica.

N° Pico	Tiempos de retención de cada muestra de café tostado y molido*							Promedio	s	CV %
	Ca1H	Ca2H	Co3H	Co4H	Co5H	Ca1D	Co3D			
1	17,587	17,545	17,583	17,574	17,533	17,591	17,457	17,553	0,048	0,271
2	19,799	19,745	19,799	19,786	19,741	19,796	19,657	19,760	0,052	0,263
3	20,053	19,990	20,049	20,028	19,982	20,021	19,907	20,004	0,051	0,253
4	20,220	20,170	20,216	20,203	20,166	20,221	20,107	20,186	0,042	0,207
5	22,178	22,124	22,182	22,161	22,120	22,129	22,080	22,139	0,037	0,166
6	22,411	22,345	22,416	22,395	22,349	22,354	22,265	22,362	0,052	0,233
7	22,895	22,836	22,899	22,882	22,836	22,860	22,749	22,851	0,052	0,226
8	23,803	24,032	23,786	23,811	23,953	24,090	24,190	23,952	0,159	0,664
9	24,890	24,836	24,898	24,894	24,874	25,110	24,823	24,904	0,096	0,384
10	25,944	25,919	25,940	25,940	25,915	25,953	26,057	25,953	0,048	0,185
11	26,273	26,228	26,269	26,273	26,236	26,526	26,657	26,352	0,169	0,642
12	27,378	27,336	27,361	27,373	27,344	27,498	27,340	27,376	0,056	0,206
13	28,657	28,611	28,678	28,686	28,628	28,768	28,806	28,690	0,072	0,251
14	31,456	31,361	31,407	31,390	31,352	31,509	31,456	31,419	0,057	0,183

\* Cada muestra de ensayo se realizó por duplicado.  
Fuente: esta investigación.

Los parámetros estadísticos de desviación estándar, s, y coeficiente de variación (CV %), permitió verificar el grado de precisión y repetibilidad de la técnica cromatográfica, con valores de 0,037-0,169 y 0,166-0,664 para s, y el CV %, respectivamente.

A partir del tiempo de retención promedio de cada compuesto, se realizó los cálculos del índice de Kovat's para cada COV, utilizando la ecuación 7; esto permitió una identificación aproximada de cada uno de los compuestos.

$$I_k = 100n + \left( \frac{T_{Rx} - T_{Rn}}{T_{RN} - T_{Rn}} \right) \times 100 (N - n)$$

Ecuación 7

Dónde:

$I_K$  = índice de Kovat's

$x$  = analito problema

$n$  = número de átomos de carbono del alcano que eluye antes de  $x$

$N$  = número de átomos de carbono del alcano que eluye después de  $x$

$T_{Rx}$  = tiempo de retención ajustado del analito  $x$ .

$T_{Rn}$  = tiempo de retención ajustado del n-alcano que eluye antes de  $x$ .

$T_{RN}$  = tiempo de retención del n-alcano que eluye después de  $x$ .<sup>126</sup>

Los índices de Kovat's calculados para cada COV, se compararon bibliográficamente con datos publicados en la literatura científica (ver Anexo E). En la Tabla 48, se relaciona los COVs identificados por índice de Kovat's, para las muestras de café analizadas.

Tabla 48. Identificación de los COVs mayoritarios con GC-FID en muestra de café arábico, a partir de sus índices de Kovat's.

---

<sup>126</sup> ÁLVAREZ, M., A. T. Aislamiento, purificación e identificación de los principios tóxicos alcaloídicos en plantas del genero crotalaria y alimento contaminado para aves. UIS. Bucaramanga, 2004 p. 135

N°	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ik Experimental	Ik de base de datos *
1	Metil Pirazina	17,553	1262	(1243 – 1288) <sup>5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21</sup>
2	2,5-Dimetilpirazina	19,760	1320	(1302 – 1347) <sup>8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18</sup>
3	2,3-Dimetilpirazina	20,004	1326	(1306 – 1372) <sup>4, 8, 11, 12, 14, 16, 18, 19</sup>
4	2-Etilpirazina	20,186	1331	(1302 – 1359) <sup>7, 10, 11, 13, 16, 17, 19, 21, 22</sup>
5	2-Etil-6-Metilpirazina	22,139	1382	(1350 – 1415) <sup>2, 10, 11, 12, 16, 17, 20, 23, 24, 25, 26</sup>
6	2-Etil-5-Metilpirazina	22,362	1388	(1356 – 1453) <sup>9, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 23, 24</sup>
7	Trimetilpirazina	22,851	1401	(1370 – 1416) <sup>2, 10, 16, 17, 18, 20, 25, 27, 28</sup>
8	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	23,952	1433	(1415 – 1470) <sup>7, 9, 17, 23, 26, 27, 41, 42, 43</sup>
9	2-Furancarboxaldehído	24,904	1462	(1410 – 1486) <sup>1, 2, 7, 8, 10, 11, 12, 29, 30, 31, 32, 33, 34</sup>
10	Furfural Formiato	25,953	1492	(1487 – 1524) <sup>7, 10, 13, 14</sup>
11	2-Furonil Etanona	26,352	1504	(1497 – 1519) <sup>7, 10, 13, 14</sup>
12	Furanmetanol Acetato	27,376	1534	(1463 – 1542) <sup>8, 10, 35, 36, 37, 38</sup>
13	5-Metil-2-Furancarboxaldehído	28,690	1573	(1495 – 1589) <sup>2, 10, 11, 13, 39</sup>
14	Furanmetanol	31,419	1660	(1590 – 1666) <sup>2, 7, 10, 11</sup>

Fuente: esta investigación.

\* Intervalos de índices de Kovat's, a partir de la Base de datos de National Institute of Standards and Technology (NIST).

4.3.4 Comportamiento de los COVs mayoritarios en las muestras de café. Identificados los COVs mayoritarios, se procedió a estimar el área de cada señal cromatográfica presente en cada muestra del análisis (ver Tabla 49).

Tabla 49. Áreas cromatográficas (GC-FID) de los COVs mayoritarios.

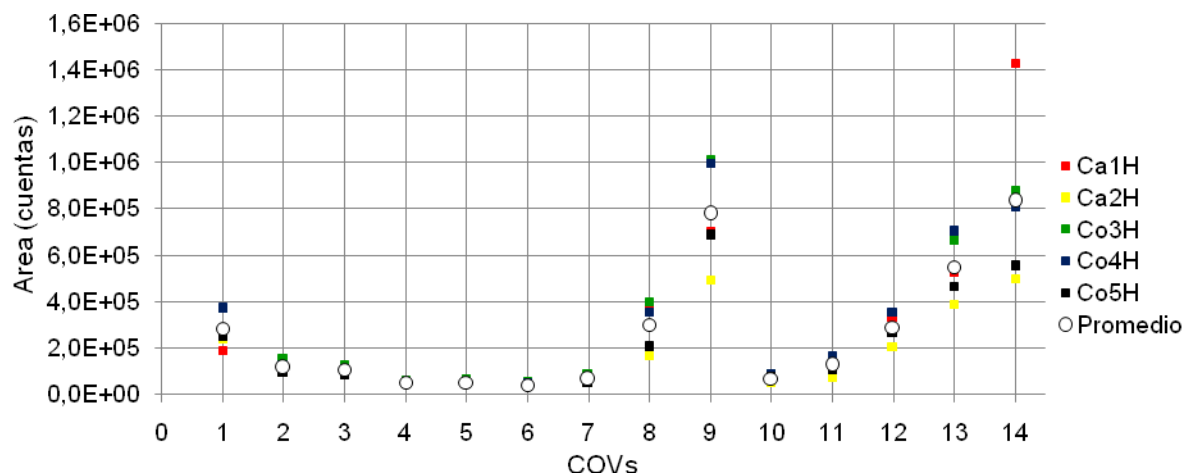
COV	Áreas (cuentas)
-----	-----------------

	HS-SPME						DES		
	Ca1H	Ca2H	Co3H	Co4H	Co5H	Promedio	Ca1D	Co3D	Promedio
1	188331	235359	369673	367801	249396	282112	13537	25803	19670
2	117419	95712	147258	119812	92763	114593	3762	7491	5627
3	114302	88992	129616	111263	80703	104975	6813	7287	7050
4	45586	45781	60331	50988	43444	49226	1454	3118	2286
5	43829	45719	68075	49735	44703	50412	2433	2662	2548
6	38894	34036	54111	41939	34855	40767	1645	2183	1914
7	62776	49806	88930	68294	48182	63598	2356	5137	3747
8	369344	166297	400372	354598	203008	298724	2706	2189	2448
9	701231	490680	1011033	997207	683395	776709	25240	67389	46315
10	60854	48896	80133	80835	69607	68065	501	11537	6019
11	137431	70461	145908	166697	103904	124880	7700	3381	5541
12	333779	204700	283597	353636	264303	288003	13734	3981	8858
13	523164	385814	660876	700296	466741	547378	24526	39585	32056
14	1426848	497796	881011	807439	550333	832685	29516	32921	31219

Fuente: esta investigación.

El área promedio para cada técnica de extracción (SPME y DES), permitió establecer un comportamiento general para cada técnica, siendo similar entre las dos técnicas, con respecto a los COVs presentes en las muestras, en las gráficas de dispersión 16 y 17, se puede evidenciar una diferencia significativa de cada compuesto en las diferentes muestras analizadas.

Gráfica 16. Variación de COVs para la técnica SPME en muestras de café.



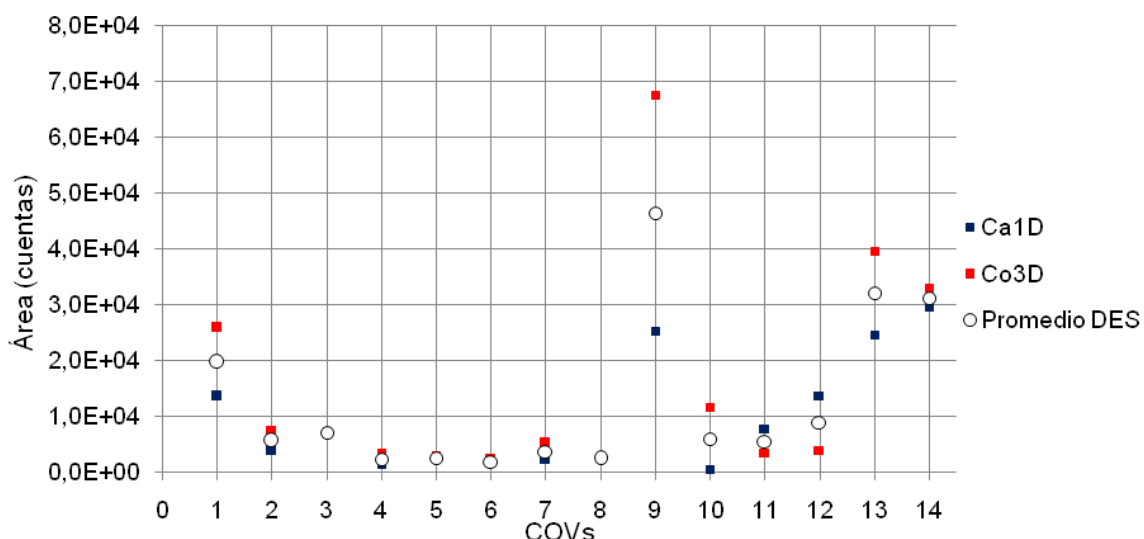
Fuente: esta investigación.

