

**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
ACEITES OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO DE GRANOS
DE CAFÉ CON DIFERENTE GRADO DE TOSTIÓN**

**VANESSA CATALINA DÍAZ POVEDA
EVA GISSELLE VÁSQUEZ OREJARENA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
ACEITES OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO DE GRANOS
DE CAFÉ CON DIFERENTE GRADO DE TOSTIÓN**

**VANESSA CATALINA DÍAZ POVEDA
EVA GISSELLE VÁSQUEZ OREJARENA**

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Química**

**Directores: ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.
JAIRO R. MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

Dedicatoria

A mi familia por apoyarme siempre.

Vanessa Díaz Poveda

*A mi familia: mis padres Nino y Eva,
mis hermanitos Papo y Momo porque
son mi guía y mi apoyo en cada
momento, los amo con todo mi corazón.*

Eva G. Vásquez Orejarena.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Jairo René Martínez y Elena Stashenko por su guía para el desarrollo y sustentación del proyecto.

A los compañeros del laboratorio por su ánimo y apoyo.

A nuestros amigos Ligia, Laurita, Cesar, Piru, Luis Ernesto, Mayra y José por tenernos siempre presentes y por los gratos momentos compartidos.

A Evita, mi compañera de trabajo desde el comienzo de la universidad. Por aguantarme y por aguantarla en tantos momentos de felicidades y alegrías, así como de estrés y tristeza.

A mi papá, a mi mamá, a mis hermanos, por estar siempre pendientes de mí, por creer en mis capacidades y darme la oportunidad que no muchos tienen, tener un hogar, estudiar y brindarme todo el cariño y amor incluso en la distancia.

Al amor de mi vida Fercho, por ser el tesoro más grande que pude recibir. Gracias por todos los consejos, ayudas prestadas y sobre todo por estar a mi lado.

A Almacafé, gracias por oportunidad de estar en sus instalaciones, por brindarnos el café y por toda la colaboración.

Vanessa Díaz Poveda

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por las enseñanzas y inspiración a mejorar siempre.

A mis padres por apoyarme incondicionalmente, por el maravilloso ejemplo de tenacidad y por la educación que me han dado. Por cuidarme como lo hacen, por siempre estar ahí brindándome su amor, les doy gracias infinitas, este es su triunfo.

A mis “little bros”, por aguantarse a su hermanita mayor, gracias por todas las risas y alegrías que hemos vivido, y porque espero ser un buen ejemplo para los dos.

A Vane por ser la mejor compañera de proyecto y amiga del mundo, por haberme brindado su amistad incondicional desde el primer día de la carrera, por aguantarme, por estar en las buenas y las malas, gracias por todos los momentos geniales. Lo logramos.

A mis amigos de carrera, a Piru, Ligia, Cesar, Laurita, Fercho, Mayris, José, Andrea entre otros porque si los nombro a todos no acabo, por hacer la química mil veces más divertida, gracias por los consejos y apoyo durante todo este tiempo. A todos mis otros amigos, a todas aquellas personas que he conocido y han llegado a ser parte especial de mi vida.

A CENIVAM-Laboratorio de Cromatografía, a todos sus integrantes, tanto compañeros como amigos, especialmente a Carlos y Ginna por brindarnos su guía.

A Almacafé, al Dr. Edgar Moreno, los Ing. Camilo Galvis, Rodrigo Alarcón y Galvany Carrillo. Gracias por oportunidad de estar en sus instalaciones, por brindarnos el café y por toda la colaboración, sin ustedes nada hubiera sido posible.

Eva G. Vásquez O.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 22 |
| 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE | 24 |
| 1.1 CAFÉ | 24 |
| 1.1.1 <i>Coffea arabica</i> | 25 |
| 1.1.2 Café verde..... | 26 |
| 1.2 TOSTIÓN DEL CAFÉ: PROCESO Y REACCIÓN DE MAILLARD..... | 27 |
| 1.3 ACEITE DE CAFÉ | 29 |
| 1.4. EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE CAFÉ | 34 |
| 1.4.1 Generalidades..... | 34 |
| 1.4.2 Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE) | 34 |
| 1.5 ANTIOXIDANTES (AO)..... | 35 |
| 1.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CAFÉ | 36 |
| 2. CIENCIOMETRÍA | 38 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 41 |
| 3.1 MATERIALES Y REACTIVOS..... | 41 |
| 3.1.1 Reactivos y solventes. | 41 |
| 3.1.2 Material de laboratorio. | 41 |
| 3.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ..... | 41 |
| 3.3 TOSTIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ | 42 |
| 3.4 MEDICIÓN DEL COLOR DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ | 43 |
| 3.5 MOLIENDA DEL CAFÉ | 43 |
| 3.6 PRUEBAS PRELIMINARES PARA SFE..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y ENCAJE DE MODELOS POLINÓMICOS A LOS DATOS EXPERIMENTALES..... | 45 |
| 3.9 OBTENCIÓN DEL ACEITE DE CAFÉ POR SFE..... | 46 |
| 3.10 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 46 |
| 3.10.1 Extracción de los metil ésteres de los ácidos grasos (FAME's). | 46 |
| 3.10.2 Dilución de los extractos SFE | 47 |
| 3.10.3 Sililación de los extractos de café. | 47 |
| 3.10.4 Extracción de la fracción insaponificable. | 47 |
| 3.11 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO..... | 47 |
| 3.11.1 Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID)..... | 47 |
| 3.11.2 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (GC-MS). | 48 |
| 3.12 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | 49 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 51 |
| 4.1 TOSTIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ | 51 |
| 4.2 MEDICIÓN DEL COLOR DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ | 52 |
| 4.3 MOLIENDA DEL CAFÉ | 52 |
| 4.4 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE CAFÉ POR SFE..... | 53 |
| 4.5 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE CAFÉ OBTENIDOS POR SFE . | 55 |
| 4.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE CAFÉ | 57 |
| 4.6.1 Estudio del perfil de ácidos grasos de los aceites de café mediante GC-FID..... | 57 |
| 4.6.2 Estudio de la composición de los aceites de café mediante GC-MS..... | 58 |

| | |
|---|----|
| 4.7 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE CAFÉ OBTENIDOS MEDIANTE EL MÉTODO ABTS ⁺ | 86 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 91 |
| 6. RECOMENDACIONES | 93 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 94 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. A. Fotografía del fruto del cafeto. B. Fotografía de la semilla del cafeto..... | 24 |
| Figura 2. La cereza de café en un diagrama de la sección transversal. | 25 |
| Figura 3. Fórmula estructural de los compuestos base de los CGA. | 26 |
| Figura 4. Fórmula estructural de algunos componentes presentes en el café verde..... | 27 |
| Figura 5. Curva de temperatura de granos de café durante el proceso de tostación. | 28 |
| Figura 6. Coloración de A. Grano verde, B. Grano semitostado o muy ligero, C. Grano punto medio o ligero, D. Grano tipo catación o medio y E. Grano tipo consumo u oscuro. | 29 |
| Figura 7. Fórmula estructural de los diterpenos presentes en el café..... | 31 |
| Figura 8. Fórmula estructural de los productos de descomposición del cafestol y kahweol. | 31 |
| Figura 9. Fórmula estructural de A. Coffeadiol y B. Arabiol I. | 32 |
| Figura 10. Estructura de los tocoferoles..... | 33 |
| Figura 11. Relación área – número de publicaciones sobre aceite de café. Fuente: <i>Scopus</i> y <i>Web of Science</i> . Período de observación: 2000 – 2011. Fecha de consulta: 5 de enero de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (coffee oil)..... | 8 |
| Figura 12. Relación países – número de publicaciones sobre aceite de café. Fuente: <i>Web of Science</i> . Periodo de observación: 2000 – 2011. Fecha de consulta: 5 de enero de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (coffee oil)..... | 39 |
| Figura 13. Equipo <i>Presition divider</i> , Gamet GAMET MFG. CO. Serial n. 1Y991722 (Minn., EE. UU.). | 42 |
| Figura 14. Equipo SASA-SAMIAC (43 AV. Du Mal Le.360 Le Cateau). | 42 |
| Figura 15. Equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 (<i>Thar Instruments</i> , Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.). | 43 |
| Figura 16. Diagrama del proceso de extracción del equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 (<i>Thar Instruments</i> , Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.)..... | 44 |
| Figura 17. Diseño experimental factorial 2^3 | 45 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Cromatógrafo de gases de alta resolución <i>Agilent Technologies 7890A</i> , con detector de ionización en llama FID. | 48 |
| Figura 19. Cromatógrafo de gases de alta resolución <i>Agilent Technologies 6890N Plus</i> , con detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5973</i> | 49 |
| Figura 20. Espectrofotómetro <i>Modulus™ II, microplate reader</i> , 645 N. <i>Turner Biosystems</i> , North Mary Avenue, Sunnyvale, CA, EE.UU. | 49 |
| Figura 21. Curva de temperatura de los granos de café durante la tostión. | 51 |
| Figura 22. Extracto de: A. Café tipo verde, B. Café tipo semitostado, C. Café tipo catación y D. café tipo consumo. | 55 |
| Figura 23. Variación del rendimiento del aceite de café con el grado de tostión. Flujo de CO ₂ de 40 g/min. | 56 |
| Figura 24. Cromatograma (corriente iónica total) de extractos SFE de café, tipo consumo, analizado por GC-MS. A. Aceite de café diluido en diclorometano; B. Derivados TMS de compuestos presentes en el aceite; C. Derivados TMS de compuestos en la fracción no saponificable. | 60 |
| Figura 25. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo verde. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 14. | 61 |
| Figura 26. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo semitostado. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 14. | 61 |
| Figura 27. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo catación. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 14. | 62 |
| Figura 28. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo consumo. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 14. | 62 |
| Figura 29. Variación de la cantidad relativa, (%) de la cafeína en los aceites de café, con diferentes grados de tostión, extraídos con SC-CO ₂ | 63 |
| Figura 30. Espectro de masas del dehidrocafestol. EI, 70 eV. | 64 |
| Figura 31. Espectro de masas del dehidrokahweol. EI, 70 eV. | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 32. Estructura molecular y algunos iones principales del A. 15,16-Dehidrokahweol; B. 15,16-Dehidrocafestol..... | 68 |
| Figura 33. Estructura de A. Palmitato de kahweol; B. Palmitato de cafestol..... | 69 |
| Figura 34. Cromatograma típico del extracto SFE de café tipo catación sililado. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). | 70 |
| Figura 35. Espectros de masas de compuestos en extractos de café tostado que tipo de café sililados. A. Compuesto 4 (dehidrokahweol); B. Compuesto 7 (dehidrocafestol). EI, 70 eV. | 71 |
| Figura 36. Espectro de masas del 11,12-isokahweol. EI, 70 eV..... | 71 |
| Figura 37. Fragmentos de cromatogramas de la fracción insaponificable de: A. Aceite de café, tipo consumo; B. Aceite de café, tipo verde. | 73 |
| Figura 38. Cantidades relativas, (%) de β -tocoferol, vitamina E, campesterol y estigmasterol en extractos SFE de cafés, verde y tostado. | 74 |
| Figura 39. Espectro de masas del 16-O-isobutilcafestol. EI, 70 eV. | 74 |
| Figura 40. Espectro de masas del 16-O-isobutilkahweol. EI, 70 eV. | 76 |
| Figura 41. Espectro de masas del cafestol. EI, 70 eV..... | 78 |
| Figura 42. Espectro de masas del kahweol. EI, 70 eV..... | 80 |
| Figura 43. Fragmento del cromatograma de la fracción insaponificable sililada del extracto SFE de café, tipo consumo; compuestos éteres trimetilsilílicos de dehidrokahweol y dehidrocafestol (TMS-4, TMS-7). | 82 |
| Figura 44. Posible espectro de masas del éter trimetilsilílico de dehidrocafestol. EI, 70 eV. | 83 |
| Figura 45. Posible espectro de masas del éter trimetilsilílico de dehidrokahweol. EI, 70 eV. | 83 |
| Figura 46. Fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre el ABTS ⁺ , las sustancias de control y las sustancias de referencia. | 86 |
| Figura 47. Efecto de la inhibición de ABTS ⁺ por la adición de diferentes concentraciones de Trolox [®] | 87 |
| Figura 48. Efecto de la inhibición de ABTS ⁺ por la adición de diferentes concentraciones de BHA y ácido caféico. | 88 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Distribución, (%) de desmetilesteroles en café arábica Mariani <i>et al.</i> (1991)..... | 32 |
| Tabla 2. Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo de extracción de aceite de café con fluidos supercríticos y su capacidad antioxidante con bases en los de datos <i>Scopus</i> . Fecha de búsqueda: 5 de enero de 2011. | 40 |
| Tabla 3. Diseño experimental factorial 2^3 | 45 |
| Tabla 4. Condiciones de extracción del aceite de café. | 46 |
| Tabla 5. Temperatura de los granos de café durante la tostión. | 51 |
| Tabla 6. Coloración de las muestras de café. | 52 |
| Tabla 7. Resultados del diseño experimental factorial 2^3 | 53 |
| Tabla 8. Resultados ANOVA del diseño experimental 2^3 | 53 |
| Tabla 9. Modelos polinómicos obtenidos para optimización. | 54 |
| Tabla 10. Coeficientes de la ecuación del modelo ajustado. | 54 |
| Tabla 11. Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de extracción por SFE-CO ₂ del aceite de café. | 55 |
| Tabla 12. Rendimiento de los extractos obtenidos por SFE. Flujo de CO ₂ de 40 g/min. ... | 56 |
| Tabla 13. Perfil de ácidos grasos en diferentes muestras de aceite de café. | 58 |
| Tabla 14. Cantidad relativa, (%) e identificación tentativa de los principales compuestos presentes en aceites de café con diferente grado de tostión, extraídos por SFE-CO ₂ (450 bar, 68 °C). | 84 |
| Tabla 15. Valores TEAC de las sustancias de referencia y de las sustancias control. | 89 |
| Tabla 16. Valores de TAA para las sustancias de referencia, de control y extractos de café..... | 90 |

LISTADO DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Generación del catión-radical ABTS ^{•+} | 50 |
| Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación para el dehidrocafestol..... | 65 |
| Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación para el dehidrokahweol..... | 67 |
| Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación propuestas para el 11,12-isokahweol. | 72 |
| Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación para el 16-O-isobutilcafestol. | 75 |
| Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación para el 16-O-isokahweol. | 77 |
| Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación para el cafestol..... | 79 |
| Esquema 8. Posibles rutas de fragmentación para el kahweol..... | 81 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------------|---|
| ABTS | <i>2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid</i> [Ácido 2,2'- azino- <i>bis</i> -(3-etilbezotiazolin)-6-sulfónico]. |
| ABTS⁺ | <i>2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid radical-cation</i> [Cati3n-radical del 3cido 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbezotiazolin)]. |
| AG | 3cido(s) graso(s). |
| AO | Antioxidante(s). |
| ca. | <i>Circa</i> (aproximadamente). |
| CFQA | <i>Caffeoylferuoloylquinic acids</i> (3cidos feruloilcafeoilquinicos). |
| CGA | <i>Chlorogenic acids</i> (3cidos clorog3nicos). |
| CQA | <i>Cafeoylquinic acids</i> (3cidos cafeoilquinicos). |
| FCQA | <i>Feruloylcaffeoylquinic Acids</i> (3cidos cafeoilferuloilquinicos). |
| FQA | <i>Feroloylquinic Acids</i> (3cidos feroilquinicos). |
| D.I. | Di3metro interno, mm. |
| diCQA | <i>Dicaffeoylquinic Acids</i> (3cidos dicafeoilquinicos). |
| df | Espesor de la fase estacionaria, μm . |
| DB-5MS | <i>5%-Phenyl-poly(dimethylsiloxane)</i> [Fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetil-siloxano)]. |
| et al. | <i>Et alii</i> (y otros). |
| e.g. | <i>Exempli Gratia</i> (Por ejemplo). |
| EI | <i>Electr3n Impact</i> (Impacto de electrones). |
| Ev | Electr3n-voltio(s). |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromat3grafo de gases o Cromatograf3a de gases, seg3n el contexto). |
| GC-MS | <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatograf3a de gases acoplada a espectrometr3a de masas). |
| i.e. | <i>In Exempli</i> (o sea, es decir) - <i>Id ets</i> (Es decir, o sea). |
| M⁺ | Ion molecular. |

| | |
|---------------------------|---|
| MRP | <i>Maillard Reaction Products</i> (productos de la reacción de Maillard). |
| MS | <i>Mass Spectrometry, Mass Spectrum, Mass Spectra</i> [Espectrometría de masas, espectro(s) de masas, según el contexto]. |
| MSD | <i>Mass Selective Detector</i> (Detector Selectivo de Masas). |
| pCoQA | <i>p-coumaroylquinic acids</i> (Ácidos p-cumaroilquínicos). |
| OIC | Organización Internacional del Café. |
| R² | Coefficiente de determinación. |
| RMSEC | <i>Root Mean Square Error Calibration</i> (Raíz cuadrada media del error de calibración) |
| SC-CO₂ | <i>Supercritical CO₂</i> (CO ₂ supercrítico). |
| SF | <i>Supercritical Fluid</i> (Fluido supercrítico). |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluidos supercríticos). |
| SFE-CO₂ | <i>Supercritical Fluid Extraction with CO₂</i> (Extracción con CO ₂ como fluido supercrítico). |
| Trolox® | <i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid</i> (Ácido 6-hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). |

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO DE GRANOS DE CAFÉ CON DIFERENTE GRADO DE TOSTIÓN*

Autores: Vanessa Catalina Diaz Poveda
Eva Gisselle Vásquez Orejarena**

Palabras clave: Aceite de café, extracción con fluidos supercríticos, cromatografía de gases-espectrometría de masas, cafestol, kahweol, diterpenos, ácidos grasos, capacidad antioxidante.

Existe un gran interés en la búsqueda de antioxidantes provenientes de fuentes naturales, siendo conocido el caso del potencial antioxidante de la bebida de café (extracto acuoso), hecho que orienta esta investigación hacia el conocimiento de la capacidad antioxidante de extractos de café de tipo lipídico; los cuales se obtuvieron mediante la extracción con fluidos supercríticos (CO₂), esta fracción comúnmente conocida como aceite de café, se caracteriza por su contenido de triglicéridos, diterpenos, tocoferoles y esteroides.

En general, se obtuvieron extractos (aceites) de café verde y café tostado a tres diferentes niveles de tueste y se analizó tentativamente la composición de los mismos. La fracción insaponificable fue extraída a partir de los aceites; ésta junto con la fracción lipídica total y los derivados trimetil silil de los compuestos presentes en ambas fracciones para cada extracto, fueron estudiados usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Se determinó la relación de capacidad antioxidante con el grado de tueste del café; teniendo valores de TAA total (TAA – mmol de Trolox[®]/Kg de extracto SFE) de 10.20 ± 0.2, 8.40 ± 0.4, 23.16 ± 0.3, 26.38 ± 0.2 para el aceite de café tipo verde, aceite de café tipo semitostado, aceite de café tipo catación, y aceite de café tipo consumo, respectivamente. Encontrándose un incremento de esta propiedad con el nivel de tueste de los granos de café tostados.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko Ph.D y Jairo R. Martínez Ph.D.

ABSTRACT

TITULO: DETERMINATION OF COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF OILS OBTAINED BY SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION OF COFFEE BEANS WITH DIFFERENT ROASTING DEGREE*

Authors: : Vanessa Catalina Diaz Poveda
Eva Gisselle Vásquez Orejarena**

Keywords: Coffee oil, supercritical fluid extraction (CO₂), gas chromatography-mass spectrometry, cafestol, kahweol, diterpenes, fatty acids, antioxidant capacity.

There is a big interest in searching for antioxidants from natural sources, being know the case of the potential antioxidant of coffee beverage (water extract), this fact focus our research to the knowledge of antioxidant capacity of coffee lipid extracts; these were obtained by supercritical fluid extraction (CO₂), this fraction commonly known as coffee oil is characterized by its content of triglycerides, diterpenes, tocopherols and sterols.

In general, we obtained extracts (oils) of green coffee and coffee with three different roasting degrees and tentatively analyzed its composition. From coffee oil unsaponifiable fraction was extracted, these with the total lipid fraction and trimethylsilyl derivatives of the compounds present in both fractions for each extract, were studied by using gas chromatography-mass spectrometry.

We establish the relationship between antioxidant activity and the degree of roasting coffee; TAA (TAA – mmol of Trolox[®]/Kg of SFE extract) values of 10.20 ± 0.2 , 8.40 ± 0.4 , 23.16 ± 0.3 , 26.38 ± 0.2 were obtained for green coffee, semi-roasted, cupping and consumption type coffee, respectively. Finding an increase in this property with the roasting degree of roasted coffee.