En la gráfica 16, se pudo observar, que los COVs: 2 (2,5-dimetilpirazina), 3 (2,3-dimetilpirazina), 4 (2-etilpirazina), 5 (2-etil-6-metilpirazina), 6 (2-etil-5-metilpirazina), 7 (trimetilpirazina) y 10 (furfural formiato) no presentaron variación

de área significativa entre las muestras. Caso contrario se observó con los COVs: 1 (metilpirazina), 8 (2-etil-3,5-dimetilpirazina), 9 (2-furancarboxaldehído), 11 (2-furonil etanona), 12 (furanmetanol acetato), 13 (5-metil-2-furancarboxaldehído) y 14 (furanmetanol); donde existen incrementos y descensos de áreas, con respecto al promedio de la técnica de extracción (SPME). Siendo altamente significativa en los COVs 9, 13 y 14.

La extracción de COVs a partir de la técnica DES, presentó diferencias importantes con respecto a las áreas cromatográficas, los COVs: 1 (metilpirazina), 9 (2-furancarboxaldehído), 10 (furfural formiato), 12 (furanmetanol acetato), y 13 (5-metil-2-furancarboxaldehído). Ver grafico 17.

Gráfica 17. Variación de COVs para la técnica DES en muestras de café.



Fuente: esta investigación.

Lo anterior, permitió establecer que ambas técnicas son importantes en la extracción de los COVs para esta matriz. A partir de la extracción de los COVs por la técnica (SPME), se procedió a verificar la variación de los COVs en cada muestra de café analizada, utilizando el término de concentración relativa (%) para cada COV.

Tabla 50. Concentración relativa (%) de los COVs mayoritarios en muestras de café *arábico* por SPME-GC-FID.

N° Pico	Compuesto	Concentración relativa (%)					Umbral de detección [ppm]*
		Ca1H	Ca2H	Co3H	Co4H	Co5H	
1	Metil Pirazina	2,41	5,38	4,60	4,73	4,45	105
2	2,5-Dimetilpirazina	1,50	2,19	1,83	1,54	1,66	35
3	2,3-Dimetilpirazina	1,46	2,03	1,61	1,43	1,44	2,5
4	2-Etilpirazina	0,58	1,05	0,75	0,66	0,78	21
5	2-Etil-6-Metilpirazina	0,56	1,05	0,85	0,64	0,80	10
6	2-Etil-5-Metilpirazina	0,50	0,78	0,67	0,54	0,62	0,1
7	Trimetilpirazina	0,80	1,14	1,11	0,88	0,86	9
8	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	4,73	3,80	4,98	4,56	3,63	15
9	2-Furancarboxaldehído	8,98	11,22	12,58	12,83	12,20	5
10	Furfural Formiato	0,78	1,12	1,00	1,04	1,24	0,15
11	2-Furonil Etanona	1,76	1,61	1,82	2,14	1,86	80
12	Furanmetanol Acetato	4,27	4,68	3,53	4,55	4,72	5,4
13	5-Metil-2-Furancarboxaldehído	6,70	8,82	8,22	9,01	8,33	20
14	Furanmetanol	18,27	11,38	10,96	10,39	9,83	5

Fuente: esta investigación

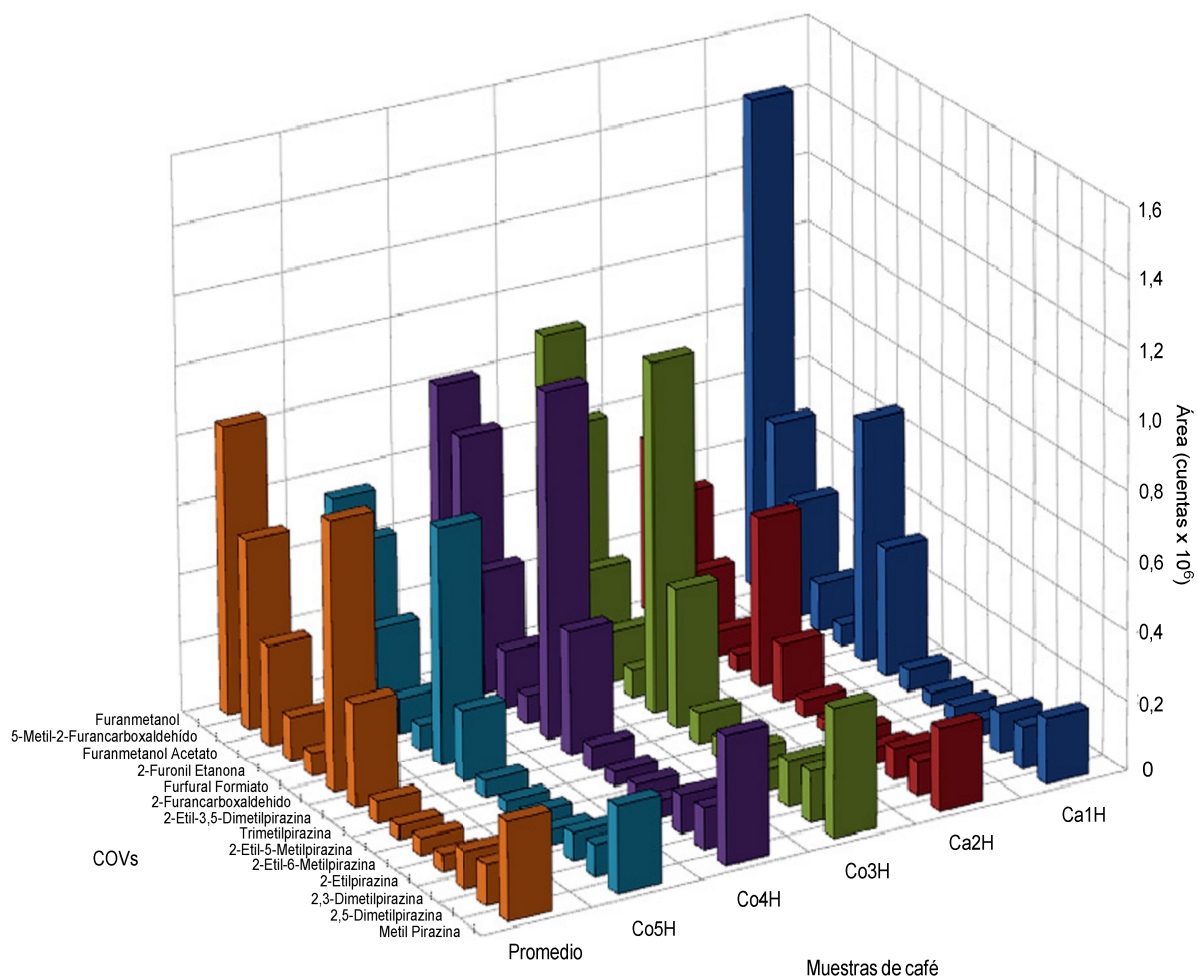
\* Umbral de detección [ppm]. Ivon Flament. (2002). Coffee flavor chemistry. En agua a 25 °C, y otras soluciones.

La Tabla 50, permitió evidenciar que los COVs 2-furancarboxaldehído y furanmetanol, presentaron una mayor concentración relativa, indicando como COV importante para la variedad *Caturra* al furanmetanol y el 2-furancarboxaldehído para la variedad *Castillo*. De acuerdo a datos publicados en Ivon Flament, 2002,<sup>127</sup> se ha establecido que estos compuestos presentaron umbrales de detección de su aroma, a una concentración de 5 ppm, siendo una concentración relativamente baja y que pueden contribuir en la percepción final de aroma.

Las diferencias significativas, con respecto a su concentración relativa (%), de los COVs identificados, se logró apreciar graficando su comportamiento, debido a su área reportada por los cromatogramas obtenidos de las muestras analizadas. Ver grafico 18.

Gráfica 18. Comportamiento de COVs en muestras de café extraídos por SPME-GC-FID.

<sup>127</sup> FLAMENT, Ivon. Coffee flavor chemistry. Wiley & Sons. 2002 p. 81-343



Fuente: esta investigación.

La gráfica 18, permitió visualizar 6 COVs mayoritarios que difieren significativamente entre sí, al analizar muestras de café procedentes de diferentes regiones cafeteras, y de diferentes variedades (*Caturra* y *Castillo*). En la Tabla 51, se ordenó los COVs en orden decreciente con respecto a su área cromatográfica. El proceso permitió determinar que la variedad *Caturra* presentó como COV mayoritario el compuesto furanmetanol, mientras que la variedad *Castillo* fue el compuesto 2-furancarboxaldehído. Adicionalmente se pudo evidenciar la variación en los COVs: 2-etil-3,5-dimetilpirazina, furanmetanol acetato y metilpirazina, al analizar muestras de café procedentes de diferentes regiones cafeteras.

Tabla 51. COVs variables en las muestras de café analizadas.

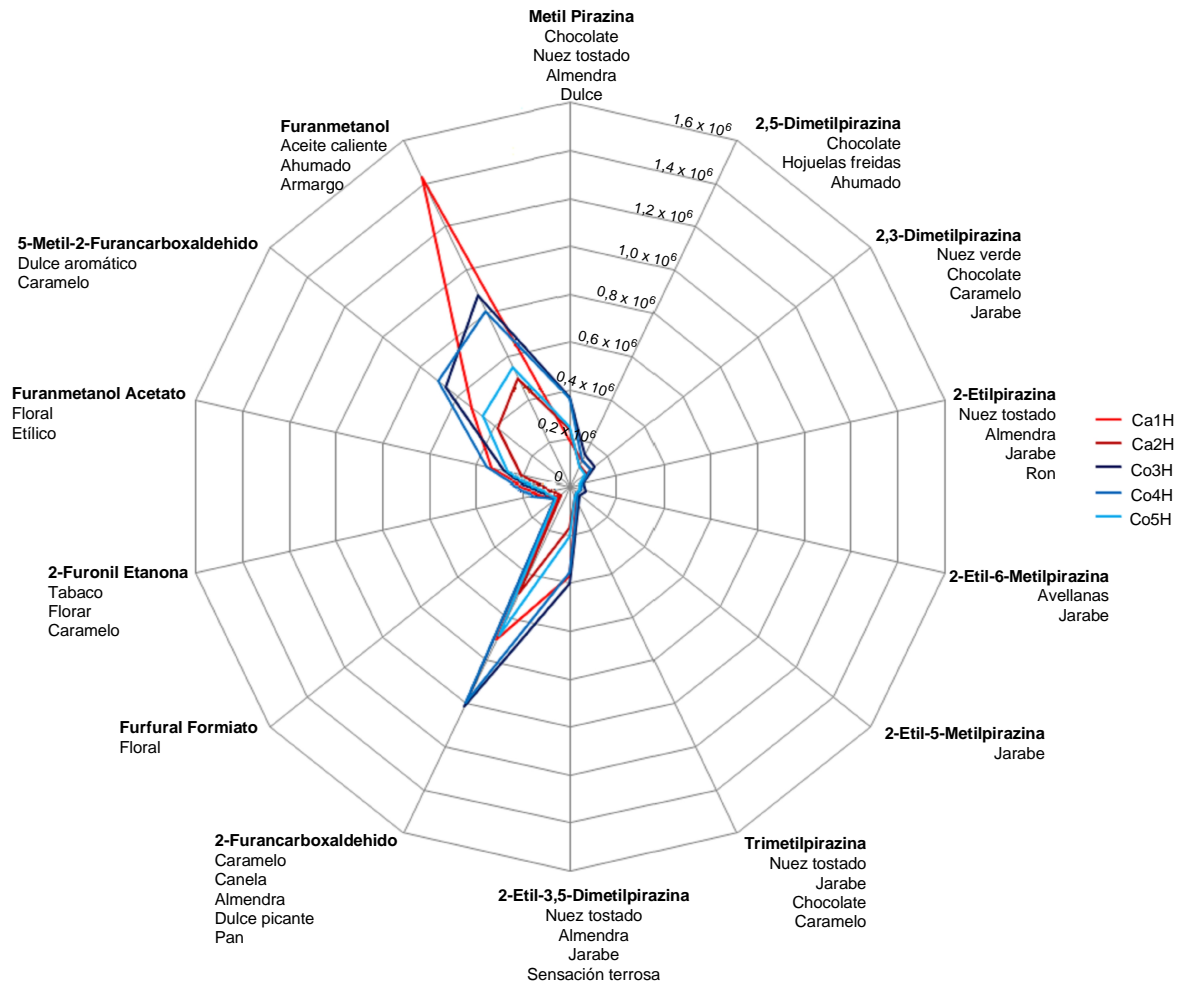
Orden	Muestras de café tostado y molido				
	Ca1H	Ca2H	Co3H	Co4H	Co5H
1	Furanmetanol	Furanmetanol	2-Furan carboxaldehido	2-Furan carboxaldehido	2-Furan carboxaldehido
2	2-Furan carboxaldehido	2-Furan carboxaldehido	Furanmetanol	Furanmetanol	Furanmetanol
3	5-Metil-2-Furan carboxaldehido	5-Metil-2-Furan carboxaldehido	5-Metil-2-Furan carboxaldehido	5-Metil-2-Furan carboxaldehido	2-Furan carboxaldehido
4	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	Metil Pirazina	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	Metil Pirazina	Furanmetanol Acetato
5	Furanmetanol Acetato	Furanmetanol Acetato	Metil Pirazina	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	Metil Pirazina
6	Metil Pirazina	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	Furanmetanol Acetato	Furanmetanol Acetato	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina

Fuente: esta investigación.

Estos comportamientos, permitió realizar la gráfica general (ver gráfica 19) para las cinco muestras de café, fundamentada en las diferencias significativas respecto a sus áreas cromatográficas de los COVs identificados y sus descripciones odoríficas reportadas por la literatura científica (Tabla 52).

Gráfica 19. COVs en muestras de café analizadas y sus descripciones odoríficas.





Fuente: esta investigación.

Tabla 52. COVs y sus descripciones odoríficas en las muestras de café.

COVs	Descripción odorífica	Referencias *
Furanmetanol	Caramelo, aceite caliente, carne ahumada, amargo	– Oscar Gonzalez-Rios, y Otros. <sup>a</sup> – Mayer, F., Czerny, M. & Grosch, W. <sup>b</sup> – Mayer, F., Czerny, M. & Grosch, W. <sup>c</sup>
2-Furan carboxaldehido	Caramelo, canela, almendra, dulce picante, pan,	– Chahan Yeretizian, Alfons Jordan, Werner Lindinger. <sup>d</sup> – M. Akiyama, K. Murakami, y Otros. <sup>e</sup> – Mayer, F., Czerny, M. & Grosch, W. <sup>c</sup>
5-Metil-2-Furan carboxaldehido	Caramelo, dulce aromático	– Oscar Gonzalez-Rios, y Otros. <sup>a</sup> – Semmelroch, P. & Grosch, W. <sup>f</sup>
2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	Nuez tostada, almendra, jarabe, carne, sensación terrosa,	– Barbara d'Acampora Zellner, y Otros. <sup>g</sup> – Semmelroch, P. & Grosch, W. <sup>f</sup> – M. Akiyama, K. Murakami, N. y Otros. <sup>h</sup> – K. Specht, W. Baltes. <sup>i</sup> – W. Grosch Deutsche y Otros. <sup>j</sup>
Furanmetanol Acetato	Nuez tostada, sensación floral y etílica	– Oscar Gonzalez-Rios, Mirna L. y Otros. <sup>k</sup> – Semmelroch, P. & Grosch, W. <sup>l</sup> – W. Grosch Deutsche y Otros. <sup>j</sup>
Metil Pirazina	Nuez tostado, chocolate, almendra, dulce, amargo débil	– Oscar Gonzalez-Rios, Mirna L. y Otros. <sup>k</sup> – Semmelroch, P. & Grosch, W. <sup>l</sup> – Mayer, F., Czerny, M. & Grosch, W. <sup>b</sup> – Tressl R. <sup>m</sup>

Fuente: Ivon Flament. (2002). Coffee flavor chemistry.

- a) Oscar Gonzalez-Rios, Mirna L. Suarez-Quiroz, y Otros. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 289–296.
- b) Mayer, F., Czerny, M. & Grosch, W. (1999) Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 242-50.
- c) Mayer, F., Czerny, M. & Grosch, W. (2000) Sensory study on the character impact aroma compounds of coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 212-276.
- d) Chahan Yeretizian, Alfons Jordan, Werner Lindinger. Analysing the headspace of coffee by proton-transfer-reaction mass-spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 223–224 (2003) 115–139.
- e) M. Akiyama, K. Murakami, Y. Hirano, M. Ikeda, K. Iwatsuki, A. Wada, K. Tokuno, M. Onishi, and H. Iwabuchi. Characterization of Headspace Aroma Compounds of Freshly Brewed Arabica Coffees and Studies on a Characteristic Aroma Compound of Ethiopian Coffee. Vol. 73, Nr. 5, 2008. *Journal of Food Science* C335- C346.
- f) Semmelroch, P. & Grosch, W. (1996) Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 537-43.
- g) Barbara d'Acampora Zellner, Paola Dugo, Giovanni Dugo, Luigi Mondello. Gas chromatography–olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A*, 1186 (2008) 123–143.
- h) M. Akiyama, K. Murakami, N. Ohtani, K. Iwatsuki, K. Sotoyama, A. Wada, K. Tokuno, H. Iwabuchi, K. Tanaka, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1961.
- i) K. Specht, W. Baltes, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2246.
- j) W. Grosch Deutsche y colaboradores 2001. *Chemistry III: Volatile Compounds*. Chapter 3. Germany 2001. Pág. 68-90.
- k) Oscar Gonzalez-Rios, Mirna L. Suarez-Quiroz, y Otros. Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 297–307
- l) Semmelroch, P. & Grosch, W. (1995) Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 310-13.

- m) Tressl R. (1989). Formation of flavor components in roasted coffee. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 409, 285-301.

Las valoraciones sensoriales de catación, emitidas por el grupo de catación del Laboratorio del Café perteneciente a la Gobernación de Nariño (ver Tabla 53), permitieron establecer, que existen percepciones diferentes al valorar sensorialmente, muestras procedentes de regiones cafeteras distintas, y de variedades de café diferentes (*Caturra* y *Castillo*).

Tabla 53. Valoraciones sensoriales de las muestras de café.

Muestras de café	Valoración sensorial
Ca1	Canela, nuez, vainilla
Ca2	Chocolate, canela
Co3	Caramelo, arequipe, galleta
Co4	Fruta, manzana, canela, naranja
Co5	Caramelo, chocolate, mandarina, dulce, vainilla

Fuente: Laboratorio del Café. Gobernación de Nariño.

Las características sensoriales del proceso de catación mas sobresalientes, se expresaron en sensaciones odoríficas a: caramelo, canela, nuez, fruta, chocolate, vainilla y mandarina; para las muestras analizadas. A partir de las descripciones odoríficas referenciadas para los COVs identificados, se pudo establecer que varios de estos, presentan características odoríficas iguales o muy similares, a las sensaciones sensoriales estipuladas por los catadores. Estas características odoríficas y las estructuras químicas para cada COVs, se indican en el Anexo F.

## 5. CONCLUSIONES

Se encontró cantidades promedio de cafeína en café variedad *Caturra*, con valores de 1,281% y 1,080% para las regiones cafeteras del Norte y Occidente del departamento de Nariño, respectivamente. Permitiendo establecer que existen diferencias significativas en la concentración de cafeína para las dos regiones. Igualmente, se determinó el contenido promedio de cafeína en café variedad *Castillo*, con valor de 1,082%, proveniente de los municipios de Buesaco y Cumbitara del departamento de Nariño.

El contenido promedio de taninos totales expresados en equivalentes a ácido tánico (EAT) para café variedad *Caturra*, se encontró con valores de 3,82 % y 3,99% para las regiones Norte y Occidente del departamento de Nariño, estos datos promedio evidencian que existe una diferencia significativa en el contenido de este tipo de compuestos para las dos regiones cafeteras. Igualmente se determinó el contenido promedio en taninos totales para café variedad *Castillo* con valor de 3,74%, proveniente de los municipios de Buesaco y Cumbitara del departamento de Nariño.

Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de compuestos orgánicos volátiles en muestra de café, para la técnica de Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), estableciendo como niveles óptimos de extracción los siguientes: 71 °C, 60 minutos y la fibra DBV/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS.

Se estableció como mejor condición de extracción de compuestos orgánicos volátiles, el nivel de 60 minutos, como tiempo extracción por destilación extracción simultánea (DES), para muestra de café.

Se identificaron tentativamente 14 compuestos orgánicos volátiles, extraídos por las técnicas HS-SPME y DES, a partir de la técnica de Cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización en llama (GC-FID). Estos compuestos son activos olfativamente.

A partir de la concentración relativa del compuesto más abundante, la técnica de extracción de Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), permitió diferenciar muestras de café variedad *Caturra* de las muestras de café variedad *Castillo*. Se determinó que para la variedad *Caturra*, el compuesto en mayor concentración es el Furanmetanol, y para la variedad *Castillo*, el 2-Furancarboxaldehído.

## 6. RECOMENDACIONES

Emplear técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de cafeína y taninos totales en muestras de café arábico tostado y molido, variedades *Caturra* y *Castillo* procedentes de las regiones cafeteras del departamento de Nariño.

Mediante técnicas de análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), identificar los COVs de muestras de café arábico tostado y molido, variedades *Caturra* y *Castillo* procedentes de las regiones cafeteras del departamento de Nariño.

Es de gran interés que en posteriores estudios no solo se incremente el número de muestras y variedades de café, sino también utilizar paquetes estadísticos más robustos como el MATLAB que permitan relacionar las características químicas con la calidad del café.

## BIBLIOGRAFIA

AESCHBACHER, H. U, y Colaboradores. Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee. Food Chem. Toxicol. 1989. 227-232 p.

\*AGROBANCO. Área del desarrollo. Cultivo del café. Perú. 2007. 19 p.

ALVARADO A., G. Mejoramiento de las características Agronómicas de la variedad Colombia mediante la variación en su composición. Cenicafé. Avances Técnicos. 2002. 304 p.

ÁLVAREZ, M., A. T. Aislamiento, purificación e identificación de los principios tóxicos alcaloídicos en plantas del genero crotalaria y alimento contaminado para aves. UIS. Bucaramanga. 2004. 135 p.

ALPENDURADA, M.F. J. Chromatography. J.Sci. Food Agric. 889. 2000. 3 p.

\*ASOCIACION ESPAÑOLA DE FARMACEUTICOS DE LA INDUSTRIA (A.E.F.I.). Validación de métodos analíticos. 2001. 315 p.

AZODANLOU, R, y Colaboradores. A new concept for the measurement of total volatile compounds of food. zLebensmuntersforsch A. 208. 1999. 245-258 p.

BÄHRE, F., M, H.G. New non-volatile acids in coffee. Dtsche Lebensm.-Rundsch., 95, 1999. 399-402 p.

BALZER, H. H. Acids in Coffee Kraft Foods. Germany. 2001. 18-32 p.

BELITZ H.D, GROSCH W. Food Chemistry. Owen R. Fennema. USA.1999. 432 p.

BICCHI, C. P y Colaboradores. Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid Phase Microextraction. J. Agric. Food Chem. 45: 1997. 4680-4686 p.

BLANCH, M M, G P. y colaboradores. Dispositivo para la separación y concentración de componentes volátiles de muestras termosensibles por destilación y extracción simultanea mediante disolventes orgánicos. Madrid, ES. 16.12.1993. 2 p.