* *Undergraduate thesis.*

**Faculty of science, School of Chemistry. Advisors: Elena E. Stashenko Ph.D and Jairo R. Martínez Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El progreso de la investigación desarrollada en los últimos años sobre el café, considerado entre los consumidores como una bebida que goza de popularidad universal, ha manifestado la importancia de éste como infusión y como uno de los productos primarios más valiosos, ubicándose en segundo lugar junto al petróleo como fuente de divisas para los países en desarrollo. Su cultivo, procesamiento, transporte y comercialización proporcionan empleo a millones de personas en todo el mundo, siendo crucial en la economía y la política de muchos países. El café es producido en más de 60 países y proporciona un medio de vida a alrededor de 25 millones de familias caficultoras de todo el mundo. Para muchos de los países menos adelantados del mundo, las exportaciones de café representan una parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80 % (Organización Internacional del Café, 2007 (OIC)).

El valor de este grano se ve reflejado a su vez en el gran número de organizaciones y asociaciones creadas para el mejoramiento (del sector cafetero) y la certificación de su calidad. Por esta razón, ha surgido dentro de la industria cafetera la necesidad de generar diferentes métodos de preparación de la bebida, así como la variación de su sabor y su aroma. Es así como se han estudiado diferentes niveles de tostación a los cuales son atribuidos los efectos fisiológicos y las propiedades sensoriales, consecuencia de los productos de la reacción de Maillard (MRP) que se desarrollan durante el proceso de tostación [1]. Cada uno de los niveles de tostación poseen características propias, que corresponden a diferentes gustos o usos específicos, encontrando desde el tueste canela que posee sabor de nuez pronunciado con alto nivel de acidez, hasta el tostado espresso de sabor quemado, fuerte y dulce [2].

Debido al gran impacto que genera el café en los consumidores, se han realizado diversos estudios sobre el sabor, la composición del aroma y la capacidad antioxidante según el grado de tostación, entre otros. Recientemente se ha dirigido la atención a

estudios de la composición química, no solo de la fracción soluble en agua, sino de la fracción lipídica que durante la preparación de la bebida puede quedar descartada [3]. De modo que el estudio del aceite de café ha venido adquiriendo interés, especialmente por poseer componentes con posible actividad antioxidante y anticancerígena [4], razón por la que se ha afianzado la investigación en torno a la obtención, el análisis composicional y el estudio de sus efectos fisiológicos.

Entre las diversas técnicas de extracción empleadas para la obtención del aceite de café, la extracción con fluidos supercríticos es la que presenta mejores ventajas ya que permite obtener buenos rendimientos y extractos libres de solventes que pueden afectar la composición química y la actividad biológica de los mismos [5].

En el presente trabajo se obtuvo el aceite de café a partir de granos con diferente nivel de tuestión, empleando la extracción con CO₂ supercrítico, con el propósito de establecer las diferencias en su composición y correlacionar éstas con su actividad antioxidante.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 CAFÉ

El café (*Kawah* que significa fuerza [6]) es oriundo de la provincia de Kaffa, en el suroeste de Etiopía, pasando más tarde a Arabia y difundiéndose como bebida hace unos 800 años. Aunque otras versiones sostienen que la primera planta se cultivó en Yemen, distrito de Arabia, y que data del año 575. Sólo fue hasta los siglos XV y XVI cuando el cultivo se promovió intensamente para su uso como bebida [7], dispersándose desde la Península Arábiga a El Cairo y a todo el Imperio Otomano a mediados del siglo XV, y cruzando a finales del siglo XVI el mediterráneo [8]. El café llegó a Colombia alrededor del siglo XVIII; las primeras semillas de *Coffea arabica* fueron compradas de las Antillas Francesas y plantadas en Cúcuta. Unos años después, el café fue plantado en el Valle del Cauca y Antioquia. Para 1821, con el ánimo de estimular el cultivo, fue prohibida la importación [9].

El cafeto es un arbusto perteneciente a la familia de las rubiáceas, que puede alcanzar los 10 m en estado silvestre; en los cultivos se le mantiene normalmente en tamaño más reducido, ca. de 3 m. El fruto es denominado cereza o baya y su semilla se compone de dos partes: almendra y pergamino (**Figura 1**).



A.



B.

Figura 1. A. Fotografía del fruto del cafeto. B. Fotografía de la semilla del cafeto.

La almendra es dura y de color verdoso cubierta de una película plateada cuando está seca, y del embrión, que es una planta muy pequeña que está dentro de la almendra. Protegiendo la semilla se encuentra el pergamino que está cubierto de una sustancia azucarada que es el “mucílago” o “baba”. La parte roja o amarilla del fruto maduro se conoce con el nombre de pulpa [10]. Las dos especies de interés comercial en el género *Coffea* son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* var. *Robusta*, conocidos como arábica y robusta, respectivamente [11]. El *C. arabica*, originario de Etiopía produce un café fino, aromático que necesita de clima fresco, siendo un cultivo delicado, menos productivo y reservado a tierras de alta montaña. El *C. robusta*, originario del Congo es resistente al clima caliente y a los parásitos, y debido a estas características de resistencia en comparación con el arábica se le denominó robusta [12,13].

1.1.1 *Coffea arabica*. *C. arabica* es un arbusto pequeño con flores blancas y bayas rojas también conocidas como cerezas. Su crecimiento es mejor entre los dos trópicos, a una altura tal que la temperatura no exceda 22 °C o disminuya de los 18 °C [11]. El café arábigo tiene un fino y pronunciado “*flavor*”, produciendo una bebida más apreciada [12]. En Colombia únicamente se cultivan los cafés arábigos que producen una bebida suave y de mayor aceptación en el mercado mundial denominados como Típica, Borbón, Tabi, Caturra y Variedad Colombia [13].

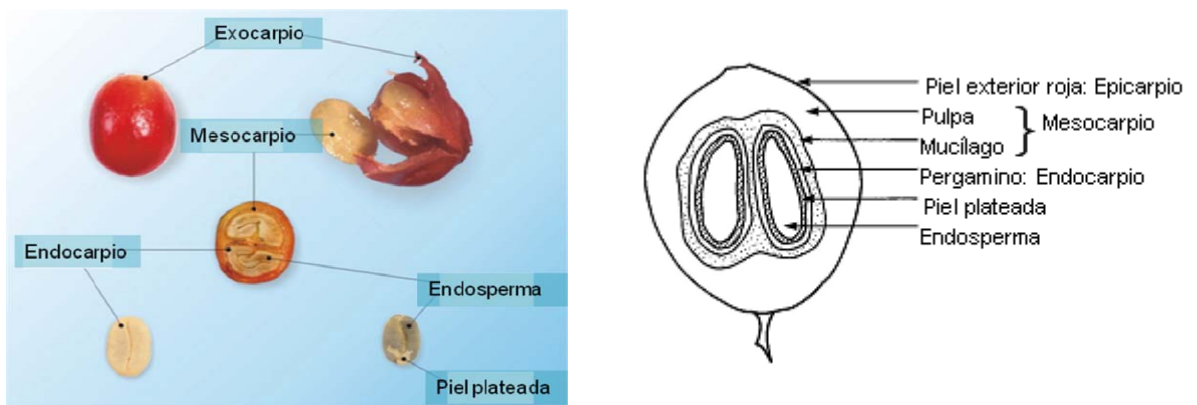


Figura 2. La cereza de café en un diagrama de la sección transversal.

1.1.2 Café verde. Los granos de café verde se obtienen de la cereza o baya (normalmente dos en una baya) [6]. Este proceso implica la remoción del epicarpio (piel exterior roja), del mesocarpio (pulpa y mucílago), del endocarpio (pergamino) y, por último, la piel plateada que cubre el endosperma (**Figura 2**) [11].

El café verde no tiene sabor o aroma propio y sus compuestos químicos incluyen numerosos complejos, sustancias relativamente insolubles, que generalmente son poco volátiles y “*nonflavor*”. El grano de café intacto puede ser considerado como una pequeña autoclave donde en el proceso de tostación estas sustancias reaccionan e interactúan en condiciones controladas para producir el deseable producto final [14].

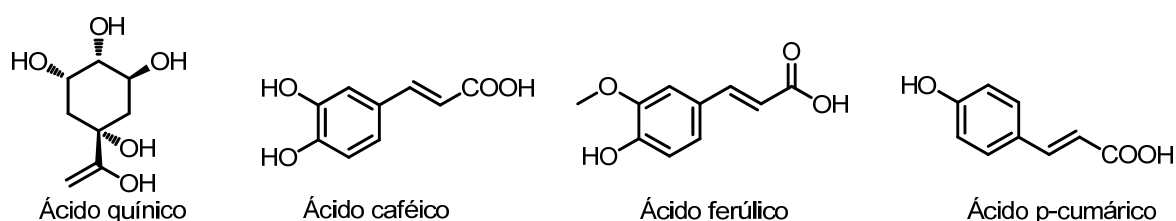


Figura 3. Fórmula estructural de los compuestos base de los CGA.

Los ácidos clorogénicos (CGA), ésteres del ácido quínico con varios ácidos hidroxicinámicos, particularmente ácido caféico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico (**Figura 3**), hacen parte de los compuestos más importantes presentes en los granos de café verde [6]. Éstos se dividen en seis clases: ácidos cafeoilquínicos (CQA), ácidos dicafeoilquínicos (diCQA), ácidos feruloilquínicos (FQA), ácidos p-cumaroilquínicos (pCoQA), ácidos cafeoilferuloilquínicos (CFQA) y ácidos feruloilcafeoilquínicos (FCQA). Los primeros tres representan cerca del 98 % del contenido de ácidos clorogénicos, siendo los ácidos cafeoilquínicos mayoritarios [16].

La trigonelina, alcaloides como la cafeína, lípidos como cafestol y kahweol, aminoácidos como el ácido glutámico y carbohidratos como la sacarosa (**Figura 4**), también hacen parte de la composición química del café verde, y junto a los CGA constituyen los componentes no volátiles y los precursores del sabor del café tostado [6].

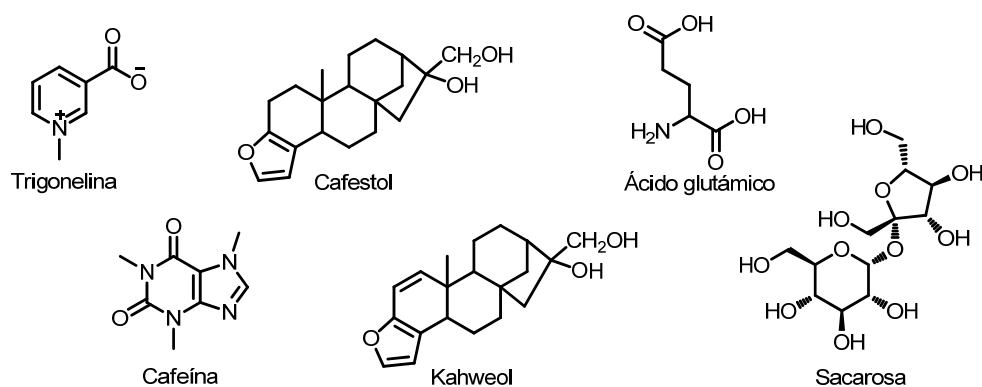


Figura 4. Fórmula estructural de algunos componentes presentes en el café verde.

1.2 TOSTIÓN DEL CAFÉ: PROCESO Y REACCIÓN DE MAILLARD

La tostación de los granos de café verde es considerada como una delicada y artesanal operación con la que el café desvela sus secretos. Los granos varían de aspecto hinchándose, cambiando de color y haciéndose quebradizos [17]. Durante este proceso, los granos están sometidos a altas temperaturas por diferentes tiempos dependiendo de las características deseadas en el producto final.

El proceso puede ser dividido en tres etapas: (i) secado (ii) tostado y pirólisis (iii) enfriamiento [18]. La primera etapa del proceso consiste en la pérdida de peso del grano de ca. 15-20 % debido a la evaporación del agua, etapa endotérmica donde los granos están relativamente secos y aumentan su temperatura. La segunda etapa es exotérmica, el grano aumenta de volumen entre 100-120 % liberando compuestos orgánicos volátiles, CO₂ (una parte se escapa y otra es retenida en las células del grano), y agua. Los granos se tornan marrones ocurriendo la primera crepitación, generando un cambio en sus propiedades fisicoquímicas y produciendo reacciones de oxidación, de reducción y de polimerización que conducen a la formación de sustancias esenciales para dar entre otros, las cualidades sensoriales de sabor y de aroma característicos del café. Durante la segunda etapa hay un breve período endotérmico que es seguido por otro período exotérmico, donde ocurre la segunda crepitación (**Figura 5**) [19, 20]. Finalmente, el café es enfriado rápidamente para detener las reacciones y prevenir que se quemé.

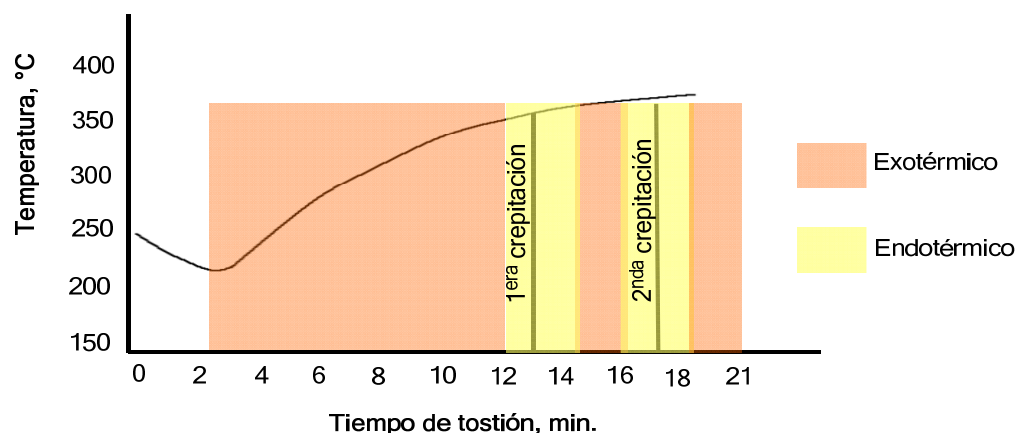


Figura 5. Curva de temperatura de granos de café durante el proceso de tuestión.

La tuestión de los granos genera pérdida de peso, reducción de la densidad y cambio de color. Este último es considerado como el parámetro más usado para describir el nivel de tuestión del grano, clasificado generalmente como verde, muy ligero, ligero, medio, medio oscuro y oscuro [21, 22]. No obstante, estudios han reportado que la consecución de los mismos colores del grano con diferentes condiciones de temperatura y tiempo, no implica necesariamente que el café sea equivalente en términos de aroma y propiedades físicas [23]. En consecuencia, durante el calentamiento el color verde cambia a amarillo, luego a tonos marrones hasta un color marrón-negro, dependiendo de las características requeridas y del tiempo y temperatura a la que sean sometidos los granos (**Figura 6**) [25], de manera que no necesariamente el grano es llevado hasta la segunda crepitación.

Las altas temperaturas a las que son sometidos los granos (180-240 °C) favorecen la reacción de Maillard, reconocida como la principal ruta del “*flavor*” y “*browning*” en alimentos cocinados con contenido de carbohidratos y aminos [1,26], donde se genera una elevada carga volátil que incluye más de 800 componentes con un amplio rango de grupos funcionales. Algunos componentes del café verde como la celulosa, la lignina, la cafeína y los compuestos inorgánicos no reaccionan de manera significativa. Otros como la sacarosa, azúcares reductores, proteínas, CGA, trigonelina, y ciertos aminoácidos reaccionan ampliamente siendo parcialmente o totalmente degradados [18].



Figura 6. Coloración de A. Grano verde, B. Grano semitostado o muy ligero, C. Grano punto medio o ligero, D. Grano tipo catación o medio y E. Grano tipo consumo u oscuro.

Camille Maillard (1912) fue el primer químico en observar que los aminoácidos libres derivados de péptidos y proteínas, interactuaban con azúcares reductores para formar heterociclos con átomos de nitrógeno y melanoidinas marrones [6]. Esta reacción, denominada en su honor reacción de Maillard, ha sido objeto de estudio para la identificación de los compuestos que le dan el sabor, el aroma y el color característicos a los alimentos calentados [26]. El mayor producto de esta reacción son las melanoidinas y otros compuestos no volátiles. Más de 3500 compuestos volátiles han sido atribuidos a esta reacción [27].

En general, la ruta de la reacción de Maillard produce compuestos que se pueden clasificar en tres grupos: derivados de la deshidrogenación-fragmentación de los azúcares como lo son furanos, pironas, ciclopentenos, compuestos carbonílicos y ácidos; derivados de la degradación de los aminoácidos como aldehídos y compuestos azufrados, y compuestos heterocíclicos con contenido de nitrógeno, como los pirroles, pirazinas, imidazoles y oxazoles [28].

1.3 ACEITE DE CAFÉ

La fracción lipídica del café se encuentran distribuida en la endosperma del grano y la capa externa, en la que prima el contenido de ceras [29]. El contenido lipídico en granos de café verde es de ca. 7-17 %, varía de acuerdo con el tipo café, siendo para la especie *Coffea arabica* de ca. 15 % y para *Coffea canephora var. Robusta* de ca. 10 %. Anese *et al.* (2000) reportan que luego del proceso de tostación este porcentaje se mantiene constante; se presentan contenidos de aceite fijo de ca.12-18 % [30] y depende no solo

de la naturaleza del grano sino del método de extracción y las condiciones del mismo [31]. En general, ésta fracción es denominada aceite de café. El aceite de café verde es usado en el tratamiento cefaleas y asma, como componente en productos cosméticos, como nutracéutico y como conservante [32-34]. El aceite de café tostado se usado como ingrediente saborizante (e.g. helados, bebidas) [3, 35], en especial, del café instantáneo para el mejoramiento de su aroma y su sabor [11]; además ha sido propuesto como fuente para la producción de biodiesel [36-37].

Los lípidos en el café corresponden a ácidos grasos (AG), tocoferoles, esteroides y diterpenos. Los AG se encuentran en diferentes formas, pueden estar esterificados con el glicerol en los triglicéridos, con diterpenos o con esteroides. Mayoritariamente se encuentran el ácido palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) [38]. Por esterificación de los ácidos grasos, Oliveira *et al.* concuerda con Calligaris *et al.* en que en mayor cantidad se encuentran el C18:2, seguido de C16, C18 y C18:1; en menor proporción el ácido araquidónico (C20) y en trazas los ácidos gadoleico (C20:1) y behénico (C22) [34]. Para el café verde se han realizado análisis del contenido total de ácidos grasos, ácidos grasos libres y triglicéridos; Jham *et al.* (2003) estudiaron ácidos grasos en triglicéridos de granos de café. De acuerdo con Casal *et al.* (1997) y Alves *et al.* (2003), durante el proceso de tostación se evidencia un incremento en los ácidos grasos *trans*, especialmente C18:2ct y C18:2tc. En cafés arabica y robusta se han detectado 9 ácidos grasos libres con una gran proporción de C18:2 y C16, y con diferencia en el contenido de C18 y C18:1[29].

La fracción lipídica no saponificable corresponde a ca. 1.3-1.9 % (p/p) en granos verdes de café arabica y de ca. 0.2-1.5 % en café robusta [38,40]. Su composición está representada en mayor parte por diterpenos pentacíclicos, que únicamente han sido encontrados en el café; los más representativos son el kahweol, el cafestol y el 16-O-metilcafestol. Éste último se encuentra únicamente en el café Robusta, al igual que el 16-O-metilkahweol [29] (**Figura 7**). En su forma libre son componentes minoritarios y su contenido puede disminuir ca.80 % durante la tosti3n. [41].

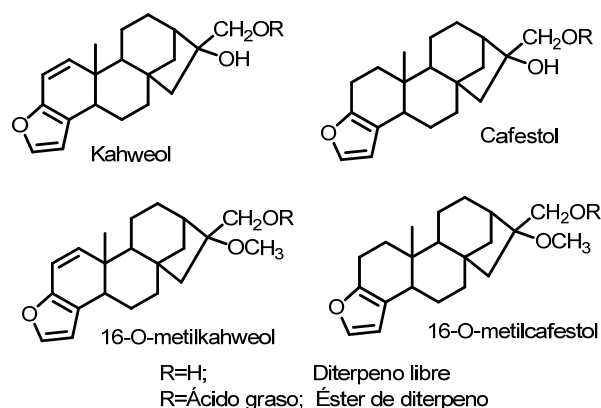


Figura 7. Fórmula estructural de los diterpenos presentes en el café.

En mayor parte, los diterpenos se encuentran esterificados por AG, ca. 98 % está constituido por los ácidos grasos C16, C17, C18, C18:1, C18:2, C18:3 C20, C20:1, C21, C22, C23 y C24 [31, 42, 45]. Han sido analizados en diferentes tipos de extractos y bebidas de café [43, 46] y cuantificados usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector ultravioleta (UV) [47].