BONDAROVICH, H.A., y Colaboradores. Volatile constituents of coffee. Pyrazines and other compounds. J. Agric. Food. Chem. 15. 1967. 1093-1099 p.

BOULEVARD, W.. Official methods of analyses 955.35 of the association of official agricultural chemists (AOAC). 1995. 14 p.

CAMUSSONI Georgina y C. E. Determinación comparativa del contenido de polifenoles en vinos tintos de origen argentino. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Argentina. 2004. 151-159 p.

CASTILLO Z, J. Mejoramiento genético del café en Colombia. Cenicafé, 1990. 46-53 p.

CASTRO C., B.L.; CORTINA G., H. Evaluación de resistencia a *Caratocystis fimbriata* Eil. Halst. Hunt. En progenies F5 de café Borbón resistente X *Caturra*. Cenicafe 60 (2). 2009. 125 p.

CLARKE R, y Colaboradores. Coffee Recent Developments. Blackwell Science Ltd. 2001. 266 p.

CORTÉS. Rubén. Cromatografía de gases, disponible en Internet: [www.relap.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/gas.htm](http://www.relap.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/gas.htm).

COSTA Freitas, A. M.; y Colaboradores. Comparison of Two SPME Fibers for Differentiation of Coffee by Analysis of Volatile Compounds. Chromatographia. Nov. 54 (9/10): 2001. 647-652 p.

DÍAZ C. Y. Cuantificación de cafeína en café nacional tostado y molido comercializado en la ciudad de Guatemala. Guatemala. Química Farmacéutica. 2007. 40 p.

DÍAZ J. A. y ASENCIOS R. S. Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. Perú. 2008. 41 p.

DUQUE O. y Colaboradores. Nuevas variedades de café: Análisis Económico. Disciplina de Economía Agrícola, Cenicafé. Colombia. 2005. 22 p.

ENGELHARDT, U.H. y Colaboradores. , H.G. Säuren des Kaffees. XII. Anteil einzelner Säuren am sauren titrierbaren Gesamtsäure. Lebensm. Unters Forsch., 181. 1985b. 206-209 p.

FLAMENT, I. Coffee, cacao and tea. In: Volatile Compounds in Foods and Beverages. Ed. H. Maarse. 1991. 617-669 p.

\*FEDERACIÓN. NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. Manual del cafetero colombiano. 1979. 173 p.

FRIEDEL, P., y Colaboradores. Some constituents of the aroma complex of coffee. J. Agric. Food Chem. 1971. 530-532 p.

GALLEGO G. Juan C. Proceso de calificación y sello de calidad en relación con el origen. FAO y el IICA. 2007. 47 p.

GEE, J.M. I.T. Johnson. Polyphenolic compounds : Interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem.* 8, 2001. 1245-1255 p.

GIANTURCO, M.A., GIAMMARINO, A.S. & Pitcher, R.G. The structures of five cyclic diketones isolated from coffee. *Tetrahedron.*1963. 2051-2059 p.

GOLDMAN, I.M., y Colaboradores. Aroma research. About the aroma of coffee. II. Pyrazines and pyridines. *Helv. Chim. Acta*, 50. 1967. 694-705 p.

GOTTELAND Martín. Algunas verdades sobre el café. *Rev. chil. nutr.* v.34 n.2. 2007. 105-115 p.

GOTTELAND Martín, De Pablo Saturnino. Café y salud. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. 2008. 1-7 p.

GROSCH W. Chemistry III: Volatile compounds. Germany. 2001. 68-89 p.

GROSCH, W. Which compounds are preferred by the olfactory sense in heated foods? *Lebensmittelchemie*, 52, 1998b. 143-146 p.

GUTIÉRREZ M. A. Café, antioxidantes y protección a la salud. *MEDISAN.* 6(4), 2002. 72-81 p.

HAGERMAN, A. y Colaboradores. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem*, 46, 1998. 1887-1892 p.

HOFMANN, T. Influence of L-cysteine on the formation of bitter-tasting aminohexose reductones from glucose and Lproline: identification of a novel furo[2,3-b]thiazine. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999. 4763-4768 p.

HOLSCHER, H. & STEINHART, H. Aroma compounds in green coffee. in: *Food Flavors-Generation, analysis and process influence.* Elsevier Science, Amsterdam. 1995. 785-803 p.

HOLSCHER, W y Colaboradores Identification and sensorial evaluation of aroma-impact-compounds in roasted colombian coffee. *Cafea, Cacao, Thea*, 34, 1990. 205-212 p.

HOMMA, S. Chemistry II: Non-volatile compounds, part II. Ochanomizu University. Tokyo. Japon. 2001. 266 p.

HUGHES, W.J., & T.M T. Determination of organic acids and sucrose in roasted coffee by capillary gas chromatography. *J. Food Sci.*, 52, 1987. 1078-1083 p.



ILLY, A R Viani. Espresso coffee. The Chemistry of Quality, 1ra ed.; Academic Press: Londres, 1995. 255 p.

JORDÁN B María J. Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. Efecto del procesado industrial. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Universidad de Murcia. 1999. 56-57 p.

LAKENBRINK C, y Colaboradores. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. J. Agric. Food Chem. 48, 2000. 2848-2852 p.

LASTRA V, Humberto y Colaboradores. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Rev Cubana Plant Med, 5(1), 2000. 17-22 p.

LELOUP, V. & R. Liardon. Analytical characterization of coffee carbohydrates. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Montpellier), Paris, France. 1993. 863-865 p.

LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. R. J. Biol. Chem. 193: 1951. 265-275 p.

MARBROUK, A.F. & F.E Deatherage. Organic acids in brewed coffee. Food Tech, 10, 1956. 194-197 p.

MACREA, R. In Coffee, Vol. 1: Chemistry; Clarke, R. J.; Macrea, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, U.K., 1985. 304 p.

MACRAE R. Nitrogenous compounds. In: Coffee, Vol. 1, Chemistry. Elsevier Applied Science, London and New York 1985. 115-151 p.

MATTILA P, H J, T. R. Phenolic acids in berries, fruits and beverages. J Agric Food Chem, 54, 2006. 7193-7199 p.

MAYER, F, y Colaboradores. Sensory study on the character impact aroma compounds of coffee beverage. Eur. Food Res. Technol. 211, 2000. 212-276 p.

MELGAREJO Martha. El verdadero poder de las bebidas energéticas. Revista Enfasis Alimentación Nº 6 Diciembre. 2004. 1-6 p.

MINDRUP Ray, SHIREY E. Robert. Improved performance of SPME fibers and applications Supelco, Supelco Park, Bellefonte, PA, 16823 USA. 2001. 8 p.

MONTOYA O., G. E. y Colaboradores. Análisis de secuencias de genes de *Coffea arabica* var. *Caturra*. Cenicafe 57 (2). Colombia. 2006. 79-87 p.

MORENO, H. y Colaboradores. Obtención de cafeína a partir de café verde empleando CO<sub>2</sub> supercrítico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 2006. 8 p.

MORENO R., L.G. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Separata número 107. Volumen XXVIII. 2004. 200 p.

MUNDO DEL CAFÉ, <http://www.mundodelcafe.com/historia.htm>. Visitada (23-03-2009)

NIJSSSEN, L.M., y Colaboradores. Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data, 7th edn, 1996. 72 p.

NOYES, R.M. & C, C.M. Material balance on free sugars in the production of instant coffee. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Montpellier), Paris, France. 1993. 577-582 p.

OHIOKPEHAI, O., Brumen, G. & Clifford, M.N. The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Znternational Scientific Colloquium on Coffee, Salvador, Sun Salvador; ASIC: Paris, 1982. 177-185 p.

ORDOÑEZ A, y Colaboradores. Estudio comparativo de la extracción de cafeína con CO<sub>2</sub> supercrítico y acetato de etilo. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 2006. 9 p.

PALADINO Silvia C. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitisvinifera* L.) Tesis de Maestría en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidades Nacionales de Cuyo. 2008. 100 p.

PARLIMENT, T.H. & STAHL, H.D. Formation of furfurylmercaptan in coffee model systems. In: Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. Elsevier Science, Amsterdam . 1995. 805-813. p.

PAWLISZYN, J. Applications of Solid Phase Microextraction. Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK, 1999. 655 p.

PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice; Wiley-VCH Inc.: New York, 1997. 247 p.

PETERS, A.. Brewing makes the difference. In: Proceedings of the 14<sup>th</sup> ASIC Colloquium (San Francisco), Paris, France. 1991. 97-106 p.

POWRIE, W. D CH Wu, VP Molund. Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environ Health Perspect.* 67, 1986. 47-54 p.

PUERTA Q., G.I. Calidad de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas en Colombia. *Cenicafé*, 49(4). 1998. 265-278 p.

RAMIREZ T. P. Diseño de un sistema agroforestal basado en café robusta que incrementa la sustentabilidad, rentabilidad y equidad, en la amazonia ecuatoriana. Tesis. Chile 2005. 105-192 p.

REBOLLEDO I. D y VENTO L. A. Propuesta de agroindustrialización del proceso del beneficio del café en el Municipio de la Unión (Nariño) de acuerdo a las características de calidad esperadas por el cliente a nivel internacional. Trabajo de grado. Bogotá. 2004. 177 p.

REICHSTEIN, T. & STAUDINGER, H. The aroma of coffee. *Perfum. Essent. Oil. Rec.* 46. 1955. 86-88 p.

RICCO Rafael A, y Colaboradores. TANINOS CONDENSADOS DE Ephedra Chilensis K. Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires, Argentina. 2002. 9 p.

RICHELLE, M. I. Tavazzi, E. Offord. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages prepared per cup serving. *J Agric Food Chem* 49(11). 2001. 3438-3442 p.

ROBBINS, R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (10), 2003. 2866-2887 p.

ROCHA, S y Colaboradores. Screening and Distinction of Coffee Brews based on Headspace Solid Phase Microextraction/ Gas chromatography Principal component analysis. *J.Sci. Food Agric.* 84: 2003. 43-51 p.

ROJAS Gina M E. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de Microextracción en fase sólida y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas. Universidad de Puerto Rico. 2005. 156 p.

RUBINSON. K, R. J. *Análisis Instrumental*. Ed, Prentice Hall. España. 2001. 847 p.

SANZ, C, y Colaboradores. Optimization Headspace Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2001. 1364-1367 p.

SCHIEBERLE, P. Formation of furaneol in heat-processed foods. In: *Flavour Precursors. Thermal and Enzymatic Conversions*. American Chemical Society. 1992. 164-174 p.

SEMMEYROCH, P. & GROSCH, W. Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. wiss. technol.*, 28, 1995. 310-313 p.

SEMMEYROCH, P. & GROSCH, W. Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food chem.*, 44, 1996. 537-543 p.

SPILLER, M. A.. The chemical components of coffee. Gene A. Spiller, ed. *Caffeine*. CRC Press 1998. 103 -167 p.

SPIRO, M. Modelling the aqueous extraction of soluble substances from ground roasted coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (61) 3, 1993. 371–372 p.

SPIRO, M & C.M. Page. The kinetics and mechanism of caffeine infusion from coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 46, No. 3. 1989. 349-356 p.

\*SUPELCO. Bulletin 929. A practical guide to quantitation with solid phase microextraction. 2001. 1-8 p.

SUTEERAPATARANON Siripat, y Colaboradores. Caffeine in Chiang Rai tea infusions: Effects of tea variety, type, leaf form, and infusion conditions. *Food Chemistry*, 114. 2009. 1335–1338 p.

GORECKI, T. X.M. XU, J. P, *Analyst*, *J. Agr. Food Chem.* 124. 1999. 643 p.

THALER, H. H. Structures of macromolecules in coffee. In: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Hamburg), Paris, France. 1975. 175-187 p.*

TRESSL, R., y Colaboradores. Gas chromatographic-mass spectrometric study of N-alkyl- and N-furfurylpyrroles in roasted coffee. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.*, 7, 1981. 28-32 p.

TRUGO, L.C., & R. Macrae, R. The use of the mass detector for sugar analysis of coffee products. In: *Proceedings of the 11<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Lome), Paris, France. 1985. 245-251 p.*

VELASQUEZ V. Ángela M. Extracción de taninos presentes en el banano de rechazo. *Revista Lasallista de investigación*. 2006. 8-14 p.

VELASQUEZ V. Ángela M. Extracción de taninos presentes en el banano verde. *Revista Lasallista de investigación*. 2005. 17-22 p.

VELIOGLU, Y. S y colaboradores. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. J. Agric. Food Chem, 46, 1998. 4113-4117 p.

VERDE, C. José, R, y Colaboradores. Manual de prácticas de química analítica. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 1999. 163 p.

VINSON, J y B. H. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. J. Agric. Food Chem. 43, 1995. 401-403 p.

WILSON, A. J., M. Petracco, & E. L. Some preliminary investigations of oil biosynthesis in the coffee fruit and its subsequent redistribution within green and roasted beans. In: Proceedings of the 17<sup>th</sup> ASIC Colloquium (Nairobi), Paris, France. 1997. 92-99 p.

YANG, M. J y Colaboradores. Quantitative Determination of Caffeine in Beverages Using a Combined SPME-GC/MS Method. J. Chemical Education. 74(9): 1997. 1130-1132 p.

## ANEXOS

Anexo A. Datos experimentales de la metodología de superficie de respuesta

(MSR).

Corrida de análisis *	COVs 500 <sup>1</sup>	COVs 1000 <sup>2</sup>	COVs 25000 <sup>3</sup>	COVs TOTAL <sup>4</sup>	Deseabilidad	
					Prevista <sup>5</sup>	Observada <sup>6</sup>
1	116	115	34	6926737	0,213311	0,303173
2	120	118	39	7835858	0,431166	0,371962
3	140	139	60	9991929	0,623031	0,650348
4	115	112	39	6950368	0,276921	0,306819
5	132	130	49	7843850	0,489729	0,500466
6	137	136	55	8724479	0,680439	0,582482
7	110	110	32	6273946	0,322332	0,237652
8	127	122	48	7553380	0,525965	0,441860
9	159	159	64	8413580	0,709494	0,759004
10	99	94	19	2219431	0,000000	0,000000
11	133	131	32	3279551	0,297036	0,288153
12	139	136	31	3096185	0,261258	0,293091
13	116	112	22	2407874	0,000000	0,116401
14	142	140	30	3278483	0,316231	0,311267
15	147	147	29	3416677	0,274668	0,333241
16	107	104	23	2301559	0,000000	0,081085
17	145	143	38	4084718	0,334325	0,409143
18	142	138	24	2888755	0,287453	0,241151
19	111	111	29	4656472	0,316670	0,207202
20	168	167	71	10040833	0,745906	0,886303
21	155	154	56	6402202	0,691602	0,635460
22	118	117	40	5280087	0,351021	0,310812
23	158	157	54	7129133	0,773364	0,668137
24	163	163	77	7915375	0,713440	0,815633
25	122	122	45	6175241	0,408457	0,381967
26	159	158	63	8115057	0,830849	0,743131

*Continúa.....*

\* Extracción de la muestra de ensayo de café tostado y molido del diseño experimental.

<sup>1</sup> Número de COVs extraídos con un área 500 cuentas.

<sup>2</sup> Número de COVs extraídos con un área 1000 cuentas.

<sup>3</sup> Número de COVs extraídos con un área 25000 cuentas.

<sup>4</sup> Área total de cada extracción del diseño experimental con un área 500 cuentas.

<sup>5</sup> Valor de deseabilidad experimental.

<sup>6</sup> Valor de deseabilidad teórica.

.....*Continuación.*

Corrida de	COVs	COVs	COVs	COVs	Deseabilidad
------------	------	------	------	------	--------------

análisis*	500 <sup>1</sup>	1000 <sup>2</sup>	25000 <sup>3</sup>	TOTAL <sup>4</sup>	Prevista <sup>5</sup>	Observada <sup>6</sup>
27	167	167	89	9134252	0,771617	0,921032
28	103	103	32	5978389	0,186985	0,156998
29	119	117	43	8112445	0,409676	0,379036
30	136	135	50	8377207	0,603062	0,547914
31	110	110	34	6830978	0,252508	0,252801
32	128	127	46	8721379	0,468453	0,479023
33	156	155	60	7332450	0,660473	0,688876
34	128	128	41	7341007	0,299717	0,434679
35	138	136	50	8675154	0,505298	0,564922
36	150	149	64	7348182	0,689796	0,668035
37	100	95	19	2138161	0,000000	0,017230
38	121	118	34	3224765	0,278561	0,236738
39	131	129	23	2813669	0,241753	0,199180
40	101	95	17	1981625	0,000000	0,000000
41	137	134	36	3615555	0,297761	0,339488
42	145	144	26	3017796	0,254809	0,278752
43	101	99	25	2466238	0,000000	0,057476
44	142	139	28	3278597	0,315794	0,296905
45	142	138	24	2888755	0,267228	0,241151
46	123	123	39	5465064	0,295185	0,350048
47	144	144	61	8923140	0,726268	0,663193
48	164	164	69	8209646	0,672181	0,802525
49	120	120	44	5408018	0,330491	0,345315
50	155	151	60	7228744	0,753923	0,671012
51	158	158	65	6238716	0,694123	0,682675
52	130	129	46	6125178	0,388025	0,437691
53	162	161	82	11777074	0,811377	0,932622
54	147	146	53	5523304	0,752272	0,547087

\* Extracción de la muestra de ensayo de café tostado y molido del diseño experimental.

<sup>1</sup> Número de COVs extraídos con un área 500 cuentas.

<sup>2</sup> Número de COVs extraídos con un área 1000 cuentas.

<sup>3</sup> Número de COVs extraídos con un área 25000 cuentas.

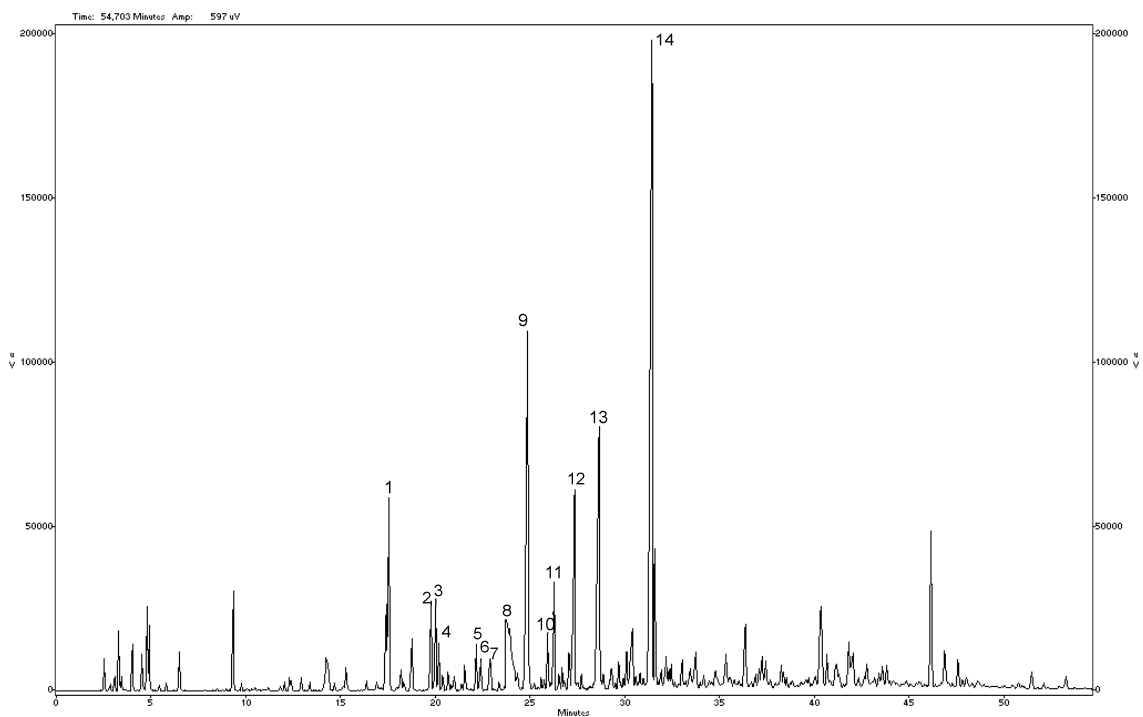
<sup>4</sup> Área total de cada extracción del diseño experimental con un área 500 cuentas.

<sup>5</sup> Valor de deseabilidad experimental.

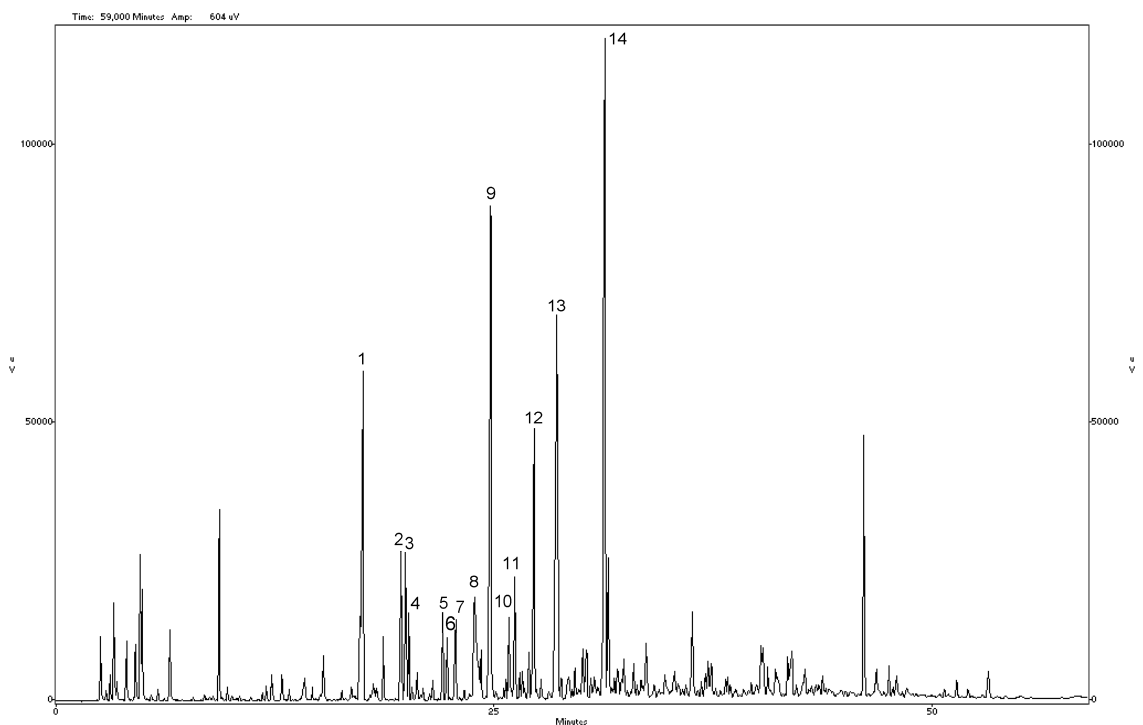
<sup>6</sup> Valor de deseabilidad teórica.

Anexo B. Cromatogramas (GC-FID) de muestras de café tostado y molido.

Cromatograma de muestra de café variedad *Caturra* Zona Cordillera (Ca1H).