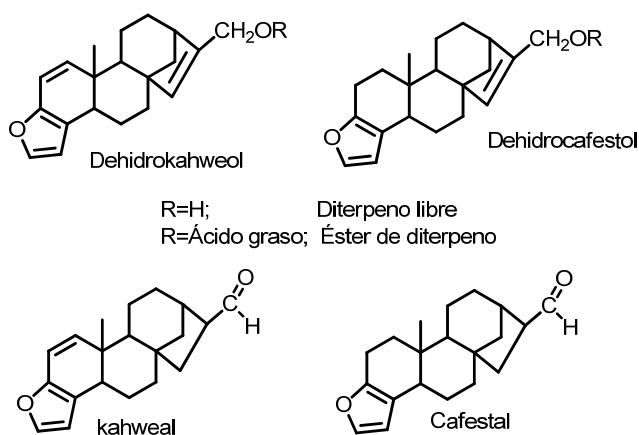


Figura 8. Fórmula estructural de los productos de descomposición del cafestol y kahweol.

Con el proceso de tostación nuevos diterpenos son formados a partir del cafestol y kahweol, algunos productos de degradación han sido identificados como dehidrocafestol, dehidrokahweol, cafestal y kahweal (**Figura 8**). La descomposición es particularmente

notable en los diterpenos libres, sin embargo, Kurzrock *et al.* (1998) [31] demostraron la presencia de productos de deshidratación de ésteres de cafestol. Otros diterpenos se han aislado como el coffeadiol ($C_{19}H_{30}O_2$) [48] y arabiol I ($C_{22}H_{28}O_2$) que fueron identificados únicamente en café arábica colombiano [29] (**Figura 9**).

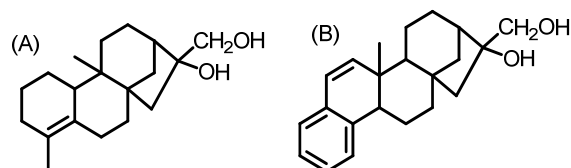


Figura 9. Fórmula estructural de A. Coffeadiol y B. Arabiol I.

Así mismo, se presentan estudios de sus efectos en la salud, potencialmente el aceite de café incrementa los niveles de colesterol en humanos a causa de estos diterpenos [38, 49]; su consumo está asociado con el incremento del riesgo de enfermedades en el corazón [38, 50] y también a un posible efecto protector contra el cáncer [51,52].

Tabla 1. Distribución, (%) de desmetilesteroles en café arábica Mariani *et al.* (1991) [31].

| Esteroles | Distribución, % |
|--------------------------------|------------------------|
| Colesterol | 0.3 |
| Campesterol | 15.8 |
| Estigmasterol | 21.9 |
| β -sitosterol | 51.6 |
| Δ 5-avenasterol | 2.7 |
| Campestanol | 0.4 |
| 24-metilenecolesterol | 0.2 |
| sitoestanol | 2 |
| Δ 7-estigmastenol | 2.2 |
| Δ 7-avenasterol | 1.5 |
| Δ 7-campesterol | 0.6 |
| Δ 5,23-estigmastadienol | 0.3 |
| Δ 5,24-estigmastadienol | 0.1 |
| Clerosterol | 0.5 |

Un 5.4% de los lípidos en el café arábica corresponde a esteroides. Picard *et al.* (1984) determinaron que ca. 40 % de éstos está libre y el ca. 60 % restante esterificado, preferiblemente con C18, C16 y C18. Se han analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) los derivados éteres trimetilsilílicos [44,53], estando en mayor cantidad el β -sitoesterol (ca. 50%), el estigmasterol, el campesterol, el 24-metilenecolesterol y el Δ^5 -avenaesterol; los dos últimos se encuentran en mayores cantidades en la variedad robusta (**Tabla 1**) [31].

La presencia de tocoferoles en el aceite de café fue determinada inicialmente por Folstar *et al.* (1977); se han analizado los perfiles de tocoferol (α , β y γ) (**Figura 10**). Aoyama *et al.* (1988) encontraron en diferentes tipos de café proporciones de 2:4:0.1 respectivamente [31]. Las proporciones de β -tocopherol son de 47.12 $\mu\text{g/g}$ para café verde y 106.60 $\mu\text{g/g}$ para los tostados, 2.63 $\mu\text{g/g}$ y 70.99 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocopherol para verde y tostado respectivamente; y en cuanto al α -tocopherol en café tostado varían entre 7.55 y 33.54 $\mu\text{g/g}$, para café verde 2.02 y 16.76 $\mu\text{g/g}$ [12]. Kölling-Speer *et al.* (2006) reportaron 3.5 mg/100 g α -tocopherol y 8.4 mg/100 g, para β -tocopherol. Durante la tuestión hay pérdida de ca. 6 % de los tocoferoles totales [29], resultados que son concordantes con determinaciones de vitamina E en cafés provenientes de distintos sitios de origen [54, 55].

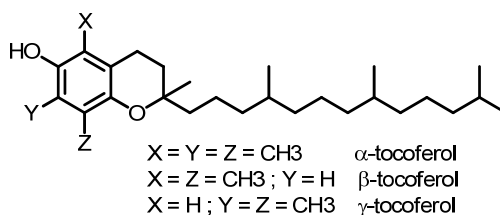


Figura 10. Estructura de los tocoferoles.

Sarrazin *et al.* (2000) [56] realizaron el análisis sensorial del aceite de café comparando las características de diversos extractos, donde el aceite de café es superado en cuanto a la similitud con respecto al aroma del grano de café (verde y tostado) por extractos provenientes de destilación-extracción simultánea.

1.4. EXTRACCION DEL ACEITE DE CAFÉ

1.4.1 Generalidades. El aislamiento del aceite de café se lleva a cabo por métodos como extrusión (compresión en frío de los granos), extracción en fase sólida (Soxhlet) y extracción con fluido supercrítico (SFE). Se ha realizado en países como Brasil, Italia y Francia, siendo uno de los métodos más empleados la SFE [3, 35, 56]. En Colombia, se han realizado algunos análisis de los volátiles del aceite de café obtenido por extrusión [30], así como estudios comparativos del aroma de varias marcas de café, que incluyen el uso de varios métodos de extracción como la SFE [57].

El aceite de café verde obtenido por presión en frío es una mezcla de diferentes clases de compuestos con triglicéridos representados en 75% de masa, de color marrón-verde oscuro con un aspecto turbio atribuido a la presencia de pigmentos y otros componentes como clorofila, terpenos, esteroides y ceras, entre otros [58]. El aceite de café tostado obtenido por presión, está compuesto por una fracción lipídica y volátil típica del aroma de café. Sus constituyentes aromáticos son de media y baja volatilidad [59] y presenta un intenso olor “quemado” debido a la pirólisis ocurrida durante la compresión [58].

La extracción Soxhlet es ampliamente usada [29, 60]; presenta buenos rendimientos, pero inconvenientes como largos tiempos de extracción, consumo de altas cantidades y remanentes de disolventes. Diversos autores emplean disolventes tales como dietil éter, éter de petróleo y hexano [29, 37], que son peligrosos, difíciles de manejar y que pueden generar degradación del aceite [58]; los resultados de las extracciones no son homogéneos, la composición varía de acuerdo con el disolvente utilizado, en ciertos casos sustancias polares o no lipídicas pueden o no ser extraídas [29].

1.4.2 Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE). La SFE es una técnica de separación de sustancias disueltas o incluidas dentro de una matriz, que utiliza la habilidad de ciertos compuestos de convertirse en excelentes disolventes para algunos solutos, modificando su capacidad de disolución a determinada temperatura y presión [61,62]. El término fluido supercrítico (SF) hace referencia a un gas o líquido por encima

de su temperatura (T_c) y presión (P_c) críticas (*i.e.* sobre su punto crítico), condiciones en las cuales los dos estados se hacen indistinguibles [61, 63].

El fluido más usado para la SFE es el dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), debido a que es seguro, no tóxico en comparación con solventes orgánicos, no inflamable y sus puntos críticos son fácilmente obtenidos (31°C, 7.8 MPa) [62, 64, 65]. La extracción usando SC-CO₂ ofrece separaciones selectivas, sin dejar residuos tóxicos en los extractos, no hay riesgo de degradación térmica debido a que las condiciones de temperatura son relativamente bajas. El poder solvador y propiedades de transporte adquiridos por los fluidos cerca de sus puntos críticos permiten una mayor penetración en una matriz sólida, y por ende, una más eficiente y rápida extracción; la solubilidad de un analito puede ser altamente afectada por pequeños cambios en la presión y puede ser incrementado adicionando un disolvente modificador polar (*e.g.* etanol, metanol) [58, 61, 63, 64, 66].

Ésta técnica es ampliamente usada en la extracción de sustancias bioactivas (antioxidantes, flavonoides, aceites esenciales, carotenoides, etc.) a partir de materiales biológicos [63, 67-69]. Haciendo referencia específicamente al café, la SFE ha sido utilizada para la extracción selectiva de cafeína [70-72] y CGA reemplazando técnicas convencionales que incluyen la utilización de disolventes orgánicos como cloroformo y diclorometano [58]. En la extracción de su aceite, se ha obtenido aceite de café verde, de café tostado [73] y se han extraído sus diterpenos [58]. Además, se ha aplicado en la refinación de extractos obtenidos mediante otras técnicas para alcanzar una mayor similitud con respecto al aroma del grano [56, 74, 75].

1.5 ANTIOXIDANTES (AO)

Un AO se define como cualquier sustancia que al estar presente en bajas concentraciones, en comparación con la del sustrato oxidable, inhibe o previene su oxidación [76, 77]. Los AO se clasifican de acuerdo a su origen como naturales o sintéticos. Según Krinsky (1992) un antioxidante biológico o natural es un “compuesto que protege sistemas biológicos en contra de los efectos dañinos potenciales de los procesos

o reacciones que causen oxidación extensiva” [78], y son extraídos a partir de plantas, tejidos animales, o producto del procesamiento de los alimentos, comúnmente son compuestos fenólicos, tales como tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos. Los sintéticos son igualmente compuestos fenólicos pero a estos les han sido introducidos grupos alquílicos con el fin de aumentar su solubilidad en grasas [79].

1.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CAFÉ

Uno de los mayores beneficios encontrados en el café es su efecto antioxidante, razón por la que ha sido objeto de diversas investigaciones con el propósito de determinar los componentes que le otorgan esta propiedad. Dentro de éstos se destacan los CGA, los ácidos fenólicos y los polifenoles presentes en el grano verde, cuyo contenido varía según la especie de café (robusta o arabica) [80,81], y los MRP generados durante el proceso de tostación de los granos de café verde [82]. Estos compuestos presentan átomos o grupos de átomos capaces de liberar electrones que son captados por los radicales libres. Evitan así que se desaten reacciones que causen daño y destruyan las células del cuerpo.

La variación de la capacidad antioxidante en el café se debe a las importantes modificaciones que sufren los granos durante la tostión. El efecto de éste proceso ha sido fuertemente investigado en la bebida de café, obteniendo resultados discordantes entre si [83]. Gómez *et al.* (2008) [84] analizaron la composición del café según el grado de tostación identificando la presencia de cafeína y compuestos fenólicos como ácido vanílico, ácido ferúlico y como principal isómero de los CGA el ácido 3-cafeoilquínico, encontrados en mayor proporción en el café verde y cuya cantidad disminuye con el aumento del grado de tostación, generando compuestos “marrones”, específicamente melanoidinas MRP. La evaluación de la capacidad antioxidante permitió conocer que el extracto de café, oscuro y verde poseen capacidad antioxidante significativamente alta, comparada con las muestras de café tostado claro y de café tostado medio. No obstante, los compuestos “marrones” presentes en el extracto de café oscuro son más efectivos para inhibir radicales libres que los compuestos fenólicos presentes en el café verde.

Daglia *et al.* (2000) [85] y Daglia *et al.* (2004) [86] indican que hay una disminución de la capacidad antioxidante de bebidas preparadas a partir de café de tostado medio, y un aumento con las preparadas a partir de café verde y de café de tostado oscuro.

De otro modo, Nicoli *et al.* (1997) [87] concluyen que el efecto antioxidante debido a los MRP no se incrementa linealmente con el grado de tostación, de manera que existe un aumento de la capacidad antioxidante en bebidas preparadas a base de café de tostado medio y una disminución en las preparadas a base de café de tostado oscuro. Los resultados obtenidos por Sánchez *et al.* (2005) [88], establecen que hay un incremento en la capacidad antioxidante en bebidas a base de café tostado oscuro. Borrelli *et al.* (2002) [89] indican que la capacidad antioxidante disminuye a medida que la intensidad de la tostación aumenta, pero la capacidad de impedir la peroxidación del ácido linoléico es mayor con el aumento de la tostación.

Estas discrepancias pueden ser debidas al método empleado para evaluar la capacidad antioxidante, así como la definición de un grado de tostación considerado como ligero, medio y oscuro principalmente, proceso que generalmente es controlado por la coloración adquirida por el grano. Además, la especie de café empleada afecta directamente la composición del grano, que a pesar de que sea de la misma especie puede cambiar según sea su origen, el clima y el suelo donde la planta sea cultivada, generando una variación en la humedad del grano [83-86].

A pesar de los buenos resultados encontrados, la capacidad antioxidante de los componentes presentes en el café no es tan fuerte como la comparada con otros antioxidantes naturales conocidos, como el α -tocoferol. Sin embargo, la suma total de la capacidad antioxidante de estos compuestos puede contribuir significativamente a los efectos hallados en la bebida de café [75]. Es así, como la capacidad antioxidante encontrada en el café y en otros alimentos de origen vegetal es debida a la variedad de su composición química, expresada como una mezcla óptima de antioxidantes que pueden poseer un mecanismo complementario de acción y de potencial redox diferente, siendo la base de su efecto en la salud [90].

2. CIENCIOMETRÍA

Según los resultados obtenidos en el estudio cuantitativo en la base de datos de *Scopus* (**Tabla 2**), se puede apreciar que la investigación en torno a la extracción con fluidos supercríticos se ha venido incrementando, manteniéndose como un campo de constante investigación. Su aplicación a la obtención de extractos de café es variable, siendo el año 2000 el de mayor número de publicaciones con 5 en total; la mayor cantidad de publicaciones se encuentra en revistas de alto impacto como *Journal of Supercritical Fluids* y *Journal of Chromatography A*.

Relacionando los resultados de la ecuación de búsqueda *coffee oil* en las bases de datos de *Scopus* y de *Web of Science*, entre los años 2000-2011, se aprecia que el número de registros es menor en la base de datos *Web of Science*, en comparación con *Scopus*. En la **Figura 11** se observa un incremento progresivo en el número de publicaciones, el año de mayor registro sobre el tema es el 2009 con un total de 43. Como es de esperarse, los mayores registros en cuanto al aceite de café provienen de áreas del conocimiento como ciencias de la agricultura y biología, química y química de alimentos, con 179, 95 y 7 publicaciones, respectivamente.

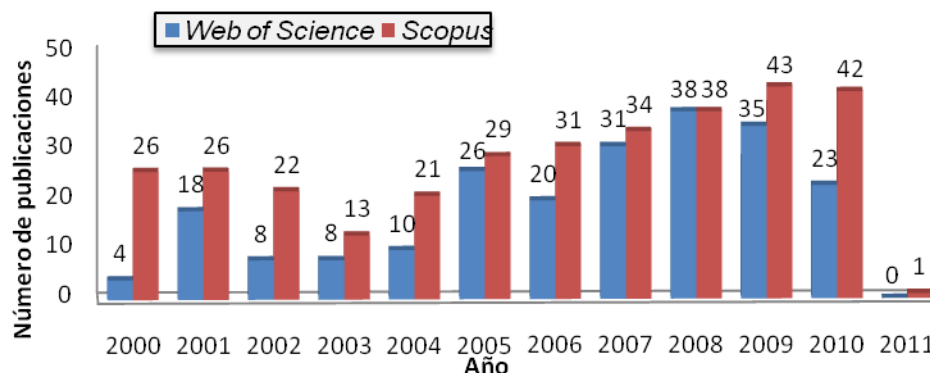


Figura 11. Relación área – número de publicaciones sobre aceite de café. Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Período de observación: 2000 – 2011. Fecha de consulta: 5 de enero de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (coffee oil).

Es notoria la gran cantidad de patentes encontradas. Éstas superan en una proporción considerable el número de artículos existentes; lo que refleja la importancia de las aplicaciones de la obtención de extractos de café mediante extracción con fluido supercrítico. La *US Patent Office (USPTO)* y *World Intellectual Property Organization (WIPO)* se presentan como las oficinas con mayor número de patentes registradas. Por otra parte, usando la base de datos *Web of Science* se logró relacionar el número de publicaciones con los países de origen de las mismas (**Figura 12**), es interesante ver que Colombia solo registra 3 publicaciones y es superado por diversos países, algunos de ellos sin producción de café e.g. Estados Unidos el cual presenta mayor registro de publicaciones en el tema.

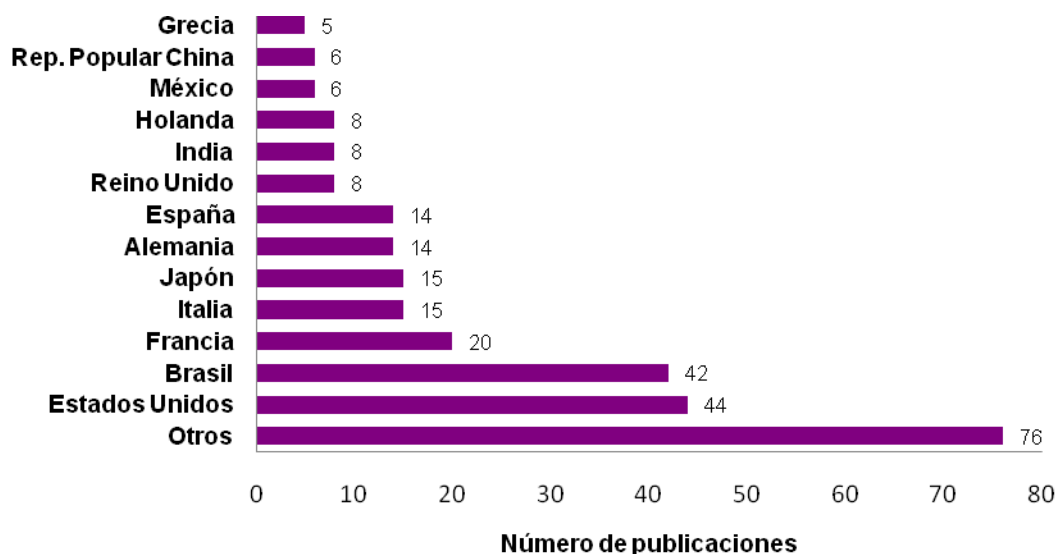


Figura 12. Relación países – número de publicaciones sobre aceite de café. Fuente: *Web of Science*. Periodo de observación: 2000 – 2011. Fecha de consulta: 5 de enero de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (coffee oil).