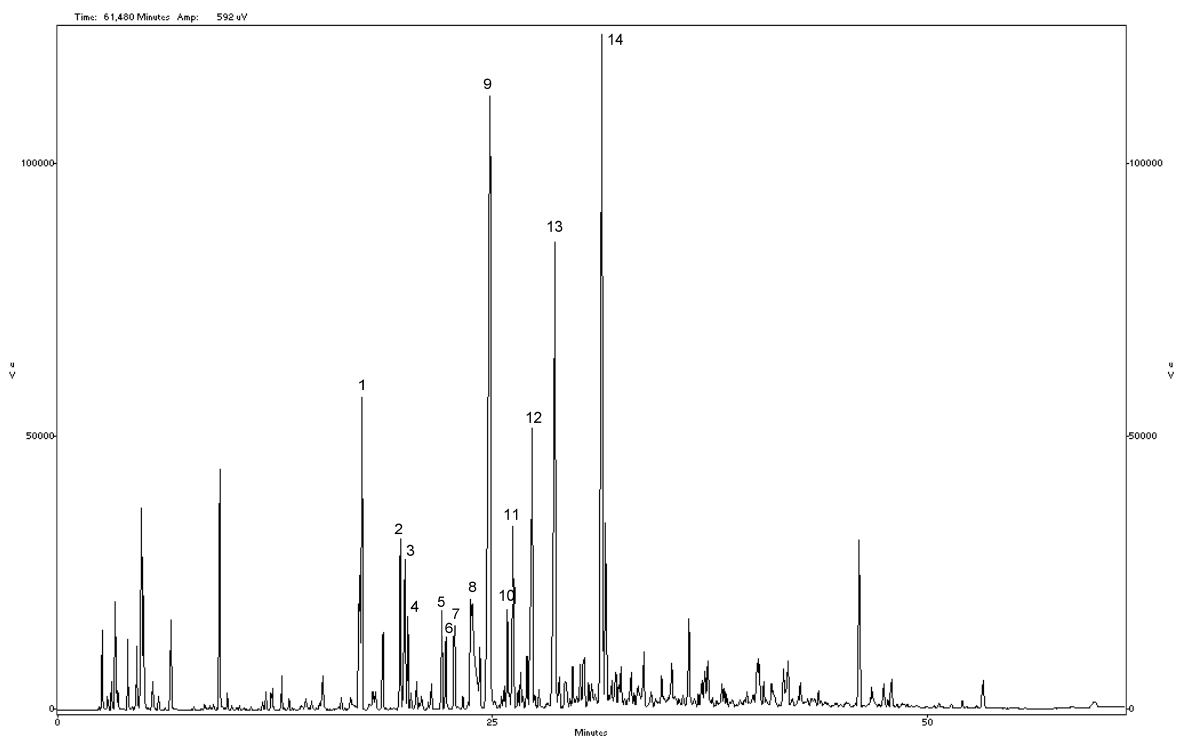


Cromatograma de muestra de café variedad *Caturra* Zona Occidente (Ca2H).

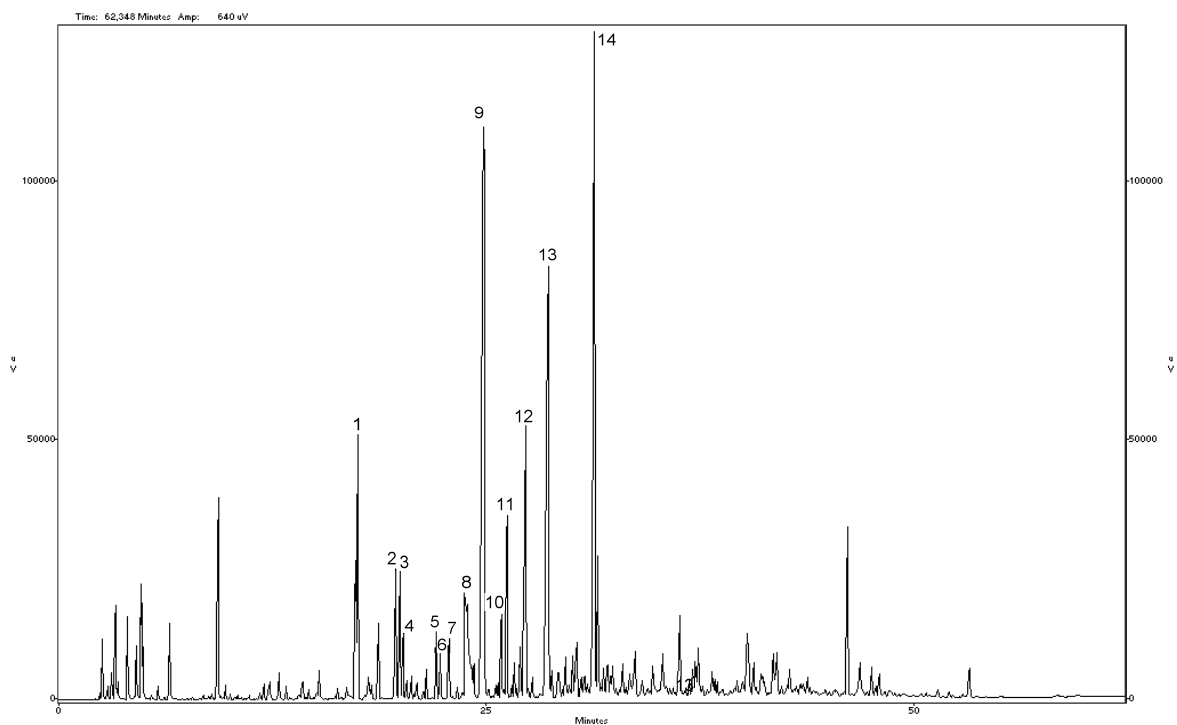


Cromatograma de muestra de café variedad *Castillo* Zona Norte (Co3H).

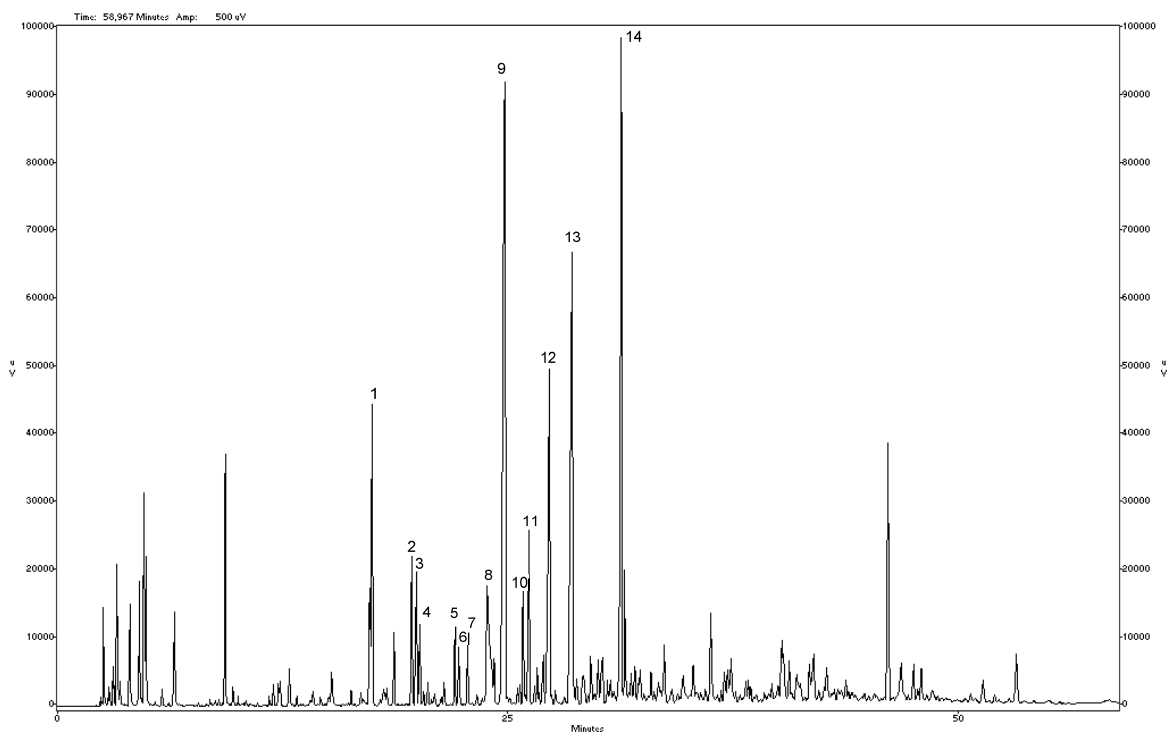




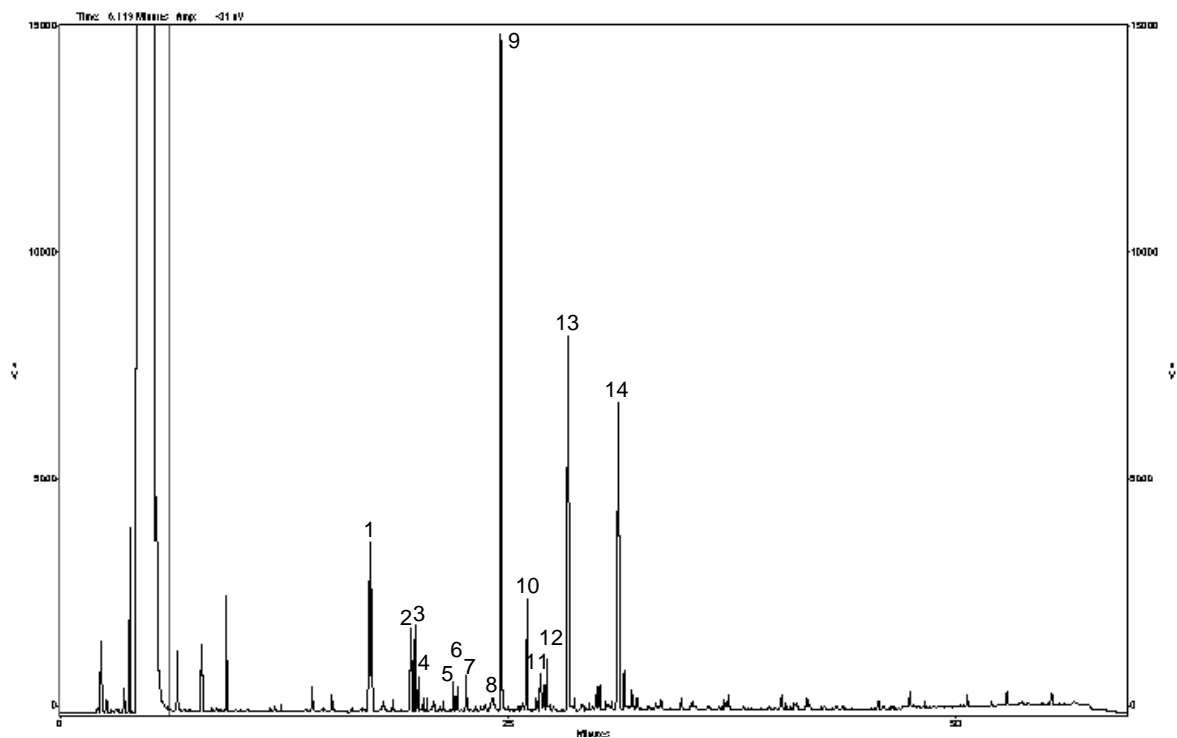
Cromatograma de muestra de café variedad *Castillo* Zona Cordillera (Co4H).