Las investigaciones de las propiedades antioxidantes del café han incrementado. Para el año 2010 se encuentra la mayor cantidad de publicaciones (59); pero no se encuentran suficientes registros aún del análisis de esta propiedad en la fracción lipídica del café, lo que hace ver al estudio de la relación de las propiedades antioxidantes y el aceite de café como un tema que vale la pena explorar más a fondo (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo de extracción de aceite café con fluidos supercríticos y su capacidad antioxidante con bases en los de datos *Scopus*. Fecha de búsqueda: 5 de enero de 2011.

| SCOPUS | | | | | |
|--|--|--|---|--|---|
| | <i>Supercritical fluid extraction</i> ¹ | <i>Supercritical fluid extraction and coffee</i> ² | <i>Coffee oil</i> ³ | <i>Coffee and antioxidant</i> ⁴ | <i>Coffee oil and antioxidant</i> ⁵ |
| No. Total de artículos | 7191 | 34 | 561 | 485 | 3 |
| 3 Años con mayor cantidad de publicaciones | 2010 (628) 2009 (667) 2008 (510) | 2009 (3) 1997 (3) 2000 (5) | 2010 (41) 2009 (43) 2008 (38) | 2007 (57) 2008 (59) 2010 (59) | 2007 (1) 2000 (2) |
| 3 Autores con mayor cantidad de publicaciones | Taylor, L.T. (88) Hawthorne, S.B. (69) Wai, C.M. (67) | Mazzafera, P. (3) Mohamed, R.S. (3) Albert, K. (2) | Franca, A.S. (6) Speer, K. (5) Mazzafera, P. (5) Talamini, R. (5) Brunner, G. (5) | Morales, F.J. (8) Shibamoto, T. (8) Cid, C. (7) | Alvarez, A.M.R. (1) Anese, M. (1) Bitá, M.G. (1) |
| 3 Revistas con mayor número de publicaciones | - <i>Journal of Supercritical Fluids</i> (659) - <i>Journal of Chromatography A</i> (327) - <i>Industrial and Engineering Chemistry Research</i> (240) | - <i>Journal of Chromatography A</i> (6) - <i>Analytical Chemistry</i> (4) - <i>Brazilian Journal of Chemical Engineering</i> (3) | - <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> (12) - <i>Department of State Publication Background Notes Series</i> (7) - <i>Food Chemistry</i> (7) | - <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> (53) - <i>Food Chemistry</i> (22) - <i>Journal of Nutrition</i> (14) | - <i>Grasas Y Aceites</i> (1) - <i>Italian Journal of Food Science</i> (1) - <i>Revista De Chimie</i> (1) |
| 3 Áreas de mayor investigación | - <i>Chemistry</i> (3.897) - <i>Chemical Engineering</i> (2.228) - <i>Materials Science</i> (1.170) | - <i>Chemistry</i> (18) - <i>Chemical Engineering</i> (12) - <i>Agricultural and Biological Sciences</i> (6) | - <i>Food Chemistry</i> (7) - <i>Agricultural and Biological Sciences</i> (179) - <i>Chemistry</i> (95) | - <i>Agricultural and Biological Sciences</i> (230) - <i>Medicine</i> (199) - <i>Chemistry</i> (112) | - <i>Agricultural and Biological Sciences</i> (2) - <i>Chemistry</i> (2) - <i>Chemical Engineering</i> (1) |
| No. Total de patentes | 10398 | 342 | 29144 | 4461 | 80 |
| 3 Oficinas con sus respectivas patentes | - <i>US Patent Office</i> (6.200) - <i>World Intellectual Property Organization (WIPO)</i> (2.763) - <i>European Patent Office</i> (1.116) | - <i>US Patent Office</i> (201) - <i>World Intellectual Property Organization (WIPO)</i> (89) - <i>European Patent Office</i> (45) | - <i>US Patent Office</i> (17.527) - <i>World Intellectual Property Organization (WIPO)</i> (6.722) - <i>European Patent Office</i> (3.252) | - <i>US Patent Office</i> (2571) - <i>World Intellectual Property Organization (WIPO)</i> (1258) - <i>European Patent Office</i> (534) | - <i>US Patent Office</i> (52) - <i>World Intellectual Property Organization (WIPO)</i> (15) - <i>European Patent Office</i> (10) |

Ecuación de búsqueda: ¹ TITLE-ABS-KEY(*supercritical fluid extraction*), ² TITLE-ABS-KEY("supercritical fluid extraction" AND *coffee*), ³ TITLE-ABS-KEY(*coffee oil*), ⁴ TITLE-ABS-KEY("coffee" AND *antioxidant*), ⁵ TITLE-ABS-KEY("coffee oil" AND *antioxidant*).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y solventes. Se emplearon los siguientes reactivos: vitamina E (97%), Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, 97%), butilhidroxianisol (BHA, 99%), cafeína (99.9%), ácido linoleico (99%), ácido caféico (99 %) sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS, 98%) marca *Aldrich Chemical Co. Inc.*, (Milwaukee, WI., EE.UU.), persulfato de potasio (99%), agua grado HPLC, acetato de sodio marca *J. T Baker* (México, D. F., México), ácido clorhídrico (1M), etanol (99.8%) y diclorometano (99.9%) marca *Riedel-de Haën de Sigma-Aldrich* (Buchs, Suiza), dióxido de carbono (99.98%) marca *Linde* (Bucaramanga, Colombia).

3.1.2 Material de laboratorio. Se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285, pHmetro MPC227 de *Mettler Toledo* (Schwerzenbach, Suiza), baño ultrasónico LC-20H de *Ultrasonic* (Darmstadt, Alemania), balones aforados de 2, 5, 10, 25, 50 mL, vasos de precipitado de 50, 100, 600, 1000 mL, tubos de ensayo *Scott* (Texas, EE.UU.). Micropipetas de 2-20, 25-250, 100-1000 µL, micropipeta multicanal de 20-200 µL, puntas plásticas para micropipetas. Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL, dispensadores para solventes y pipetas Pasteur desechables marca *Brand* (Wertheim, Alemania).

3.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ.

27 kg de café verde (*Coffea arabica*) variedad Colombia (mezcla de tipos de café) fueron proporcionados por los Almacenes Generales de Depósito de Café, ALMACAFÉ. Las muestras fueron homogenizadas en un equipo *Presition divider*, GAMET MFG. CO. Serial n. 1Y991722 (Minn., EE. UU.) (**Figura 13**), y divididas en cuatro.



Figura 13. Equipo *Presition divider*, Gamet GAMET MFG. CO. Serial n. 1Y991722 (Minn., EE. UU.).

3.3 TOSTIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ

El proceso de tostión de las muestras se realizó en un equipo SASA-SAMIAC (43 AV. Du Mal Le.360 Le Cateau) (**Figura 14**) de tambor giratorio horizontal con capacidad para 3 kg, en las instalaciones de ALMACAFÉ. El equipo funciona a través de una resistencia que se calienta y por conducción genera las tosti3n de los granos. Se utilizaron tres diferentes grados de tosti3n, caf3 tipo semitostado, caf3 tipo cataci3n y caf3 tipo consumo. Cada una de las muestras se dividi3 en tres lotes.



Figura 14. Equipo SASA-SAMIAC (43 AV. Du Mal Le.360 Le Cateau).

3.4 MEDICIÓN DEL COLOR DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ

La medición del color de las muestras se realizó en un espectrofotómetro *HunterLab* modelo XE Geometría 0/45° (Reston, Virginia, EE.UU.), en las instalaciones de ALMACAFÉ. Los resultados fueron expresados en la escala *CIELab*, midiendo el valor de la luminosidad de los granos (L^*).

3.5 MOLIENDA DEL CAFÉ

Se molieron las muestras de café, tipo catación y tipo consumo, empleando un molino Bunn, Modelo G3 HD, BLK 2009 (Springfield, Illinois, EE.UU.), en las instalaciones de ALMACAFÉ. Para las muestras de café tipo verde y café tipo semitostado se utilizó un molino criogénico de bolas SPEX SamplePrep Freezer/Mills en las instalaciones de CENICAFÉ en Chinchiná, Caldas.

3.6 PRUEBAS PRELIMINARES PARA SFE

Los extractos de café fueron obtenidos empleando un equipo de extracción con fluido supercrítico CO₂ Thar SFE-2000-2-FMC50 (*Thar Instruments, Inc.*, Pittsburgh, PA, EE.UU.) (Figura 15).



Figura 15. Equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 (*Thar Instruments, Inc.*, Pittsburgh, PA, EE.UU.).

Se probaron diferentes condiciones de extracción, presión, temperatura, tiempo de extracción, flujo de CO₂ y grado de tuestión de las muestras. El diagrama del proceso se indica en la **Figura 16**.

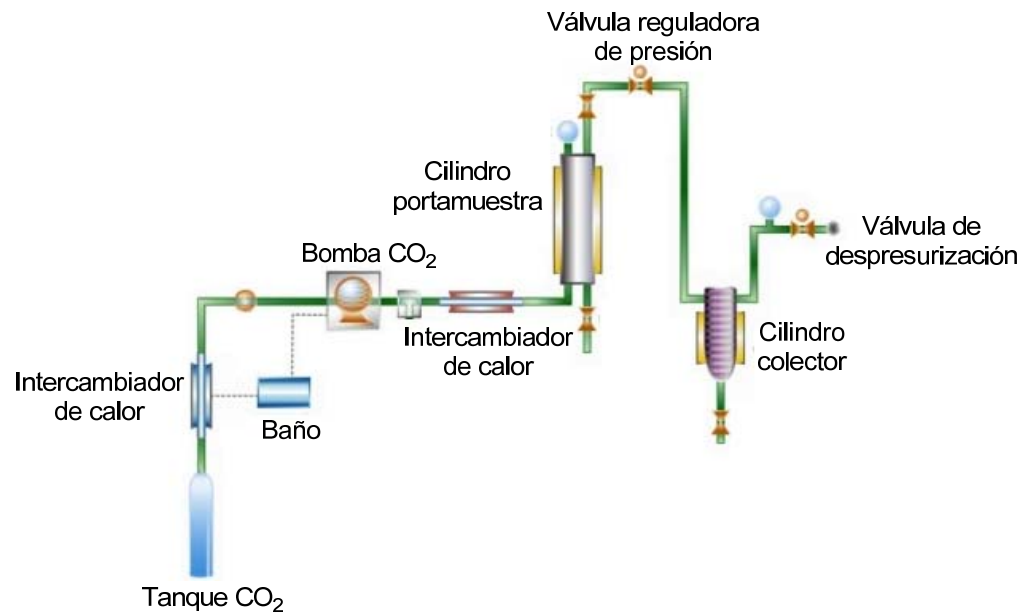


Figura 16. Diagrama del proceso de extracción del equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 (*Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.*).

3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA SFE

Con el fin de determinar las mejores condiciones de extracción con alto rendimiento del aceite de café, se aplicó un diseño experimental factorial 2^3 (**Figura 17**) teniendo en cuenta los resultados encontrados en las pruebas preliminares (**Numeral 2.6**).

Las variables consideradas en el planteamiento de diseño experimental fueron la presión, la temperatura y el grado de tuestión expresado como el valor de la luminosidad de las muestras de café (L^*), y como observable el rendimiento de extracción. El error experimental se determinó con base en la realización de tres experimentos en el punto medio de las variables estudiadas.

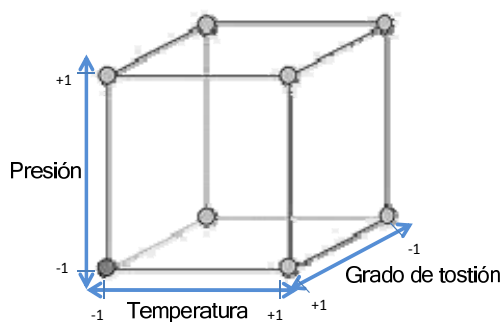


Figura 17. Diseño experimental factorial 2^3 .

En la **Tabla 3** se muestran los experimentos del diseño y los niveles de las variables.

Tabla 3. Diseño experimental factorial 2^3 .

| N° de Experimento | Presión, bar | Temperatura, °C | Grado de tostión, L* |
|-------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| 1 | 300 | 48 | 44.0 |
| 2 | 420 | 48 | 44.0 |
| 3 | 300 | 68 | 44.0 |
| 4 | 420 | 68 | 44.0 |
| 5 | 300 | 48 | 17.6 |
| 6 | 420 | 48 | 17.6 |
| 7 | 300 | 68 | 17.6 |
| 8 | 420 | 68 | 17.6 |
| 9* | 360 | 58 | 23.9 |
| 10* | 360 | 58 | 23.9 |
| 11* | 360 | 58 | 23.9 |

*Niveles de las variables empleados para determinar el error experimental del método.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y ENCAJE DE MODELOS POLINÓMICOS A LOS DATOS EXPERIMENTALES

El análisis estadístico de los resultados del diseño experimental se realizó en Excel, aplicando el análisis de varianza (ANOVA), el algoritmo de Yates y el contraste de coeficientes. La aplicación de los tres métodos permitió comparar los resultados obtenidos. Se usó la prueba de Fisher como parámetro para establecer con un nivel de confianza del 95% si las variables y sus posibles combinaciones poseen un efecto significativo en el rendimiento del aceite de café.

Para el encaje de los modelos polinómicos, a partir de los resultados obtenidos al aplicar el diseño experimental factorial 2^3 , se tomó como observable el rendimiento del aceite de café obtenido. En cada caso, se normalizaron los valores de las variables y el observable. Se plantearon en total cuatro modelos matemáticos que fueron resueltos por el método de matrices. Para determinar el modelo que se ajustó mejor a las variables evaluadas, se realizó la validación de los modelos polinómicos comparando los valores de R^2 ajustado y la raíz cuadrada media del error de calibración (RMSEC).

3.9 OBTENCIÓN DEL ACEITE DE CAFÉ POR SFE

Los extractos se obtuvieron a partir de los granos de café con diferente grado de tosti3n, por el método de extracci3n con fluido supercrítico CO₂. Las condiciones de extracci3n de las cuatro muestras de café se muestran en la **Tabla 4**. Las extracciones se realizaron por duplicado para cada muestra.

Tabla 4. Condiciones de extracci3n del aceite de café.

| Variable | Valor |
|--------------------------|--------------|
| Presi3n | 450 bar |
| Temperatura | 68 °C |
| Tiempo | 90 min |
| Flujo de CO ₂ | 40 g/min |

3.10 PREPARACI3N DE LAS MUESTRAS

3.10.1 Extracci3n de los metil ésteres de los ácidos grasos (FAME). Los extractos se derivatizaron seg3n las normas ISO 5508 (2 edici3n, 1990) e ISO 5509 (2 edici3n, 2000), (*Animal and Vegetable Fats and Oils–Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*), de la siguiente manera: aproximadamente 100 mg de los extractos de café se mezclaron con 5 mL del complejo de trifluoruro de boro al 20% en metanol; cada una de las mezclas se calentó a 80 °C durante 30 min con agitaci3n magnética. Reposadas las mezclas se procedió a realizar la extracci3n de los ésteres metílicos de los AG con 3 mL de isooctano y 30 mL de una soluci3n de cloruro de sodio al 30%. De la fase orgánica se tomaron 0.5 mL y se inyectaron 2 µL de la soluci3n al cromatógrafo de gases, para su respectivo análisis.

3.10.2 Dilución de los extractos SFE. Alícuotas de cada extracto SFE de café (20 µL) se disolvieron en diclorometano hasta un volumen final de 1 mL.

3.10.3. Sililación de los extractos de café. Para un mejor análisis por GC-MS de los extractos de café se realizó una derivatización de los compuestos presentes. 20 µL de muestra se mezclaron con 100 µL de piridina y 100 µL de agente derivatizante, bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA). La reacción se calentó a 80 °C por 30 min. Posteriormente se llevó a cabo una extracción líquido-líquido usando agua y diclorometano, repitiendo el lavado con agua para eliminar la piridina. La fase orgánica se concentró hasta 1 mL con una corriente de nitrógeno.

3.10.4 Extracción de la fracción insaponificable. Para liberar la fracción insaponificable de la matriz oleosa del extracto SFE se realizó una hidrólisis básica con una solución metanólica de hidróxido de potasio (0.5 M). Se saponificaron 300 mg de cada aceite de café con 0.5 mL de la solución durante 30 min a 80°C y agitación constante. Luego, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido usando 12 mL de agua *milliQ* y 10 mL de hexano. El lavado con hexano se repitió tres veces y finalmente la fase orgánica se concentró hasta 1 mL con una corriente de nitrógeno.

3.11 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.11.1 Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID). Para la determinación de los ésteres metílicos de los AG (**Numeral 3.10.1**) se empleó un cromatógrafo GC *Agilent Technologies 6890A Series I* (**Figura 18**), equipado con un inyector *split/splitless* (250°C, relación *Split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250°C). Se usó una columna capilar apolar, DB-23 de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f , con fase estacionaria de (50%-Cianopropil)-metilpolisiloxano. El gas de arrastre fue helio. Las velocidades de flujos de gases de combustión en el FID, *i.e.*, el aire y el hidrógeno, se mantuvieron a 300 y 30 mL/min, respectivamente; el gas auxiliar fue nitrógeno, a 30 mL/min.



Figura 18. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies 7890A*, con detector de ionización en llama FID.

3.11.2 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (GC-MS).

El análisis cualitativo de los extractos SFE de café y fracciones insaponificables descritos en las secciones **3.10.2**, **3.10.3** y **3.10.4**, se llevó a cabo en un equipo GC *Agilent Technologies 6890N Plus* (HP, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973* (**Figura 19**), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (1:30) e inyector automático *Agilent 7863*. Se usó una columna capilar de sílice fundida, DB-5MS de 60 m x 0.25 mm, D.I., recubierta con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 μm de grosor (d_f). El gas de arrastre fue helio (99.9995%, *Aga Fano*, S.A.), con una velocidad lineal de 35 cm s^{-1} . La temperatura del horno fue programada de 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C min^{-1} , luego, hasta 250°C (5 min) @ 5°C min^{-1} . Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV; las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 280°C. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4.75 scan s^{-1} , en el rango de masas m/z 40-600.



Figura 19. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies 6890N Plus*, con detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*.

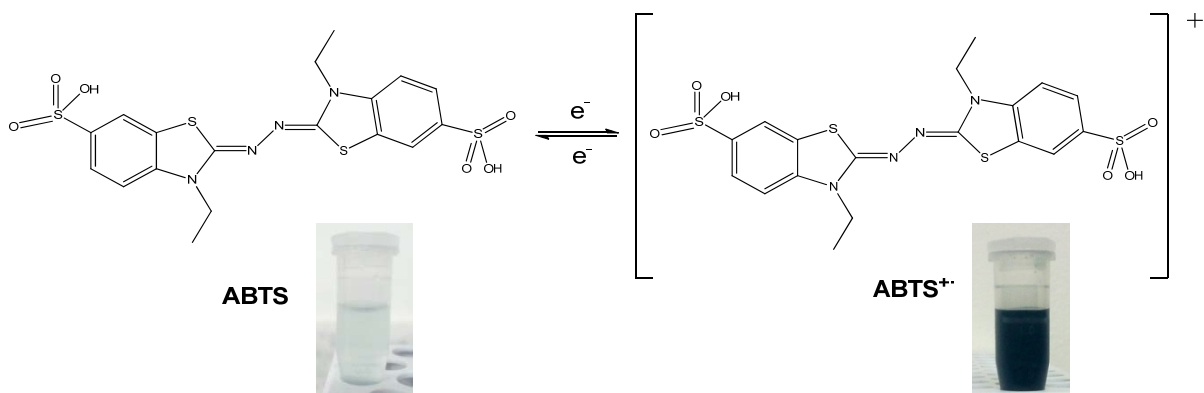
3.12 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los aceites de café, de las sustancias de referencia y las sustancias control (Trolox[®], ácido linoleico, cafeína, BHA, BHT, vitamina E y ácido caféico) se realizó con base en el procedimiento descrito por *Re et al.* (1999) [91] con algunas modificaciones efectuadas por *Ozgen et al.* (2006) [92]. Este método se basa en la disminución de la absorbancia del catión-radical ABTS^{•+} (color azul-verdoso) con la adición de sustancias posiblemente antioxidantes. Para el monitoreo de la absorbancia se utilizó espectroscopía VIS a 750 nm, en un lector de microplacas de 96 pozos (espectrofotómetro *Modulus™ II*, *microplate reader*), (**Figura 20**).



Figura 20. Espectrofotómetro *Modulus™ II*, *microplate reader*, 645 N. *Turner Biosystems*, North Mary Avenue, Sunnyvale, CA, EE.UU.

Se preparó una solución *stock* del catión-radical ABTS⁺, mezclando una solución del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) (7 mM) con persulfato de potasio (PDS) (2.45 mM) (**Esquema 1**).



Esquema 1. Generación del catión-radical ABTS⁺.

La mezcla se dejó reaccionar a oscuridad y temperatura de 4°C, durante 24 h; seguidamente se ajustó la absorbancia hasta 0.700 (± 0.02). La respuesta de las sustancias se evaluó como porcentaje de absorbancia del catión-radical ABTS⁺, calculándose de acuerdo con la **Ecuación 1**:

$$\text{Inhibición de Absorbancia}_{\lambda 730\text{nm}} (\%) = \left(1 - \frac{A_f}{A_0} \right) \times 100$$

Donde:

A₀: es la absorbancia del catión-radical ABTS⁺ sin inhibir (blanco);

A_f: es la absorbancia del catión-radical ABTS⁺ determinada después de la adición del posible antioxidante.

Se prepararon soluciones de las sustancias a evaluar tales que la adición de 10 µL de éstas a 200 µL de solución de ABTS⁺, resultara en una inhibición entre el 20 – 80 %. Se determinó la capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] (TEAC – mmol de Trolox[®]/mmol de sustancia) y la actividad antioxidante total (TAA – mmol de Trolox[®]/kg de extracto SFE). Para ello se utilizó la relación entre las concentraciones inhibitorias al 50% (IC₅₀) de Trolox[®] [93]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para las sustancias de referencia y control, y duplicado para los extractos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 TOSTIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ

Las muestras de cada tipo de café fueron divididas en 3 lotes debido a que la capacidad de la máquina tostadora es de 3 kg, y su cantidad difiere entre sí, como consecuencia de la pérdida de peso que sufren los granos durante la tostión, por la evaporación de agua y compuestos orgánicos volátiles, tales como ácido acético [6] (**Tabla 5**).

Tabla 5. Temperatura de los granos de café durante la tostión.

| Tipo de café | Cantidad, kg | Temp. inicial, °C | Temp. final, °C | Tiempo, min |
|--------------|--------------|-------------------|-----------------|-------------|
| Semitostado | 2.33 | 213 | 164 | 10 |
| Catación | 1.43 | 215 | 185 | 11.12 |
| Consumo | 2.83 | 211 | 185 | 20.88 |

Durante la tostión de los granos el café se genera pérdida de peso, reducción de la densidad y cambio de color, siendo este último, el parámetro más usado para describir el nivel de tostión [22], y el empleado en este caso. La curva de temperatura de los granos de café durante el proceso se muestra en la **Figura 21**.

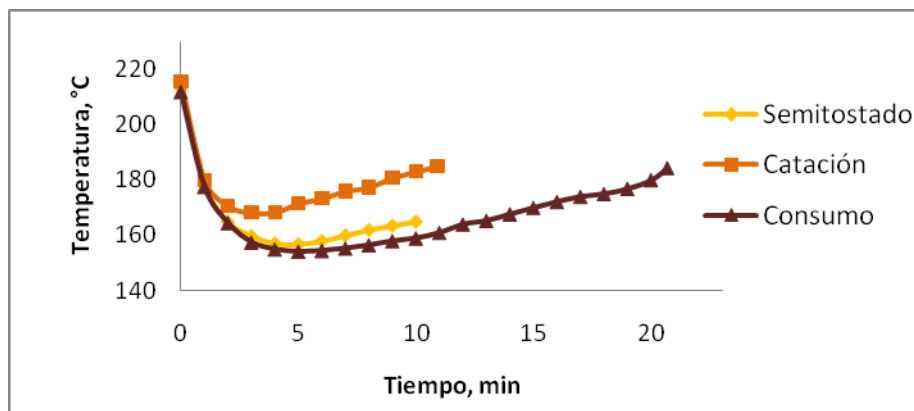


Figura 21. Curva de temperatura de los granos de café durante la tostión.

4.2 MEDICIÓN DEL COLOR DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ

El valor de la luminosidad (L^*) de los granos de café fue el único parámetro medido de la escala *CIELab*, ya que, generalmente, la coloración de los granos de café está determinada por el valor de su luminosidad. Solo al café verde se le miden los tres parámetros (a^* , b^* y L^*). La coloración de las cuatro muestras se indica en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Coloración de las muestras de café.

| Café | Tipo | L^* |
|---|-------------|-------|
|  | Verde | 68.0 |
|  | Semitostado | 44.0 |
|  | Catación | 23.9 |
|  | Consumo | 17.6 |

4.3 MOLIENDA DEL CAFÉ

Las muestras se dividieron, para ser molidas, como consecuencia de que los granos de café, tipo verde, y de café, tipo semitostado, son muy duros y rígidos, lo que impide su molienda en un equipo normal. El tamaño de partícula de las muestras de café, tipo consumo y tipo catación, fue de 500-700 μm , y las de café, tipo semitostado y tipo verde fue de 500-850 μm .

4.4 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE CAFÉ POR SFE

Los resultados del diseño experimental factorial 2^3 se encuentran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados del diseño experimental factorial 2^3 .

| N° de Experimento | Presión, bar | Temperatura, °C | Grado de tostión, L* | Rendimiento, % |
|-------------------|--------------|-----------------|----------------------|----------------|
| 1 | 300 | 48 | 44.0 | 1.04 |
| 2 | 420 | 48 | 44.0 | 1.70 |
| 3 | 300 | 68 | 44.0 | 1.18 |
| 4 | 420 | 68 | 44.0 | 2.80 |
| 5 | 300 | 48 | 17.6 | 2.40 |
| 6 | 420 | 48 | 17.6 | 4.11 |
| 7 | 300 | 68 | 17.6 | 1.62 |
| 8 | 420 | 68 | 17.6 | 4.79 |
| 9 | 360 | 58 | 23.9 | 2.30 |
| 10 | 360 | 58 | 23.9 | 2.32 |
| 11 | 360 | 58 | 23.9 | 2.43 |

El ANOVA, aplicado al diseño experimental realizado, evidenció que los factores y sus posibles combinaciones binarias son significativos y que, por ende, poseen alta influencia sobre el rendimiento del aceite de café obtenido por SFE-CO₂ (**Tabla 8**).

El valor crítico del parámetro F para 1 y 2 grados de libertad, con una probabilidad del 95 %, es de 18.513. El error experimental calculado a partir de las réplicas en el centro del cubo es de 0.00466.

Tabla 8. Resultados ANOVA del diseño experimental 2^3 .

| Efecto | Valor | Suma de cuadrados | F |
|--------|--------|-------------------|---------|
| p | 1.787 | 6.3867380 | 1369.66 |
| t | 0.286 | 0.1630205 | 34.96 |
| g | 1.548 | 4.7926080 | 1027.79 |
| pt | 0.606 | 0.7344720 | 157.51 |
| pg | 0.654 | 0.8554320 | 183.45 |
| tg | -0.336 | 0.2251205 | 48.28 |
| ptg | 0.125 | 0.0310005 | 6.65 |

p: Presión, t: Temperatura, g: Grado tostión.

Como se aprecia en la **Tabla 8**, la presión y el grado de tostación son las condiciones que más influyen en el rendimiento del extracto, de manera que el modelo polinómico, que se ajusta a los datos experimentales, está definido principalmente por estos dos factores.

En la **Tabla 9** se presentan las ecuaciones evaluadas para validar el proceso de extracción por SFE, los valores del R² estadístico ajustado y el RMSEC.

Tabla 9. Modelos polinómicos obtenidos para optimización.

| N° | Ecuación | R ² ajustado | RMSEC |
|----|--|-------------------------|-------|
| 1 | $Y = b_0 + b_1A + b_2C + b_3AB + b_4 AC + b_5BC$ | 0.79 | 0.61 |
| 2 | $Y = b_0 + b_1A + b_2C + b_3AB + b_4AC$ | 0.88 | 0.47 |
| 3 | $Y = b_0 + b_1A + b_2C + b_3AC$ | 0.91 | 0.40 |
| 4 | $Y = b_0 + b_1A + b_2C + b_3AC + b_4A^2$ | 0.98 | 0.35 |

A: Presión (bar), B: Temperatura (°C) y C: Grado de tostión (L*).

El modelo 4 es el que se ajusta mejor a los datos experimentales. En la **Tabla 10** se observan los coeficientes de la ecuación de regresión del modelo.

Tabla 10. Coeficientes de la ecuación del modelo ajustado.

| Variable | Coeficiente |
|----------------------------|-------------|
| A: presión, bar | 1.046 |
| C: grado de tostión, L* | -0.500 |
| AC | -0.238 |
| AA | 0.326 |
| B ₀ , constante | 2.163 |

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es:

$$y = 2.459 + 1.046A - 0.500C - 0.238AC + 0.326 A^2$$

Con base en los resultados del diseño experimental, las condiciones bajo las cuales se obtiene el mayor rendimiento de aceite de café, se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de extracción por SFE-CO₂ del aceite de café.

| Variables | Especificaciones |
|------------------|-------------------------|
| Presión | 450 bar |
| Grado tostión | 16.98 (L*) |

Con el fin de evaluar las diferencias en la capacidad antioxidante y en la composición de cuatro muestras de café según el nivel de tostión, se utilizó la condición de presión de 450 bar para la extracción de aceite de café, tipo verde, tipo semitostado, tipo catación y tipo consumo.

4.5 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE CAFÉ OBTENIDOS POR SFE

Los extractos (aceites) se obtuvieron por SFE bajo las condiciones descritas en el **Numeral 3.9 (Figura 22)**. El rendimiento de extracción de los aceites de café se cálculo con base en el peso de café molido. Para poder efectuar una extracción homogénea de todas las muestras, se estableció que la altura de éstas en el cilindro portamuestra fuera la misma. Para ello, fue necesario emplear diferentes cantidades de éstas, ya que el café durante el proceso de tostión pierde peso, pero aumenta de volumen [25]. Los resultados obtenidos comparados con los encontrados en el diseño experimental, indican que a pesar de que se observa un aumento, éste no fue tan alto como se esperaba (**Tabla 12**).

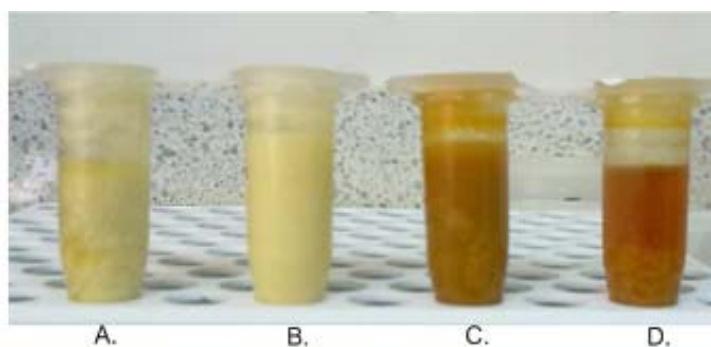


Figura 22. Extracto de: A. Café tipo verde, B. Café tipo semitostado, C. Café tipo catación y D. café tipo consumo.

Tabla 12. Rendimiento de los extractos obtenidos por SFE. Flujo de CO₂ de 40 g/min.

| Tipo de café | Peso café, g | Rendimiento, % |
|--------------|--------------|----------------|
| Verde | 1200 | 4.6 ± 0.31 |
| Semitostado | 1200 | 4.8 ± 0.32 |
| Catación | 700 | 5.3 ± 0.28 |
| Consumo | 700 | 6.2 ± 0.43 |

La **Figura 23** muestra la variación del rendimiento de extracto con el grado de tuestión del café; la mayor cantidad de aceite se obtuvo con el café, tipo consumo, con un rendimiento del 6.2 %.

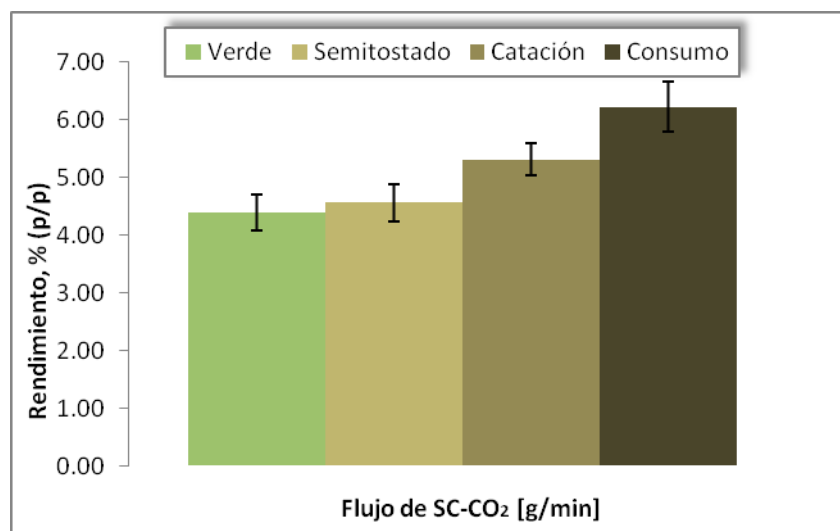


Figura 23. Variación del rendimiento del aceite de café con el grado de tuestión. Flujo de CO₂ de 40 g/min.

A mayor nivel de tuestión, el rendimiento de extracto de café es más alto. Esto puede ser explicado por la estructura física de los granos de café [95]. Tres de las muestras fueron sometidas a diferentes procesos de tuestión, pudiendo generar influencia en la cantidad de extracto obtenido; durante la tuestión se disminuye la densidad del grano y se incrementa su volumen, aumentando, a su vez, el volumen de los microporos del grano. Los cambios en la microestructura de la matriz de celulosa junto con el aumento de la porosidad [22, 96,97] permitirán una mayor difusión del SC-CO₂, y por ende, una mayor transferencia de

masa que se reflejará en la obtención de mayor cantidad de extracto. El tamaño de partícula también es un parámetro determinante en los procesos de extracción con SC-CO₂ [98]. Un menor tamaño de partícula reduce la distancia de difusión del disolvente; si las partículas son demasiado pequeñas, pueden dar problemas de canalización en el interior del cilindro de extracción [94]. Sin embargo, el tamaño de partícula de las muestras, a pesar de no ser exactamente el mismo, sí se encuentra en un mismo rango (500-850 µm), pudiendo así, considerar que el tamaño no posee un efecto determinante en el proceso de extracción. Los tamaños utilizados se consideraron según el rango de regla general (250-2000 µm) [94].

La presencia de agua en el material tiene un papel fundamental en la cinética de transferencia de masa durante la extracción. La humedad del café es una variable que pudo tener influencia en los rendimientos obtenidos. En algunos casos, la humedad de la matriz determina la estructura de la superficie o la actividad de los componentes presentes en ésta; la humedad alta creará una barrera acuosa que inhibirá la difusión del CO₂ supercrítico dentro de la matriz y la difusión del aceite fuera de la misma [99]. Durante la tostación, el grano de café pierde humedad, de manera que existe una relación inversamente proporcional entre la humedad del grano y la cantidad de aceite obtenido, siendo mayor para el café, tipo consumo, y menor para el café verde.

4.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE CAFÉ

4.6.1 Estudio del perfil de ácidos grasos de los aceites de café mediante GC-FID.

El análisis de los AG presentes en las muestras del aceite de café se realizó mediante la obtención de sus ésteres metílicos. La composición de AG de los extractos de café con diferente nivel de tuestión no fue muy variable. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Alves *et al.* (2003) [100], quienes establecieron, que durante la tuestión del café solo ocurren pequeños cambios en la composición de sus ácidos grasos (**Tabla 13**).

Tabla 13. Perfil de ácidos grasos en diferentes muestras de aceite de café.

| AG | Cantidad relativa, % | | | |
|----------------|----------------------|-------------|----------|---------|
| | Verde | Semitostado | Catación | Consumo |
| Mirístico | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| Pentadecanoico | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| Palmítico | 35.50 | 35.58 | 35.55 | 35.38 |
| Palmitoleico | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| Heptadecanoico | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.11 |
| Estearico | 6.82 | 7.47 | 7.27 | 6.85 |
| Oleico | 7.29 | 7.49 | 7.73 | 7.47 |
| Linoleico | 43.97 | 43.02 | 43.11 | 44.18 |
| Linolénico | 1.45 | 1.42 | 1.33 | 1.41 |
| Araquídico | 2.62 | 3.22 | 2.71 | 2.49 |
| Eicosenoico | 0.33 | 0.39 | 0.36 | 0.33 |
| Eicosadienoico | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.05 |
| Heneicosanoico | 0.06 | 0.08 | 0.07 | 0.06 |
| Behénico | 0.68 | 0.65 | 0.62 | 0.55 |
| Tricosanoico | 0.09 | 0.10 | 0.10 | 0.12 |
| Lignocérico | 0.25 | 0.32 | 0.25 | 0.26 |

Los ácidos linoleico y palmítico se encuentran en mayor proporción, seguidos de los ácidos oleico y esteárico, respectivamente. Teniendo en cuenta la importancia de estos AG para el consumo humano, especialmente, de los ácidos linoleico y linolénico pertenecientes a la familia $\omega 6$, se puede considerar su uso en la industria alimenticia. Estos ácidos tienen un papel importante en la modulación y la prevención de las enfermedades del corazón y la inhibición del cáncer a través del sistema inmunológico [101,102].

4.6.2 Estudio de la composición de los aceites de café mediante GC-MS. Los extractos se obtuvieron como se describe en el **Numeral 2.9**. Para el reconocimiento tentativo de los compuestos presentes en el extracto SFE de café, la mezcla se separó en columna cromatográfica en sus componentes principales, obteniéndose las corrientes iónicas totales (TIC) para cada uno de los aceites. Ya que la etapa de preparación de la muestra es crucial en el análisis composicional, se realizaron variaciones de ésta (**Numeral 3.10**), con el propósito de mejorar la separación y la detección de los principales compuestos presentes en los extractos. En la **Figura 24** se aprecian los

perfiles cromatográficos del aceite de café, tipo consumo, según la preparación de la muestra empleada.

En la inyección directa de la solución del aceite en disolvente (**Figura 24, A**), se observa asimetría de algunos picos y un aumento de la línea base del cromatograma. Tales problemas pueden ser solucionados mediante la derivatización del aceite, que genera compuestos más volátiles y más fácilmente detectables, en este caso, se derivatizó con bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), generando los trimetilsilílicos (TMS) derivados correspondientes. En general, se observa una mejoría en la resolución y eficiencia de los picos al realizar dicho proceso (**Figura 24, B**).

La saponificación del aceite permite liberar su fracción no saponificable. Al disminuir la cantidad de posibles compuestos a separar, se observa una variación en la diferenciación de picos en el cromatograma (**Figura 24, C**), y la aparición de varios picos con el área cromatográfica pequeña. El proceso de saponificación puede ayudar para diferenciar ciertos compuestos, ya que disminuye las interferencias. Sin embargo, debido a que el porcentaje de recuperación de los compuestos es bajo, luego de realizar la saponificación, extracción y posterior derivatización, es difícil hacer una identificación tentativa correcta de los diferentes compuestos; se presenta además la superposición de los picos.

Se realizó un análisis tentativo de los compuestos presentes en concentraciones mayores de 0.1%, tomando como criterio la comparación de sus espectros de masas (EI, 70 eV); para algunos compuestos. Para ello se usó el programa del sistema de datos *MSChemStation* (Versión D.02.00.275). Con las bases de datos ADAMS, Wiley138K y NIST 2002. Algunos espectros se compararon con los reportados en la literatura [39-52, 103]. Se propusieron posibles rutas de fragmentación para cada uno.

Durante las extracciones del aceite de café verde y de los aceites de café tostado (semitostado, catación y consumo), se obtuvieron compuestos como la cafeína y AG (**Numeral 4.6.1**), y se propone la posiblemente presencia de los diterpenos kahweol y cafestol, además de productos de su degradación. El reconocimiento tentativo de los picos registrados en cantidad relativa mayor de 0.1% se reporta en la **Tabla 14**. En la

Figuras 25-28 aparecen los cromatogramas de los extractos SFE; los picos no numerados corresponden a ácidos grasos (AG).

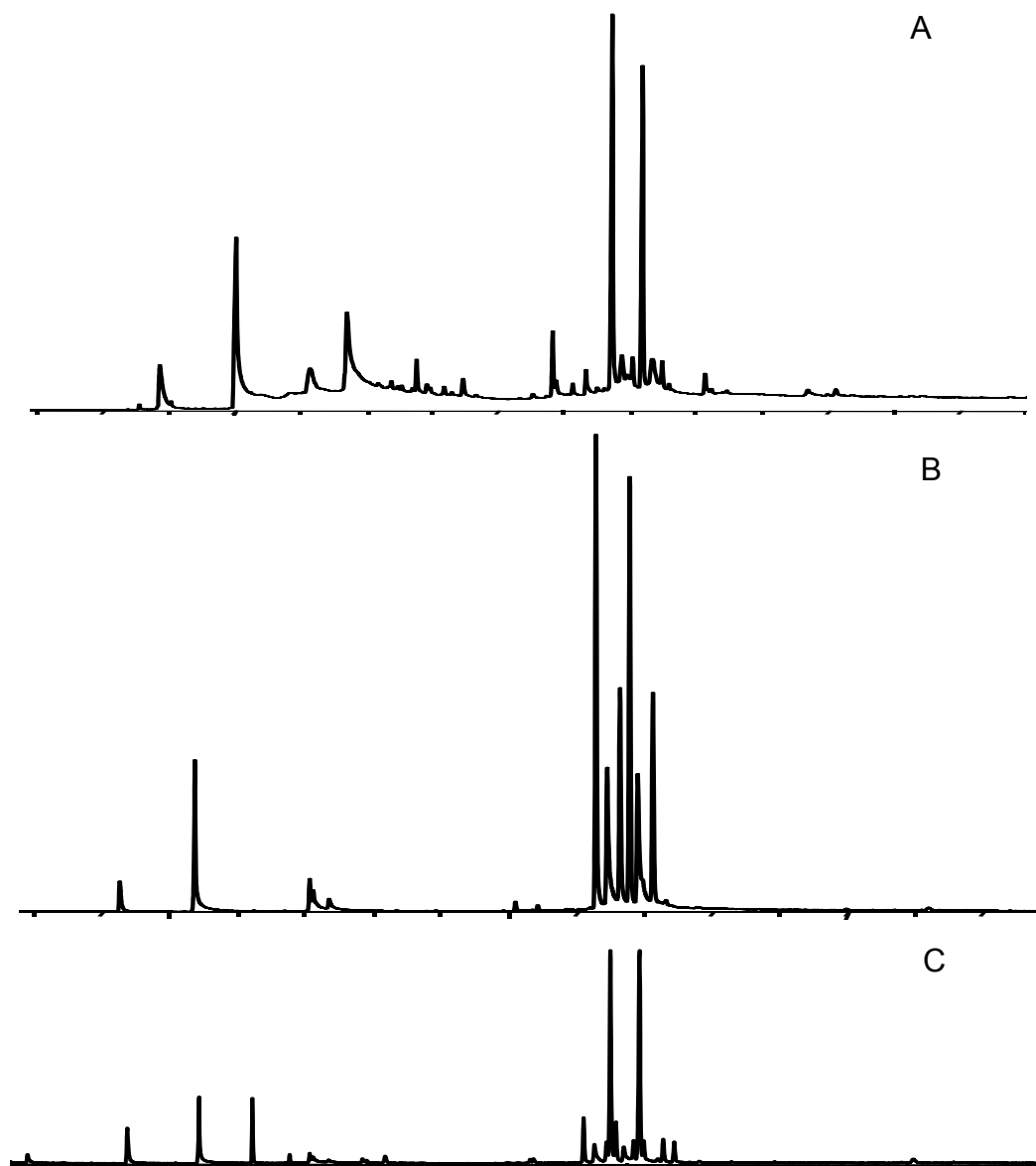


Figura 24. Cromatograma (corriente iónica total) de extractos SFE de café, tipo consumo, analizado por GC-MS. **A.** Aceite de café diluido en diclorometano; **B.** Derivados TMS de compuestos presentes en el aceite; **C.** Derivados TMS de compuestos en la fracción no saponificable.