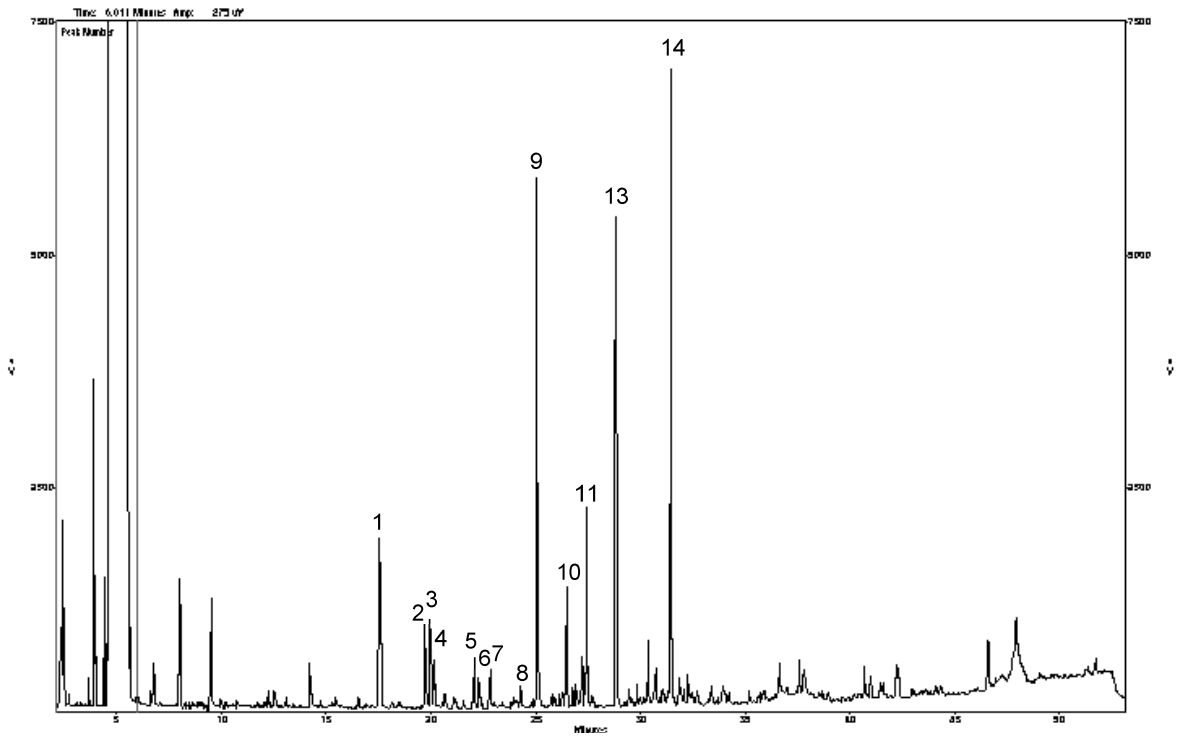
Cromatograma de muestra de café variedad *Castillo* Zona Occidente (Co5H).



Cromatograma de muestra de café variedad *Castillo* Zona Norte (Co3D).



Cromatograma de muestra de café variedad *Caturra* Zona Cordillera (Ca1D).



Fuente: esta investigación

Anexo C. Tiempos de retención e índices de Kovat's por GC-FID de COVs de muestra de café arábico tostado y molido.

N° Pico	Tiempos de retención (min)	Índices de Kovat's (Ik)	Posible compuesto*
1	2,625	791	2-Metil-5-etilfuran
2	3,383	851	2-Metilfuran
3	4,091	907	2-Butanona
4	4,608	921	3-Metilbutanal
5	4,883	929	2-Etilpirrol
6	4,983	932	2,5-Dimetilfuran
7	6,583	977	2-Pentanona
8	9,416	1054	Hexanal
9	14,316	1179	n-Metil-Pirrol
10	15,357	1205	Pirazina
11	17,474	1260	4-Metiltiazol
12	17,553	1262	Metilpirazina
13	18,824	1296	3-Hidroxi-Butanona
14	19,760	1320	2,5-Dimetilpirazina
15	20,004	1326	2,3-Dimetilpirazina
16	20,186	1331	2-Etilpirazina
17	21,615	1369	1-Hexanol
18	22,139	1382	2-Etil-6-Metilpirazina
19	22,362	1388	2-Etil-5-Metilpirazina
20	22,851	1401	Trimetilpirazina
21	23,952	1433	2-Etil-3,5-Dimetilpirazina
22	24,904	1462	2-Furancarboxaldehído
23	25,953	1492	Furfural Formiato
24	26,352	1504	2-Furonil Etanona
25	27,376	1534	Furanmetanol Acetato
26	28,690	1573	5-Metil-2-Furancarboxaldehído
27	30,156	1618	No Identificado (NI)
28	30,465	1629	$\gamma$ -Butirolactona
29	31,419	1660	Furanmetanol
30	31,623	1667	3-Etil-4-Metil-2,5-furandiona
31	32,256	1688	NI
32	33,081	1716	Pirazina Carboxamida
33	33,806	1740	2-Etil-3-Hidroxi-4H-piran-4-ona
34	35,406	1793	NI
35	36,406	1829	1-(2-Furanilmetil)-pirrol
36	37,148	1856	2-Metoxi Fenol
37	38,314	1899	2-Fenil etanol
38	40,389	1975	2-Acetil pirrol
39	40,722	1988	NI
40	41,872	2033	Fenol
41	42,089	2042	NI
42	42,822	2072	1-(1H-pirrol-2-il)-Etanona
43	43,639	2106	NI
44	43,864	2115	NI
45	46,197	2211	Acido 3,5-Dimetilbenzoico
46	46,914	2240	Acido Decanoico
47	47,622	2269	NI

Fuente: esta investigación. (\*) Referenció a partir de índices de Kovat's (Holscher et al., 1990; Cantergiani et al., 2001; Sanz et al., 2001). Utilizando columna capilar DB-WAX (J&W scientific).

Anexo D. Compuestos orgánicos volátiles identificados por Supelco (GC-MS) en muestra de café tostado.

Pico N°	Compuesto	Pico N°	Compuesto	Pico N°	Compuesto
1	2-Metil Furan	20	Dimetil Fenol	39	Furfural Formiato
2	2- Butanona	21	1,2-Etanodiol Monoacetato	40	2-Furonil Etanona
3	2-Pentanona	22	2,5-Dimetilpirazina	41	Metil Benzoilformiato
4	3-Metil Butanal	23	2,3-Dimetilpirazina	42	Furanmetanol Acetato
5	2,5-Dimetilfuran	24	2-Etilpirazina	43	5-Metil-2- Furancarboxaldehído
6	2-Acetiloxi-2- Propanona	25	2,6-Dimetilpirazina	44	Furanmetanol Propionato
7	2-Etil Hexanol	26	2-Etil-6-Metilpirazina	45	Furanil Furan
8	Dimetilsulfoxido	27	2-Etil-5-Metilpirazina	46	Piridina Metanol
9	Fenol	28	Trimetilpirazina	47	2-Metil-5-Propinilpirazina
10	Hexanal	29	2-Etil-3-Metilpirazina	48	Furanmetanol
11	2-Metil Tiofeno	30	2,6-Dietilpirazina	49	3-Etil-4-Metil-2,5- Furandiona
12	N-Metil Pirrol	31	2-Etenilpirazina	50	Pirazina Carboxamida
13	4-Metil Fenol	32	2-Etil-3,5- Dimetilpirazina	51	2-Etil-3-Hidroxi-4h-Piran- 4-ona
14	2-Etil Pirrol	33	Glicerol	52	1-(2-Furanilmetil) Pirrol
15	Piridina	34	2,3-Dietilpirazina	53	2-Metoxifenol
16	Pirazina	35	2-Etil-3,6- Dimetilpirazina	54	1-(1H-Pirrol-2-il) Etanona
17	Metil Pirazina	36	2-Furancarboxaldehído	55	4-Etil-2-Metoxifenol
18	4-Metil Tiazol	37	2-Isopropenilpirazina	56	2-Metil Benzofuran
19	3-Hidroxi Butanona	38	3,5-Dietil-2- Metilpirazina	57	Ácido 3,5-Dimetil Benzoico

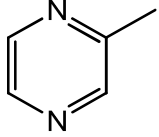
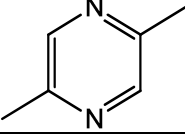
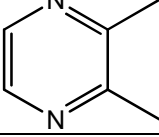
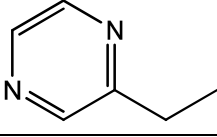
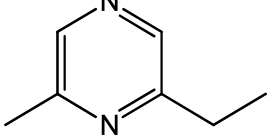
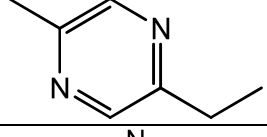
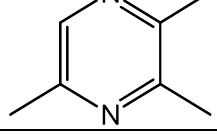
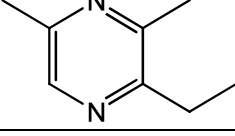
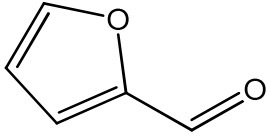
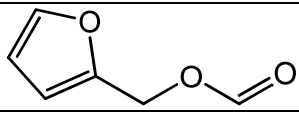
Fuente: SUPELCO. Productos cromatográficos para análisis y purificación. Catalogo 2000 p. 510

Anexo E. Referencias bibliográficas en la identificación de los COVs en muestras de café.

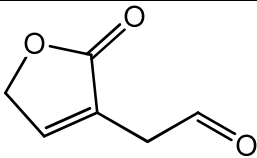
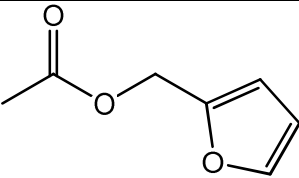
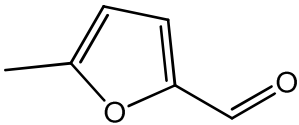
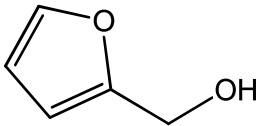
1. Tatsuka, K.; Suekane, S.; Sakai, Y.; Sumitani, H., Volatile constituents of kiwi fruit flowers: simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 2176-2180.
2. Fan, W.; Qian, M.C., Characterization of Aroma Compounds of Chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" Liquors by Aroma Extract Dilution Analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 2695-2704.
3. Umano, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shyoji, A.; Shibamoto, T., Volatile chemicals formed in the headspace of a heated D-glucose/L-cysteine Maillard model system, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 2212-2218.
4. Vinogradov, B.A., Production, composition, properties and application of essential oils, 2004, retrieved from <http://viness.narod.ru>
5. Dury-Brun, C.; Fournier, N.; Pernin, K.; Guichard, E.; Voilley, A., A new approach to studying sponge cake aroma after storage in treated paper and plastic packaging by direct gas chromatography?olfactometry (D-GC-O), *Flavour Fragr. J.*, 2007, 22, 255-264.
6. Bosch-Fuste, J.; Riu-Aumatell, M.; Guadayol, J.M.; Caixach, J.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S., Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis, *Food Chem.*, 2007, 105, 428-435.
7. Kourkoutas, Y.; Bosnea, L.; Taboukos, S.; Baras, C.; Lambrou, D.; Kanellaki, M., Probiotic Cheese Production Using *Lactobacillus casei* Cells Immobilized on Fruit Pieces, *J. Dairy Sci.*, 2006, 89, 1439-1451.
8. Chang, C.-Y.; Seitz, L.M.; Chambers, E., IV, Volatile Flavor Components of Breads Made from Hard Red Winter Wheat and Hard White Winter Wheat, *Cereal Chem.*, 1995, 72, 3, 237-242.
9. Schieberle, P.; Grosch, W., Potent odorants of rye bread crust - differences from the crumb and from wheat bread crust, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1994, 198, 292-296.
10. Shimoda, M.; Shibamoto, T., Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with an on-column GC/MS method, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 3, 802-804.
11. Fujioka, K.; Shibamoto, T., Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 6054-6058.
12. Yanagimoto, K.; Ochi, H.; Lee, K.-G.; Shibamoto, T., Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 592-596.
13. Sanz, C.; Maeztu, L.; Zapelena, M.J.; Bello, J.; Cid, C., Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blends of coffee: influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar, *J. Sci. Food Agric.*, 2002, 82, 840-847.
14. Maeztu, L.; Sanz, C.; Andueza, S.; de Peña, M.P.; Bello, J.; Cid, C., Characterization of espresso coffee aroma by static headspace GC-MS and sensory flavor profile, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 5437-5444.
15. Sanz, C.; Ansorena, D.; Bello, J.; Cid, C., Optimizing headspace temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted Arabica coffee, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 1364-1369.
16. Yeo, H.C.H.; Shibamoto, T., Microwave-induced volatiles of the Maillard model system under different pH conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 2, 370-373.
17. Characterization of Pyrazines in Some Chinese Liquors; Their Approximate Concentrations, W. Fan; Y. Xu; Y. Zhang, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 9956-9962.
18. Osada, Y.; Shibamoto, T., Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems, *Food Chem.*, 2006, 98, 522-528.
19. Krings, U.; Zelena, K.; Wu, S.; Berger, R.G., Thin-layer high-vacuum distillation to isolate volatile flavour compounds of cocoa powder, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, 223, 675-681.
20. Vernin, G.; Metzger, J.; Boniface, C.; Murello, M.-H.; Siouffi, A.; Larice, J.-L.; Parkanyi, C., Kinetics and thermal degradation of the fructose methionine Amadori intermediates. GC-MS/SPECMA data bank identification of volatile aroma compounds, *Carbohydr. Res.*, 1992, 230, 15-29.
21. Kawakami, M.; Kobayashi, A., Volatile constituents of green mate and roasted mate, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 7, 1275-1279.