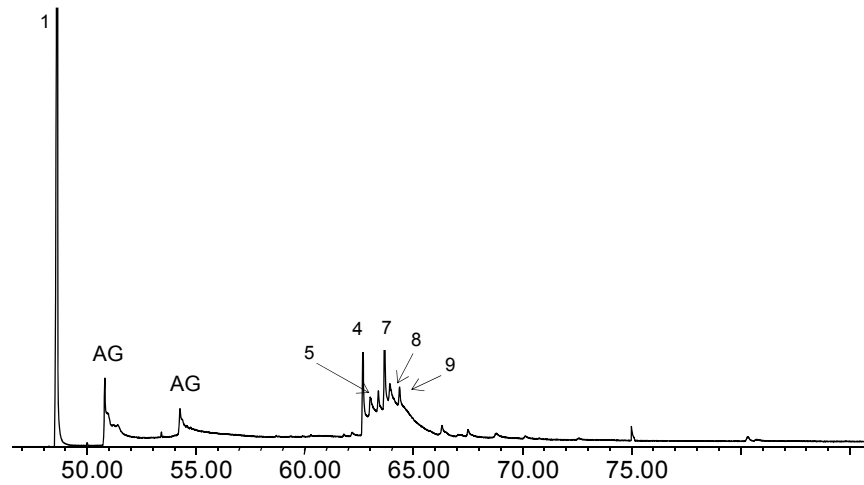


Figura 25. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo verde. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 14**.

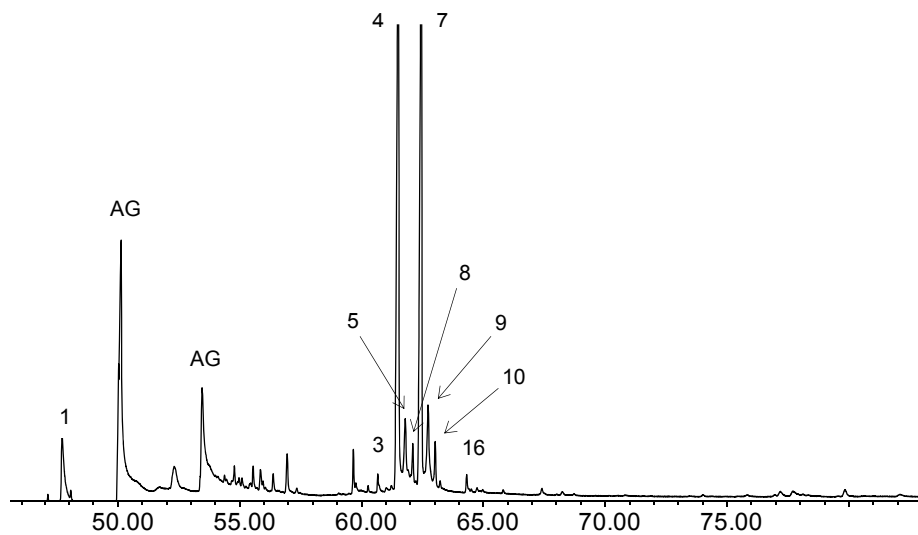


Figura 26. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo semitostado. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 14**.

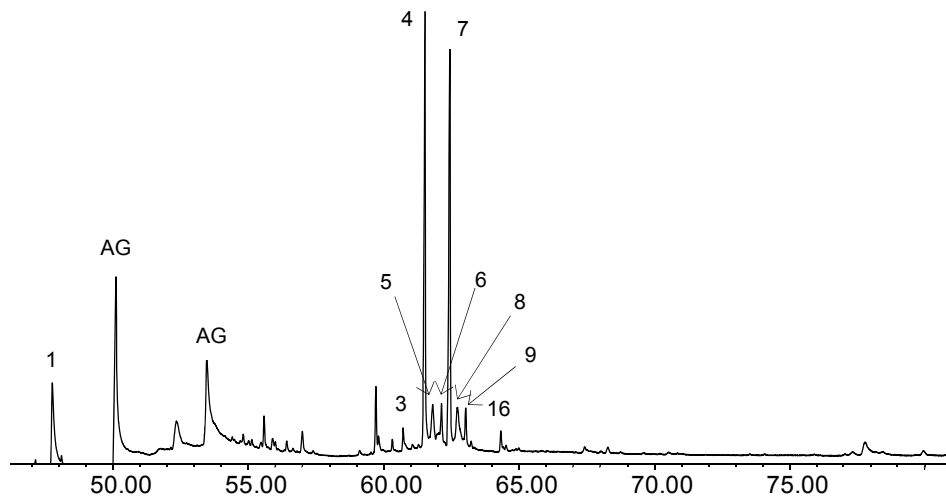


Figura 27. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo catación. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 14**.

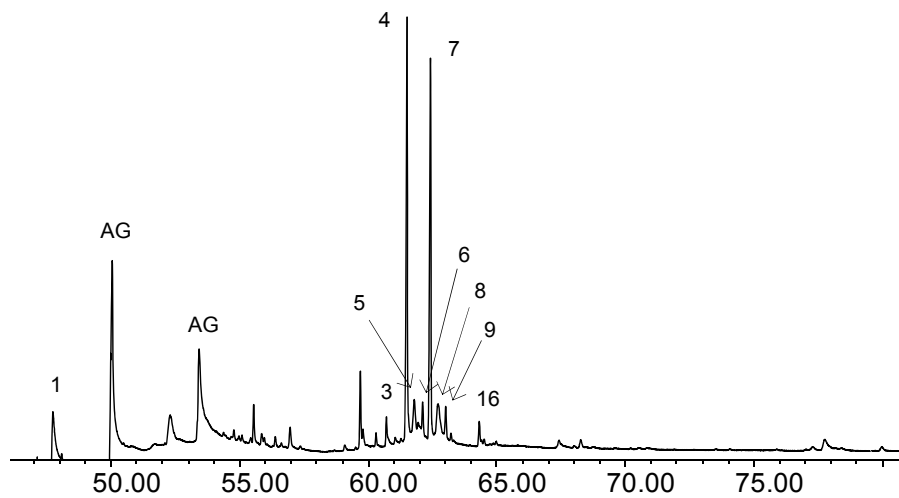


Figura 28. Cromatograma típico del extracto SFE (450 bar, 68 °C) de café, tipo consumo. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 14**.

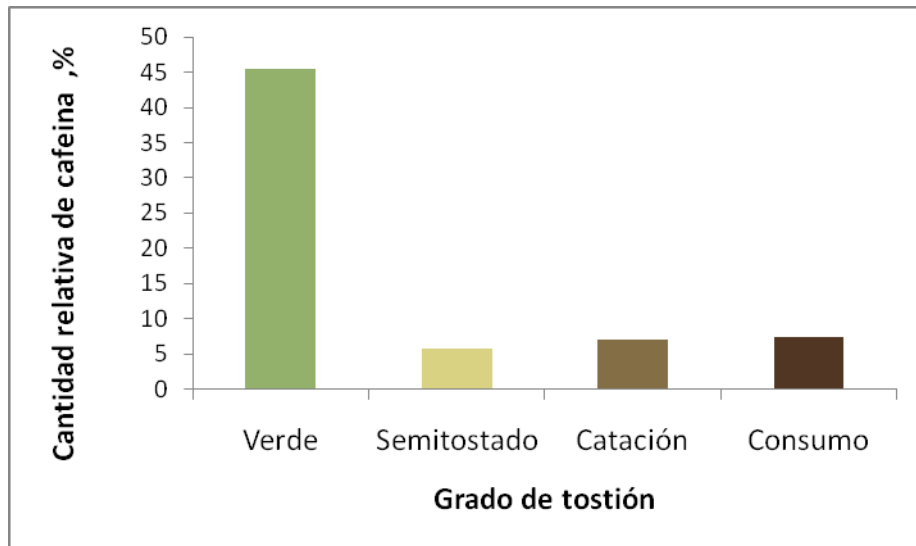


Figura 29. Variación de la cantidad relativa, (%) de la cafeína en los aceites de café, con diferentes grados de tuestión, extraídos con SC-CO₂.

La cantidad de la cafeína extraída es mucho más alta en el café verde que en los extractos de café que fue tostado (**Figura 29**). Este incremento posiblemente se debe a que durante la extracción con SC-CO₂ el agua, presente en los granos de café, puede actuar como “co-solvente”, incrementando así la extracción de ciertos componentes, como la cafeína, en una matriz con alta humedad como lo es el café verde [104]. Peker y colaboradores mostraron un incremento en la cantidad de cafeína extraída en granos de café con mayor proporción de agua [105-105]; en el caso de los cafés tostados (semitostado, catación y consumo), se aprecia un aumento en la cafeína extraída con la tuestión, es decir, cuando hay menos humedad en el grano, pero esta variación probablemente se deba al mayor tamaño de poro que permitirá un mayor rendimiento, (penetración del fluido), y, por ende, una mayor cantidad de cafeína extraída.

En la **Figura 30**, se presenta el espectro de masas propuesto para el dehidrocafestol. Las posibles rutas de ionización disociativa, por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 2**.

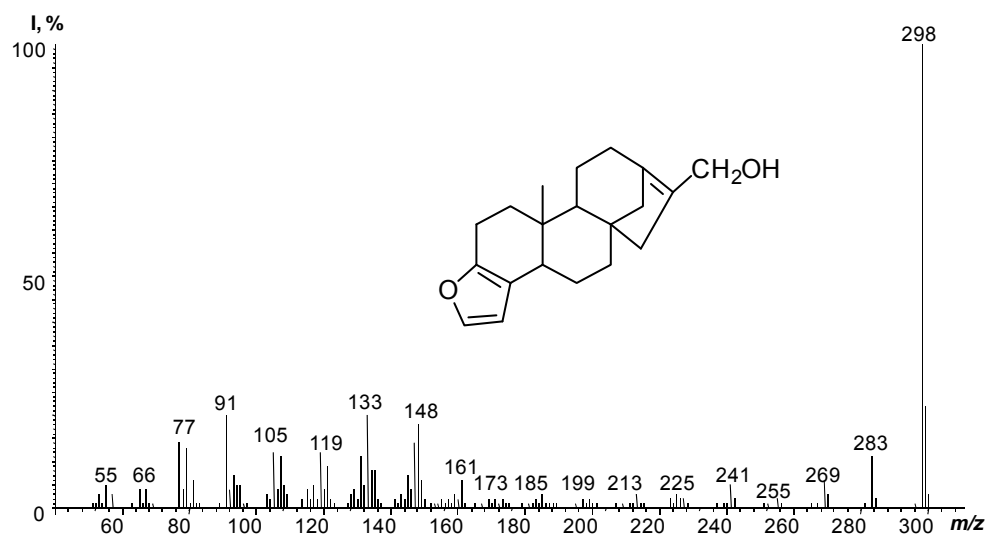
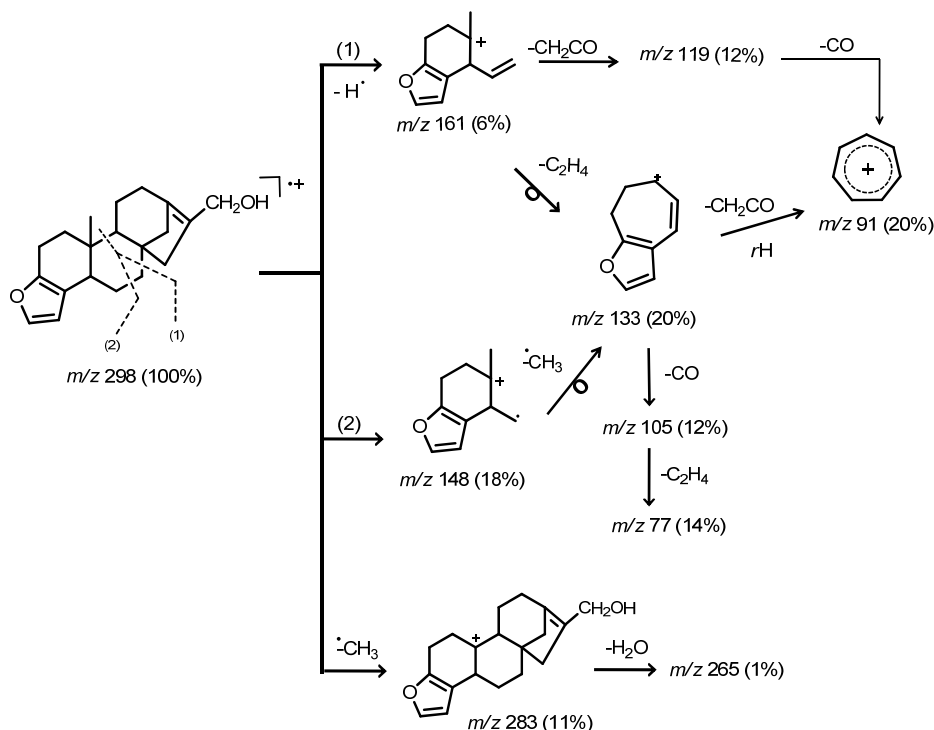


Figura 30. Espectro de masas del dehidrocafestol. EI, 70 eV.

El ion molecular, M^+ , que aparece en m/z 298 (100%), siendo, a su vez, el ion pico de base, sufriría la pérdida de CH_3^* para formar el ion en m/z 283 (11%). Posteriormente, con la salida de una molécula de agua se genera el ion $(M-CH_3-H_2O)^+$, en m/z 265 (1%). La fragmentación del anillo podría darse mediante las rupturas **1** y **2**; la primera, generaría el ion en m/z 148 (18%), este fragmento, por eliminación de un radical alquílico (CH_3^*) y reordenamiento molecular producirá el ion-fragmento en m/z 133 (20%), que por pérdida de CO y C_2H_2 , eliminaciones que suelen ser muy comunes en compuestos con núcleos aromáticos, originaría los iones en m/z 105 (12%) y m/z 107 (12%), respectivamente. Además, estos dos, por pérdida sucesiva de moléculas de C_2H_4 generarían los fragmentos en m/z 77 (14%) y m/z 79 (13%), típicos de anillos aromáticos.

En la **Figura 31** se presenta el espectro de masas que correspondería al dehidrokahweol. Las rutas de ionización disociativa, por impacto de electrones a 70 eV propuestos, se observan en el **Esquema 3**. El ion molecular, M^+ , en m/z 296 (38%), presentaría la pérdida de un radical alquílico CH_3^* , con formación de un catión $(M-CH_3)^+$ en m/z 281 (5%); a partir de éste, por eliminación de una molécula de agua, se obtiene el ion en m/z 263 (5%).

Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación para el dehidrocafestol.



La ruptura **1** del anillo kaurénico conduce a la formación del ion m/z 146 (57%), que, por pérdida del CH_3^\bullet o mediante la ruptura **2**, elimina un hidrógeno a través del reordenamiento molecular, así surge el ion pico de base en m/z 131 (100%); éste generaría por la salida de CO del ion en m/z 103 (3%). Así mismo, la eliminación consecutiva de grupos C_2H_2 y C_2H_4 conduce a los iones en m/z 105 (56%) y m/z 77 (10%). El ion-fragmento m/z 131 decae generando a C_7H_7^+ (m/z 91), con una intensidad de un 20%. La ruptura **1** del anillo, como lo reportan y proponen Lecker *et al.* (1995) [44], proporcionaría origen del ion en m/z 145 (56%), que, junto con los iones en m/z 146 y m/z 131, confirmarían la presencia del doble enlace en los carbonos C1-C2, característico del kahweol y sus análogos.

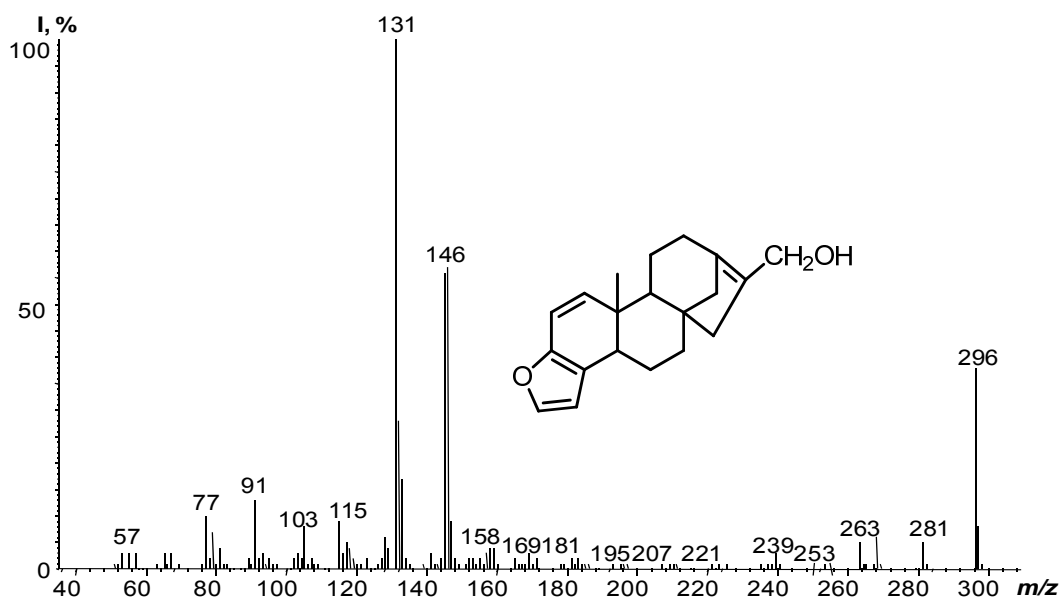


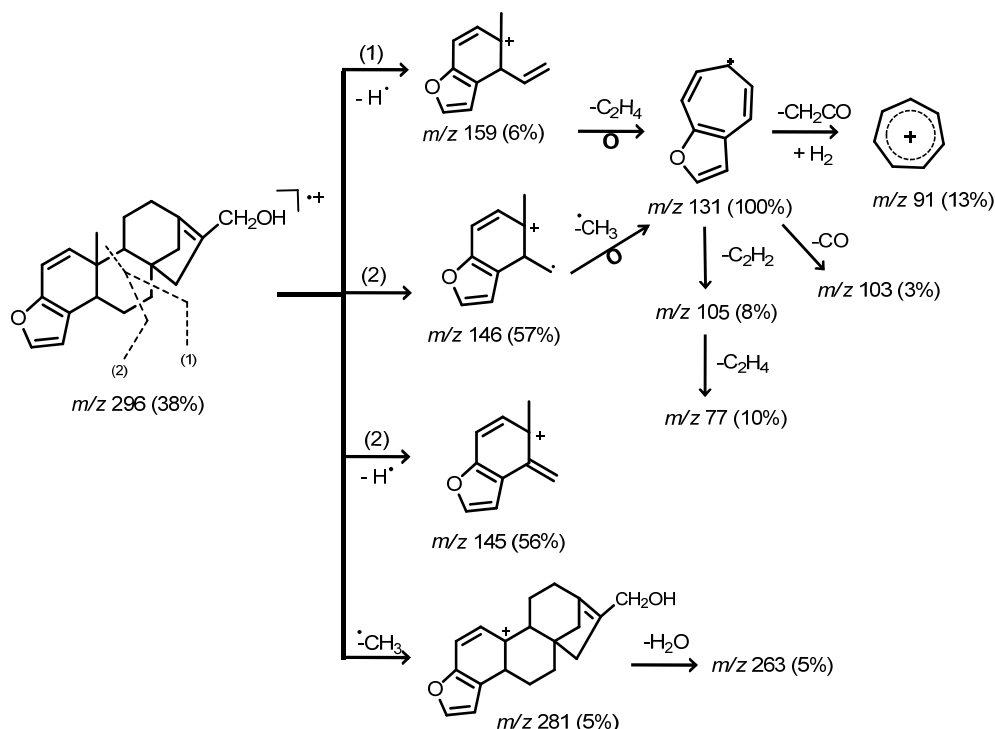
Figura 31. Espectro de masas del dehidrokahweol. EI, 70 eV.

Existen dos opciones en cuanto a la ubicación de doble enlace propio del dehidrocafestol y dehidrokahweol; una, entre los carbonos C15-C16, y otra, entre los carbonos C13-C16 (**Figura 32**). Dado que la formación de un carbono terciario (C13) implica mayor estabilidad del estado de transición, el doble enlace se formaría preferiblemente entre C13-C16, y en menor proporción el doble enlace estaría entre C15-C16, ya que C15 es un carbono secundario. Según esto, los picos corresponderían a mezclas de 13,16-dehidrocafestol, 15,16-dehidrocafestol, 13,16-dehidrokahweol y 15,16-dehidrokahweol; estos compuestos tendrían las mismas pérdidas e iones característicos, así como rutas de ionización disociativa, por lo que mediante la metodología usada no sería posible distinguir estos isómeros.