22. Andueza, S.; Maeztu, L.; Pascual, L.; Ibanez, C.; de Pena M.P.; Cid, C., Influence of extraction temperature on the final quality of espresso coffee, *J. Sci. Food Agric.*, 2003, 83, 240-248.
23. Cadwallader, K.R.; Heo, J., Aroma of roasted sesame oil: characterization by direct thermal desorption-gas chromatography-olfactometry and sample dilution analysis, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 2001, 782, 187-202.
24. Buttery, R.G.; Orts, W.J.; Takeoka, G.R.; Nam, Y., Volatile flavor components of rice cakes , *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 4353-4356.
25. Acree, T.; Arn, H., *Flavornet*, 2004, retrieved from <http://www.flavornet.org/>.
26. Mihara, S.; Masuda, H., Correlation between molecular structures and retention indices of pyrazines , *J. Chromatogr.*, 1987, 402, 309-317.
27. Kumazawa, K.; Masuda, H., Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique , *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5660-5663.
28. Lee, K.-G.; Shibamoto, T., Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans , *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 4290-4293.
29. Riu-Aumatell, M.; Castellari, M.; López-T, E.; Galassi, S.; B, S., Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS, *Food Chem.*, 2004, 87, 627-637.
30. Wong, K.C.; Tie, D.Y., The Essential Oil of the Leaves of *Murraya koenigii* Spreng. , *J. Essent. Oil Res.*, 1993, 5, 371-374.
31. Chida, M.; Sone, Y.; Tamura, H., Aroma characteristics of stored tobacco cut leaves analyzed by a high vacuum distillation and canister system, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 7918-7924.
32. López, R.; Ezpeleta, E.; S, I.; C, J.; F, V., Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry, *Food Chem.*, 2004, 88, 95-103.
33. Soria, A.C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J., Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, 2003, 26, 793-801.
34. Lopez, R.; Ferreira, V.; Hernandez, P.; Cacho, J.F., Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, 79, 1461-1467.
35. Yeo, H.C.H.; Shibamoto, T., Microwave-induced volatiles of the Maillard model system under different pH conditions , *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 2, 370-373.
36. Rawat, R.; Gulati, A.; Babu, G.D.K.; Acharya, R.; Kaul, V.K.; Singh, B., Characterization of volatile components of Kangra orthodox black tea by gas chromatography-mass spectrometry, *Food Chem.*, 2007, 105, 229-235.
37. Totlani, V.M.; Peterson, D.G., Influence of epicatechin reactions on the mechanisms of Maillard product formation in low moisture model systems, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 414-420.
38. Kawakami, M.; Ganguly, S.N.; Banerjee, J.; Kobayashi, A., Aroma composition of oolong tea and black tea by brewed extraction method and characterizing compounds of Darjeeling tea aroma, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 200-207.
39. Shibamoto, T.; Kamiya, Y.; Mihara, S., Isolation and identification of volatile compounds in cooked meat: sukiyaki , *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, 57-63.
40. Nishimura, O.; Yamaguchi, K.; Mihara, S.; Shibamoto, T., Volatile Constituents of Guava Fruits (*Psidium guajava* L.) and Canned Puree , *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 1, 139-142.
41. Kumazawa, K.; Kubota, K.; Masuda, H., Influence of Manufacturing Conditions and Crop Season on the Formation of 4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone in Japanese Green Tea (Sen-cha), *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 5390-5396.
42. Akiyama, M.; Murakami, K.; Ohtani, N.; Iwatsuki, K.; Sotoyama, K.; Wada, A.; Tokuno, K.; Iwabuchi, H.; Tanaka, K., Analysis of volatile compounds released during the grinding of roasted coffee beans using solid-phase microextraction, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 1961-1969.
43. Baek, H.H.; Cadwallader, K.R., Volatile compounds in flavor concentrates produced from crayfish-processing byproducts with and without protease treatment, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 3262-3267.

Anexo F. Estructuras químicas y descripciones odoríficas, de los COVs mayoritarios, identificados en las muestras de café tostado y molido.

Compuesto	Estructura Química	Descripción odorífica
Metil Pirazina $C_5H_6N_2$		Chocolate Nuez tostado Dulce Almendra
2,5-Dimetilpirazina $C_6H_8N_2$		Chocolate Hojuelas freídas Ahumado
2,3-Dimetilpirazina $C_6H_8N_2$		Nuez verde Chocolate Caramelo Jarabe
2-Etilpirazina $C_6H_8N_2$		Nuez tostado Almendra Jarabe Ron
2-Etil-6-Metilpirazina $C_7H_{10}N_2$		Avellanas Jarabe
2-Etil-5-Metilpirazina $C_7H_{10}N_2$		Jarabe
Trimetilpirazina $C_7H_{10}N_2$		Nuez tostado Jarabe Chocolate Caramelo
2-Etil-3,5-Dimetilpirazina $C_8H_{12}N_2$		Nuez tostado Almendra Jarabe Sensación terrosa
2-Furancarboxaldehído $C_5H_4O_2$		Caramelo Canela Almendra Dulce picante Pan
Furfural Formiato $C_6H_6O_3$		Floral



<p>2-Furonil Etanona C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub></p>		<p>Tabaco Floral Caramelo</p>
<p>Furanmetanol Acetato C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub></p>		<p>Floral Etilico</p>
<p>5-Metil-2-Furancarboxaldehído C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub></p>		<p>Dulce aromático Caramelo</p>
<p>Furanmetanol C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub></p>		<p>Aceite caliente Ahumado Amargo</p>

Fuente: FLAMENT, Ivon. Coffee flavor chemistry. Wiley & Sons. 2002 p. 81-343

## Anexo G. Cálculos matemáticos y estadísticos.

### 1. Cálculos de deseabilidad

La aplicación de la función de deseabilidad conjuga todas las respuestas en una medición y ofrece la posibilidad de predecir los niveles óptimos de las variables independientes. La combinación de las respuestas en una función de deseabilidad requiere el cálculo de las funciones individuales. La deseabilidad individual de cada respuesta se calculó mediante el método de maximización utilizando la siguiente ecuación:

$$d_i = \left( \frac{Y_i - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}} \right)^s$$

Donde,  $d_i$ , es la deseabilidad individual de cada corrida cromatográfica,  $Y_i$  es el valor predicho de la variable respuesta,  $Y_{min}$ , es el valor mínimo de la variable de respuesta, en el cual esta es completamente inaceptable, y  $Y_{max}$ , es el valor máximo de la variable de respuesta, donde la función de deseabilidad es máxima. El parámetro  $s$ , define la forma de la función. Para  $s = 1$ , la deseabilidad se comporta linealmente de 0 en el valor mínimo a 1 en el valor máximo.

Los valores de deseabilidad general se calcularon a partir de los valores individuales mediante la siguiente ecuación:

$$D = (d_1 d_2 d_3 d_4)^{1/m}$$

Donde,  $d_1 d_2 d_3 d_4$ , son las deseabilidades individuales, y  $m$ , es el número de variables de respuestas.

Cálculos de las deseabilidades individuales:

$$d_1 = \left( \frac{167,305 - 99,0}{168,0 - 99,0} \right)^1 = 0,990 \quad \text{para la variable de respuesta de COVs 500}$$

$$d_2 = \left( \frac{166,581 - 94,0}{167,0 - 94,0} \right)^1 = 0,994 \quad \text{para la variable de respuesta de COVs 1000}$$

$$d_3 = \left( \frac{73,1225 - 17,0}{89,0 - 17,0} \right)^1 = 0,779 \quad \text{para la variable de respuesta de COVs 2500}$$

$$d_4 = \left( \frac{8821170 - 1981630}{11777100 - 1981630} \right)^1 = 0,698 \quad \text{para la variable de respuesta de COVs TOTAL}$$

Cálculo de la deseabilidad general:

$$D = (0,990 \times 0,994 \times 0,779 \times 0,698)^{1/4} = 0,855515$$

## 2. Cálculo del contraste F

Para contrastar si las estimaciones entre las muestras son significativamente más grandes, se utilizó un contraste F (P=0.05). Para probar si es significativamente la diferencia entre las dos varianzas muestrales, esto es para probar  $H_0: \sigma_0^2 = \sigma_1^2$ , se calcula el F estadístico:

$$F = S_1^2 / S_2^2$$

Donde 1 y 2 se disponen en la ecuación de modo que  $F$  sea siempre  $\geq 1$ , el número de g.l. es  $n-1$ , para el numerador y  $n-1$  para el denominador.

Cálculo de la razón F del ANOVA para cafeína, Tabla 19

$$F = 0,06080270 / 0,00146133$$

$$F = 41,6077 \quad F(41,6077) > F_C(39,00) \quad P(= 0,005) \quad g.l = 2$$

El F crítico es 39,00, siendo un valor menor que el F calculado; por consiguiente se descarta la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa de que las  $\sigma_0^2 \neq \sigma_1^2$ , son significativamente diferentes

## 3. Cálculo de la mínima diferencia significativa de Fisher

Para explicar si el resultado es significativo, se procedió a colocar las medias en orden creciente y se comparó la diferencia entre los valores adyacentes, este se hizo utilizando la técnica estadística "la mínima diferencia significativa", y viene dada por:

$$s \sqrt{\left(\frac{2}{n}\right)} \times t_{h(n-1)}$$

Donde  $s$  es la estimación dentro de la muestra de  $\sigma_1^2$ , y  $h = (n-1)$  es el número de g.l. de la estimación (P=0,05).

$$\begin{aligned} \text{Donde:} \quad t_{h(n-1)} &= t_{2 \times 2} = 2,78 \\ \sigma_1^2 &= 0,00146133 \\ n &= 3 \end{aligned}$$

$$\sqrt{0,00146133} \times \sqrt{\left(\frac{2}{3}\right)} \times 2,78 = 0,0866601$$

Límite de comparación 0,0866601