Es necesario tener en cuenta que estos diterpenos, en su forma libre, ocurren en pequeña proporción en el café y que, por ello, su determinación requiere un método de limpieza (*clean-up*), concentración y análisis diferente al utilizado en este trabajo [41]; por lo que es de suponer que los compuestos presentes en los extractos estarían en su mayoría esterificados con ácidos grasos (**Figura 33**), preferiblemente, aquellos que se

encontrasen en una mayor cantidad en el extracto, en este caso, probablemente con ácido linoleico o palmítico (**Numeral 4.6.1**).

Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación para el dehidrokahweol.



A pesar de ello, los espectros de masas (e.g., **Figura 30 y 31**) mostrarían diterpenos no esterificados, siendo así, probable que se hubiera presentado la fragmentación del AG que se encontraría unido a uno de los oxígenos de los diterpenos, o por otro lado, la fácil deshidratación de estos posibles alcoholes diterpénicos; es por ello, que los iones de mayor masa molecular registrados serían los iones-fragmentos $(M-H_2O)^{+\bullet}$ o iones-fragmento resultantes de la salida del AG y de agua. En general, se podría afirmar también que, posiblemente, los iones moleculares de algunos de los compuestos presentes podrían poseer una alta labilidad, un tiempo de vida muy corto ($<10^{-6}$ s) o sus características estructurales no les permitirían una deslocalización adecuada de la carga, de modo que no serían registrados en el espectro de masas (EI, 70 eV). La ionización química sería la técnica que podría aclarar esta duda.

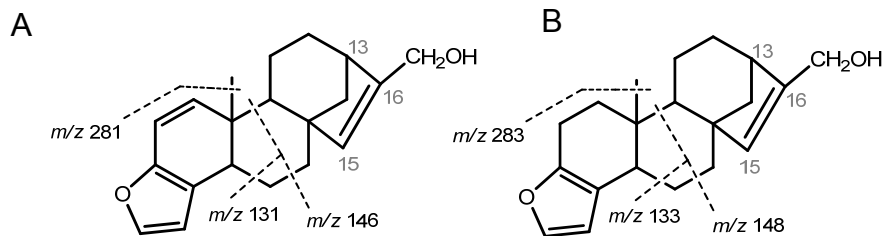


Figura 32. Estructura molecular y algunos iones principales del **A.** 15,16-Dehidrokahweol; **B.** 15,16-Dehidrocafestol.

No obstante, Speer *et al.* (2006) [29], proponen que en el análisis por GC-MS la temperatura de inyección, que en nuestro caso fue 250 °C, puede ocasionar degradación de los diterpenos; los autores explican así la variación de sus resultados con respecto a los de Guerrero *et al.* (2004) [103]. La descomposición térmica no generaría probablemente la formación del ion molecular de los alcoholes. Asimismo, Kölling-Speer *et al.* [107] exponen, que las condiciones de análisis por GC en la fracción insaponificable del café verde sin sililar, pueden favorecer la degradación de los diterpenos presentes, lo que ocasionará la aparición de productos que únicamente se encuentran en cafés tostados, es decir, compuestos que se generan en el proceso de tostión.

En los cuatro tipos de extractos, se observa que los espectros de masas de ciertos compuestos son casi idénticos (formación de los mismos iones-fragmentos) pero se notan diferencias cuantitativas de las señales de los iones característicos. Ésta variación de las intensidades podría deberse a pequeños cambios estructurales e isomerías de posición, geométrica o estereoisomería. A saber: los compuestos 4, 5, 6 (dehidrokahweol) y 7, 8, 9 (dehidrocafestol) presentan diferentes tiempos de retención y variación en su cantidad relativa, siendo esta última mayor las de los compuestos 4 y 7 (**Tabla 14**), cuyos espectros de masas se ilustran en las **Figuras 30 y 31**.

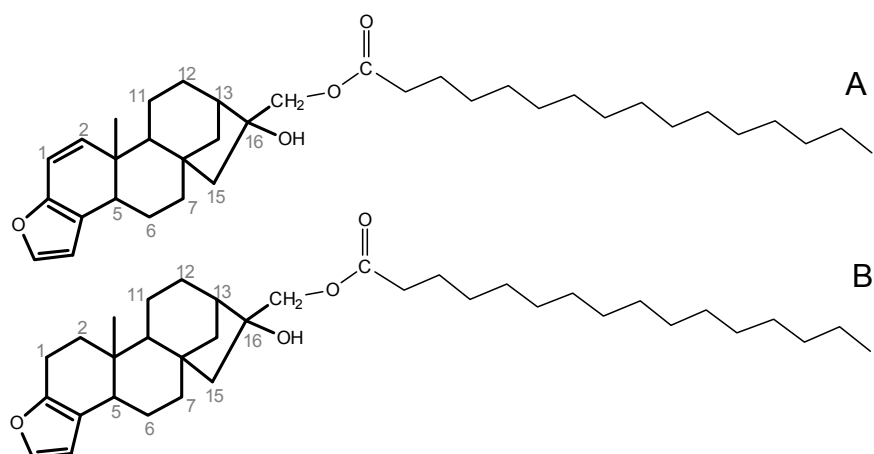


Figura 33. Estructura de **A.** Palmitato de kahweol; **B.** Palmitato de cafestol.

Con el fin de conocer si existe esterificación en los compuestos, se recurrió a la formación de los TMS derivados de los posibles diterpenos presentes en los aceites. En el caso de que haya presente un grupo OH libre; el reemplazo de su hidrógeno, generará un compuesto de la forma $R-O-[Si(CH_3)_3]^+$, que se reconoce por la pérdida característica de 73 uma.

En la **Figura 34** aparece un cromatograma típico del aceite de café tipo catación sililado. Como ya se mencionó anteriormente, los compuestos 4, 5, 6 (dehidrokahweol) y 7, 8, 9 (dehidrocafestol) presentan entre sí espectros de masas bastante similares, y no se presentan cambios considerables en comparación con los espectros de masas de los compuestos obtenidos en el análisis del aceite únicamente diluido. Esto permite presumir que los compuestos no contendrían grupos funcionales con hidrógenos activos libres que pudieran ser reemplazados por el grupo silil. A modo de ejemplo, en la **Figura 35** se muestran los espectros de masas de los compuestos 4 y 7; iones en *i.e.* m/z 131, m/z 146, m/z 281 y m/z 296 serían característicos para el dehidrokahweol, *i.e.* m/z 133, m/z 148, m/z 283 y m/z 298 para el dehidrocafestol, demostrando la gran similitud con los espectros de las **Figuras 30** y **31**.

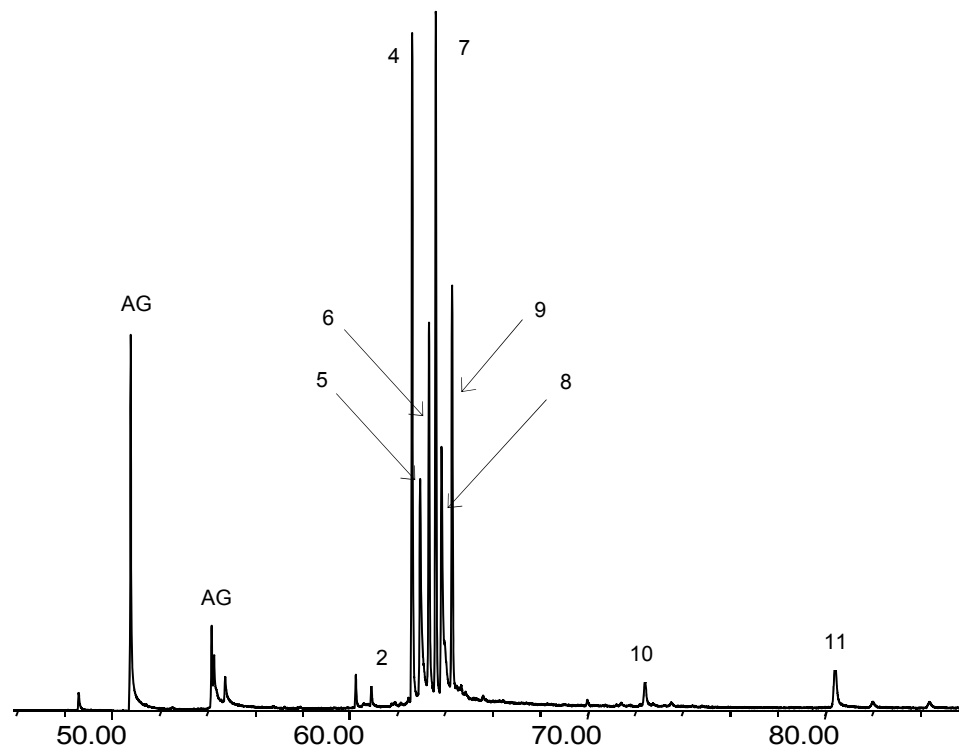


Figura 34. Cromatograma típico del extracto SFE de café tipo catación sililado. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

En extractos de café consumo y café catación sililados, se reconoció tentativamente el 11,12-isokahweol (compuesto 11). En la **Figura 36** se presenta su espectro de masas, junto con sus posibles rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV en el **Esquema 4**. A partir de su ion molecular, M^+ , en m/z 312 (100%), el 11,12-isokahweol presentaría la pérdida de una molécula de agua dando el ion m/z 294 (28%), la salida del radical alquílico metilo y la pérdida del hidroximetileno generaría los iones $(M-CH_3)^+$ en m/z 297 (8%) y $(M-CH_2OH)^+$ en m/z 281 (24%). La ruptura alílica **1** permitiría la obtención del ion-fragmento m/z 161 (13%) que posteriormente por eliminación de una molécula de etileno llevaría al ion-fragmento en m/z 133 (25%) y que a su vez generaría el ion tropilio m/z 91 (76%) como resultado de la pérdida de $^{\bullet}CH_2OH$; así mismo el ion en m/z 147 (22%) se formaría por la ruptura α (ruptura **2**), daría por pérdida del $^{\bullet}CH_2OH$ al ion-fragmento en m/z 105 (15%) y por salida de etileno al ion en m/z 119 (15%). La salida de CO a partir de este último llevaría nuevamente a la formación del ion en m/z 91 (76%).

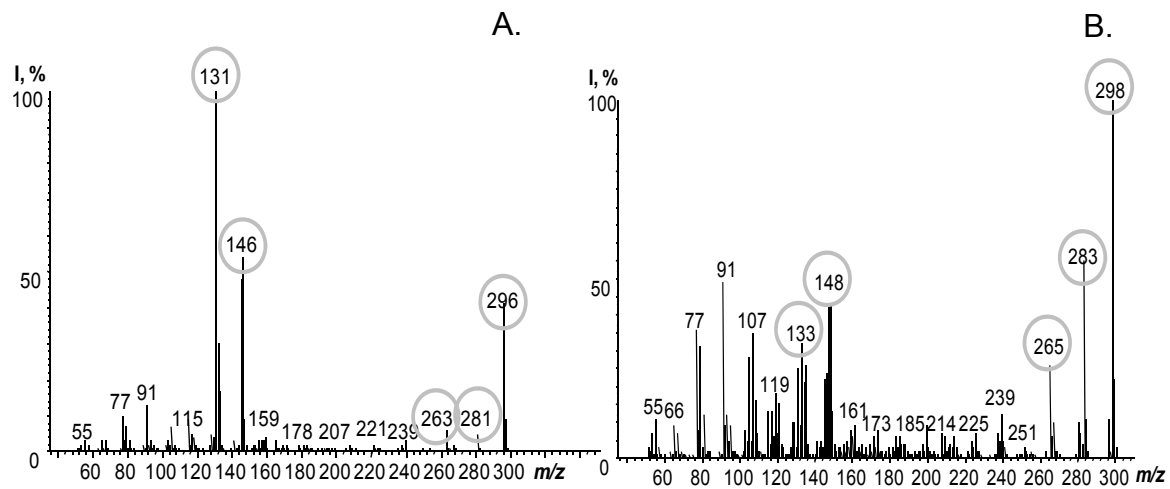


Figura 35. Espectros de masas de compuestos en extractos de café tostado sililados. **A.** Compuesto 4 (dehidrokahweol); **B.** Compuesto 7 (dehidrocafestol). EI, 70 eV.

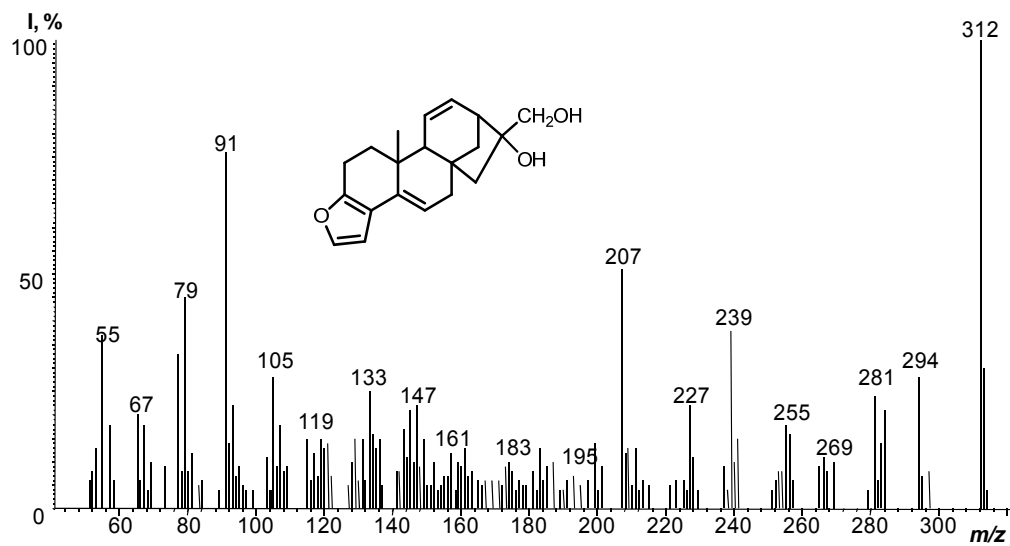
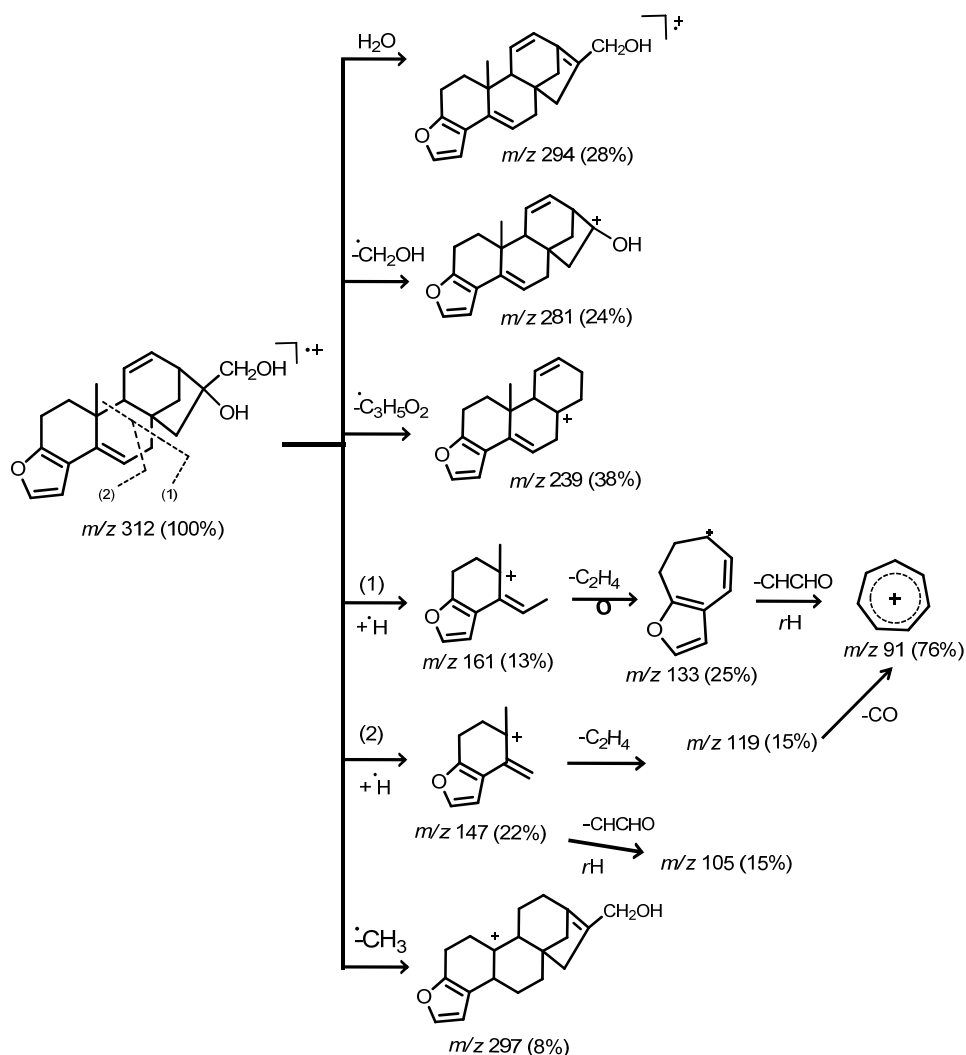


Figura 36. Espectro de masas del 11,12-isokahweol. EI, 70 eV.

Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación propuestas para el 11,12-isokahweol.



El análisis de la fracción insaponificable de aceite de café verde y tostado mostraría la aparición de productos de degradación en la fracción diterpénica del café tostado. En los cromatogramas (**Figura 37**), se pueden observar los compuestos de los picos 4, 7, 12, 13, 14, 15 forman parte de la fracción diterpénica. Los compuestos 12-15 son comunes para los dos extractos de café; al igual que las sustancias β -tocoferol (17), vitamina E (18), campesterol (19) y estigmasterol (20). Ha sido reportado que la cantidad de estigmasterol en aceite de café tostado es mayor que la cantidad de campesterol [108]. Experimentalmente se observó que en los aceites prima el estigmasterol, con cantidades

relativas de 6.55 % en café consumo y 2.98% en café verde. El campesterol es superior en el café verde (1.68%).

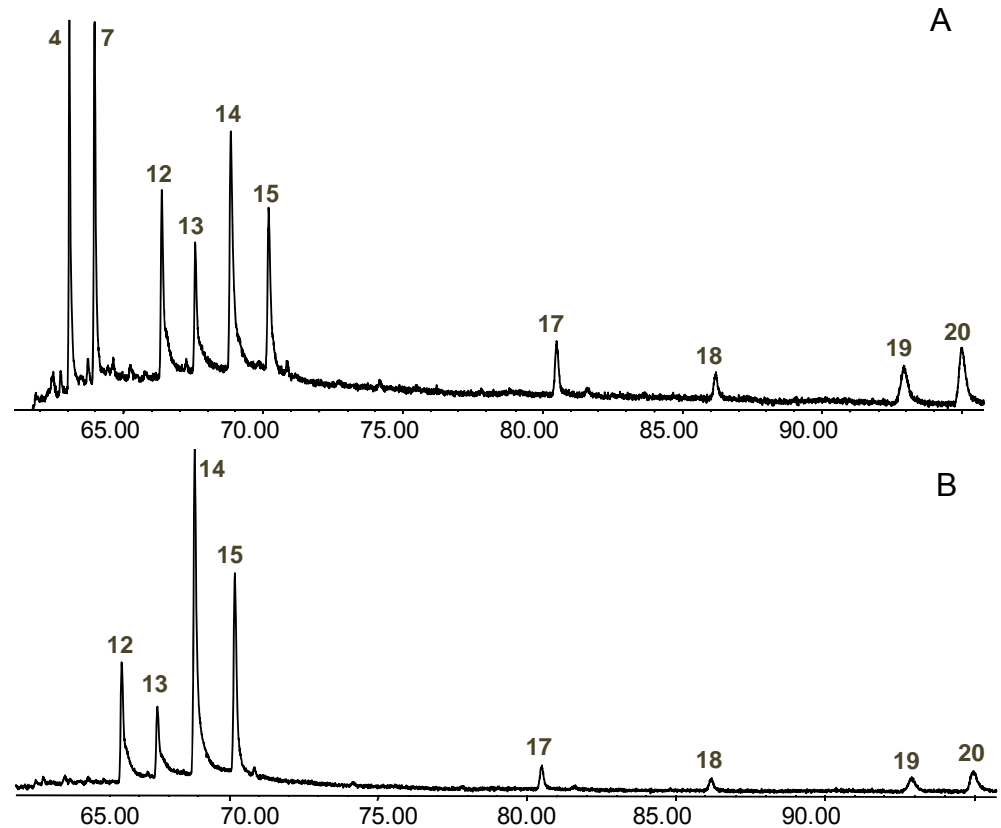


Figura 37. Fragmentos de cromatogramas de la fracción insaponificable de: **A.** Aceite de café, tipo consumo; **B.** Aceite de café, tipo verde.

La cantidad de vitamina E es mayor en café verde y la cantidad de β -tocoferol es mayor en café tostado (**Figura 38**); resultados que están de acuerdo con lo reportado por Alves *et al.* (2009), Kolling-Speer *et al.* (2006), Ogawa *et al.* (1989), y Aoyama *et al.* (1988) [55, 109-111]. La mayor cantidad corresponde al β -tocoferol, que por estar en mayor cantidad es el único que se alcanza a registrar mediante el análisis por GC-MS.

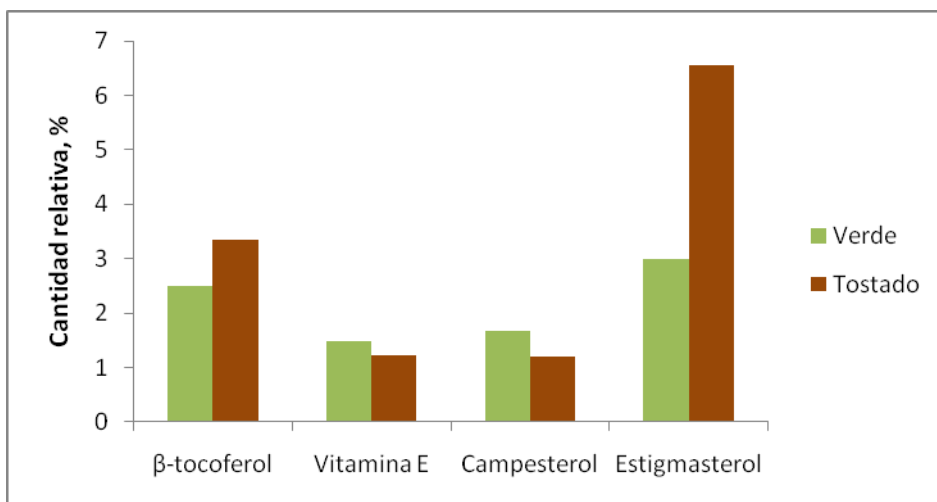


Figura 38. Cantidades relativas, (%) de β -tocoferol, vitamina E, campesterol y estigmasterol en extractos SFE de cafés, verde y tostado.

El espectro de masas del compuesto 13 (16-O-Isobutilcafestol) se observa en la **Figura 39**. Las rutas de ionización propuestas para la disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se encuentran en el **Esquema 5**.

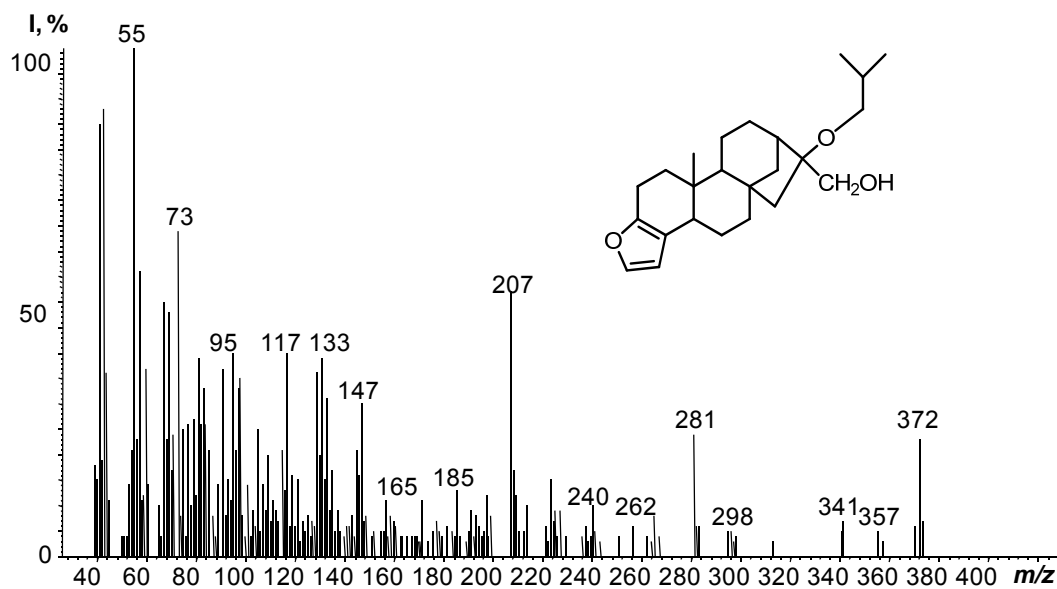
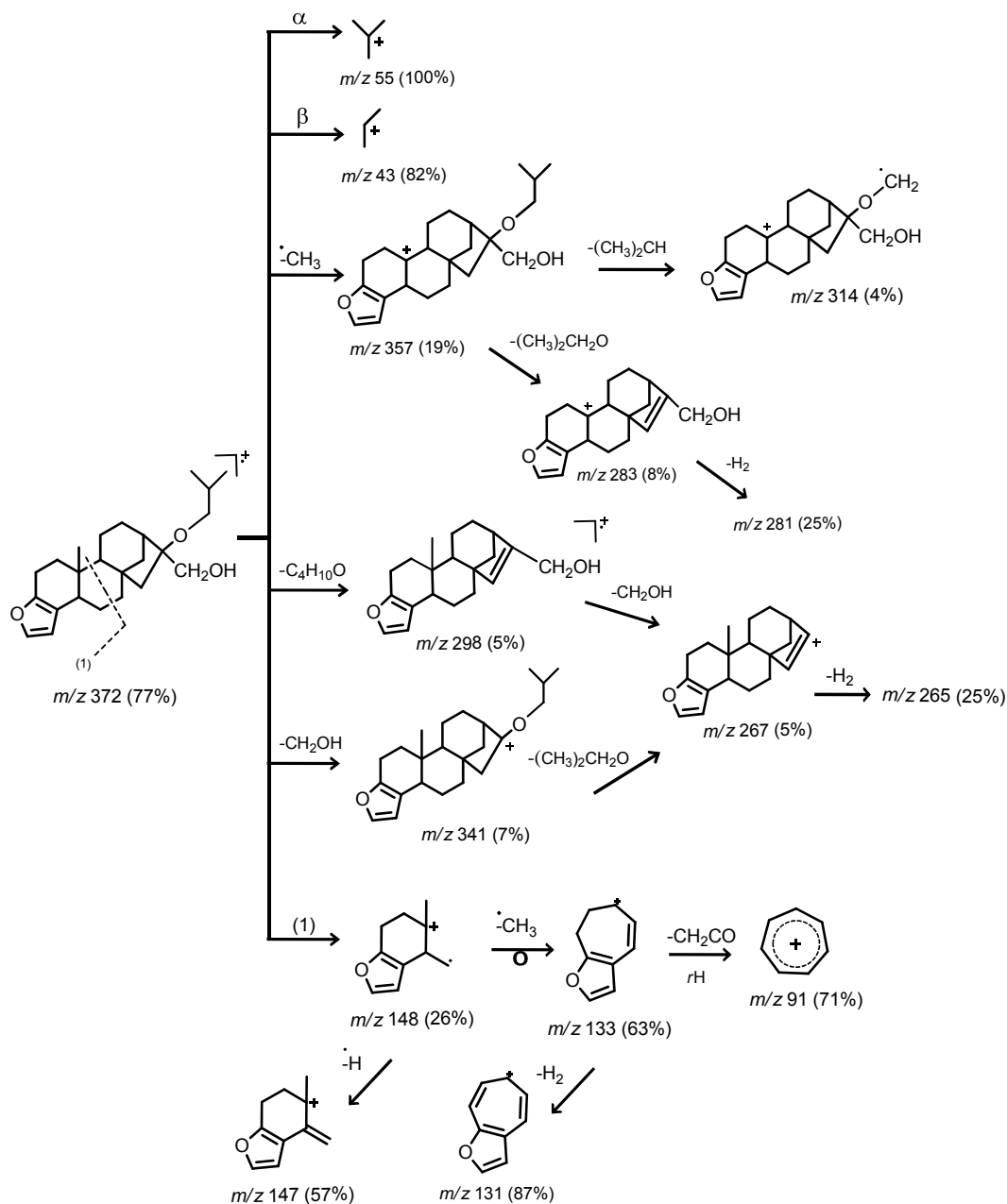


Figura 39. Espectro de masas del 16-O-isobutilcafestol. EI, 70 eV.

Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación para el 16-O-isobutilcafestol.



El 16-O-isobutilcafestol tendría como ion molecular, M^+ , en m/z 372 (77%). La ruptura del enlace C-O implicaría la pérdida de $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, dando el ion-fragmento en m/z 298 (5%) que por pérdida de 31 una equivalentes a CH_2OH formaría el ion en m/z 267 (7%), y por la

posterior eliminación del hidrógeno (H_2) generaría el ion en m/z 265 (25%). La pérdida de $CH_3\cdot$ daría el ion en m/z 357 (19%); a partir de éste por ruptura del enlace α del átomo de oxígeno se tendría en m/z 314 (4%) y por ruptura del enlace C-O y salida de un hidrógeno el ion en m/z 283 (8%), que luego con la eliminación de H_2 generaría el ion en m/z 281 (25%). La fragmentación en α permitiría la salida de un hidroximetileno ($M-31$)⁺ de modo que se tendría el ion en m/z 341 (7%). La pérdida de $C_4H_{10}O$ daría seguidamente el ion-fragmento en m/z 267 (7%), que con la salida de H_2 daría el ion en m/z 265 (25%). Por otro lado la ruptura **1** generaría los iones en m/z 148 (26%), m/z 147 (57%), que a su vez darían origen a en m/z 133 (63%), y finalmente al ion tropilio m/z 91 (71%). Es necesario considerar igualmente que el catión alquílico (C_4H_9)⁺, que es el ion pico de base en m/z 55 (100%), mostraría el fragmento alquílico del éter, junto con el ion-fragmento en m/z 73 (57%) que correspondería a (C_4H_9O)⁺.

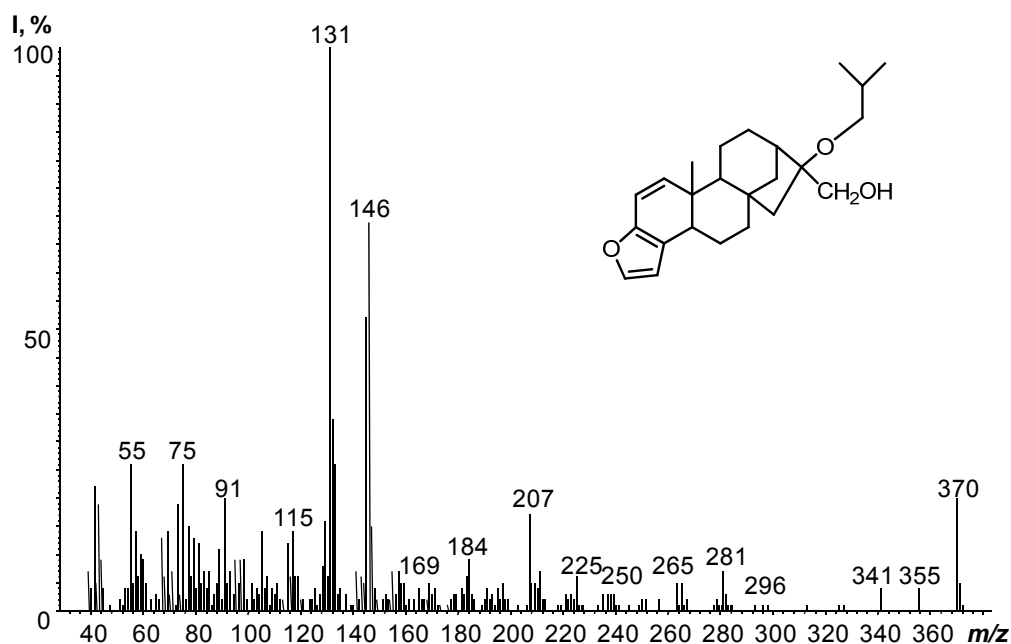
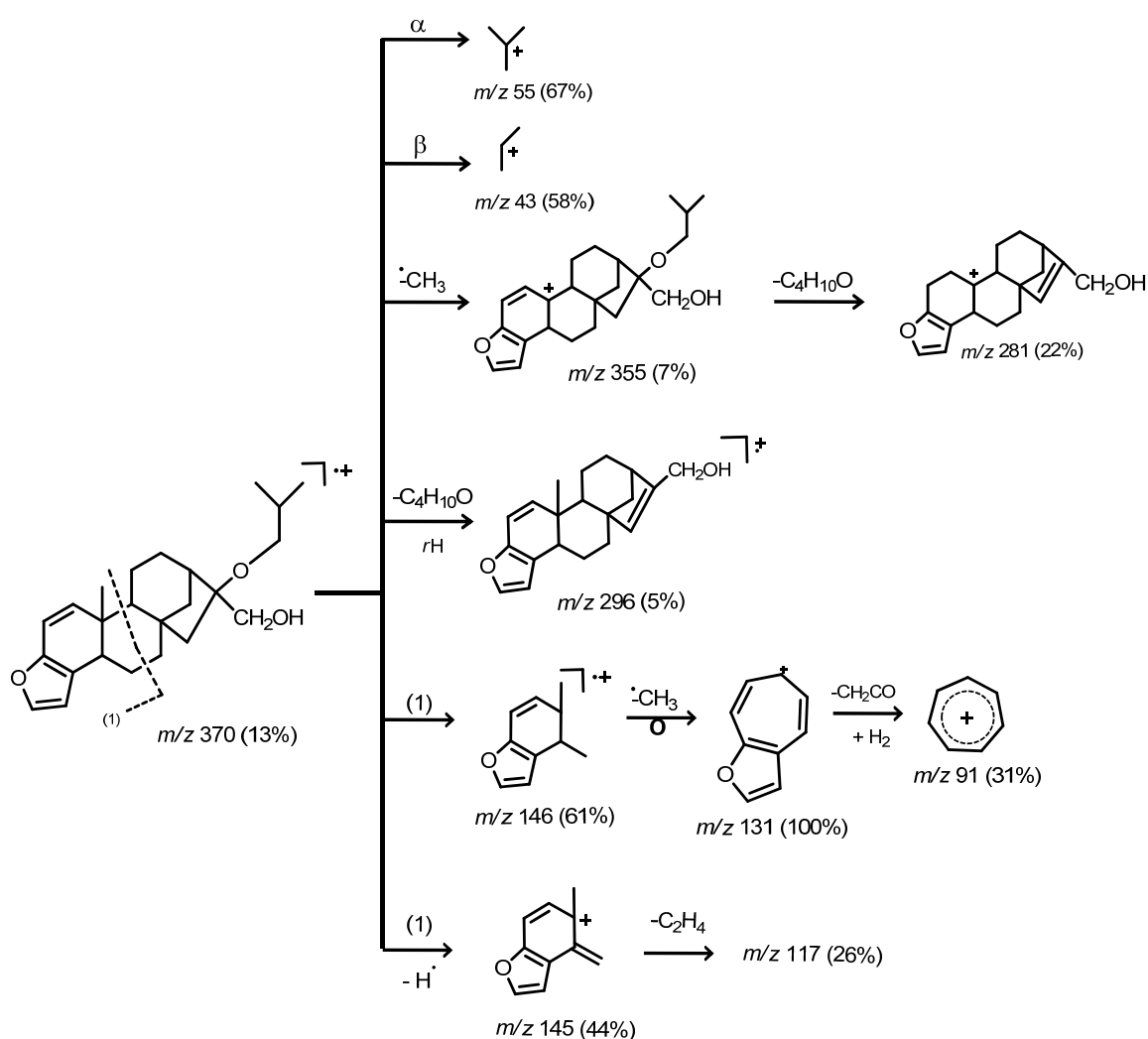


Figura 40. Espectro de masas del 16-O-isobutylkahweol. EI, 70 eV.

El espectro de masas del compuesto 16-O-isobutylkahweol se indica en la **Figura 40**, y las rutas propuestas para la ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV aparecen en el **Esquema 6**. El 16-O-isobutylkahweol presenta su ion molecular, M^+ , en

m/z 370 (13%), el cual por salida de un radical alquílico (CH_3^\bullet), generaría la formación del catión en m/z 355 (7%), que al perder $^\bullet\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ daría el ion-fragmento en m/z 281 (22%). De la misma forma, la salida de $^\bullet\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ a partir del ión molecular formaría el fragmento de baja intensidad (5%) en m/z 296. Las rupturas α y β con respecto al oxígeno del grupo éter llevarían a la formación de los iones en m/z 55 (67%) y m/z 43 (58%), es decir, los cationes resultantes de la pérdida de la cadena lateral.

Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación para el 16-O-isokahweol.



Por medio de la ruptura 1, la eliminación de CH_3^\bullet y un reordenamiento molecular, se generarían los iones en m/z 146 (61%) y en m/z 131 (100%). La existencia de estos dos iones-fragmento y más aun el hecho de que el ion pico de base sea en m/z 131, establecería la existencia de la insaturación entre los carbonos C1-C2. Así mismo, la ruptura 1 generaría los fragmentos en m/z 145 y m/z 117, cada uno con intensidades de 44% y 26%, correspondientemente.

En la **Figura 41** se presenta el espectro de masas del cafestol (compuesto 15). Las rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV que se proponen, se observan en el **Esquema 7**. El ion molecular, M^+ , del cafestol sería el mismo ion pico de base en m/z 316 (100%), las rupturas 1 y 2 formarían los fragmentos en m/z 161 (11%) y m/z 148 (34%), y estos dos fragmentos, luego de la salida de etileno y la pérdida de CH_3^\bullet ; y en ambos casos a través de un reordenamiento molecular llevarían a el ion en m/z 133 (48%). Este fragmento por pérdida de 42 uma generaría el ion tropilio m/z 91 (62%).

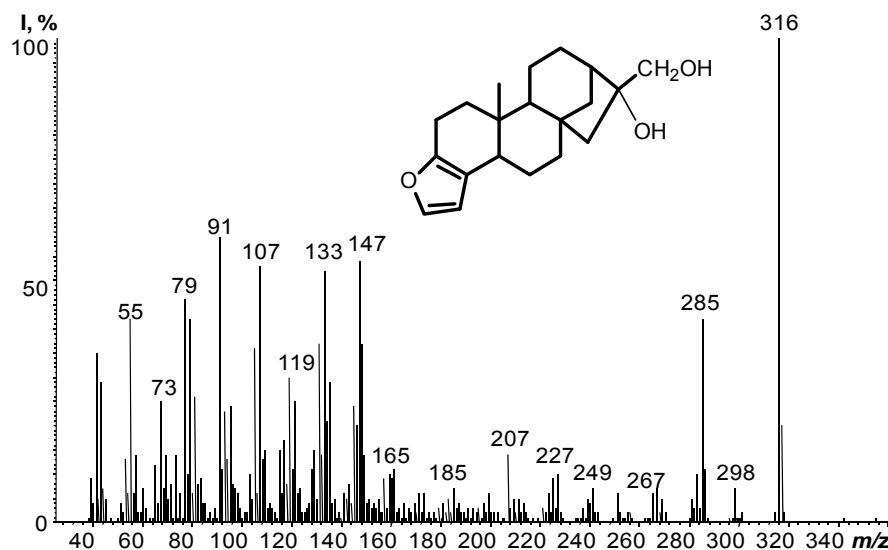


Figura 41. Espectro de masas del cafestol. EI, 70 eV.

El ion molecular experimentaría la pérdida de una molécula de agua, genera el fragmento en m/z 298 (10%) y éste, por eliminación de un radical alquílico CH_3^\bullet , producirá el

iones en m/z 146 y m/z 131, serían un indicativo de la posible presencia del doble enlace entre C1-C2. De la misma forma, la deshidratación de la molécula y la salida de CH_2OH permitirían presumir que el compuesto es un alcohol, concordando así con la estructura del kahweol.

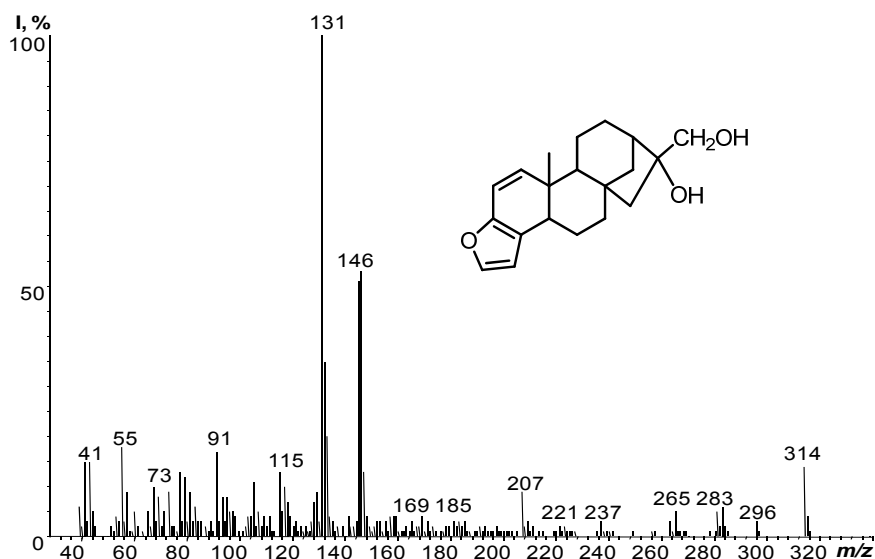
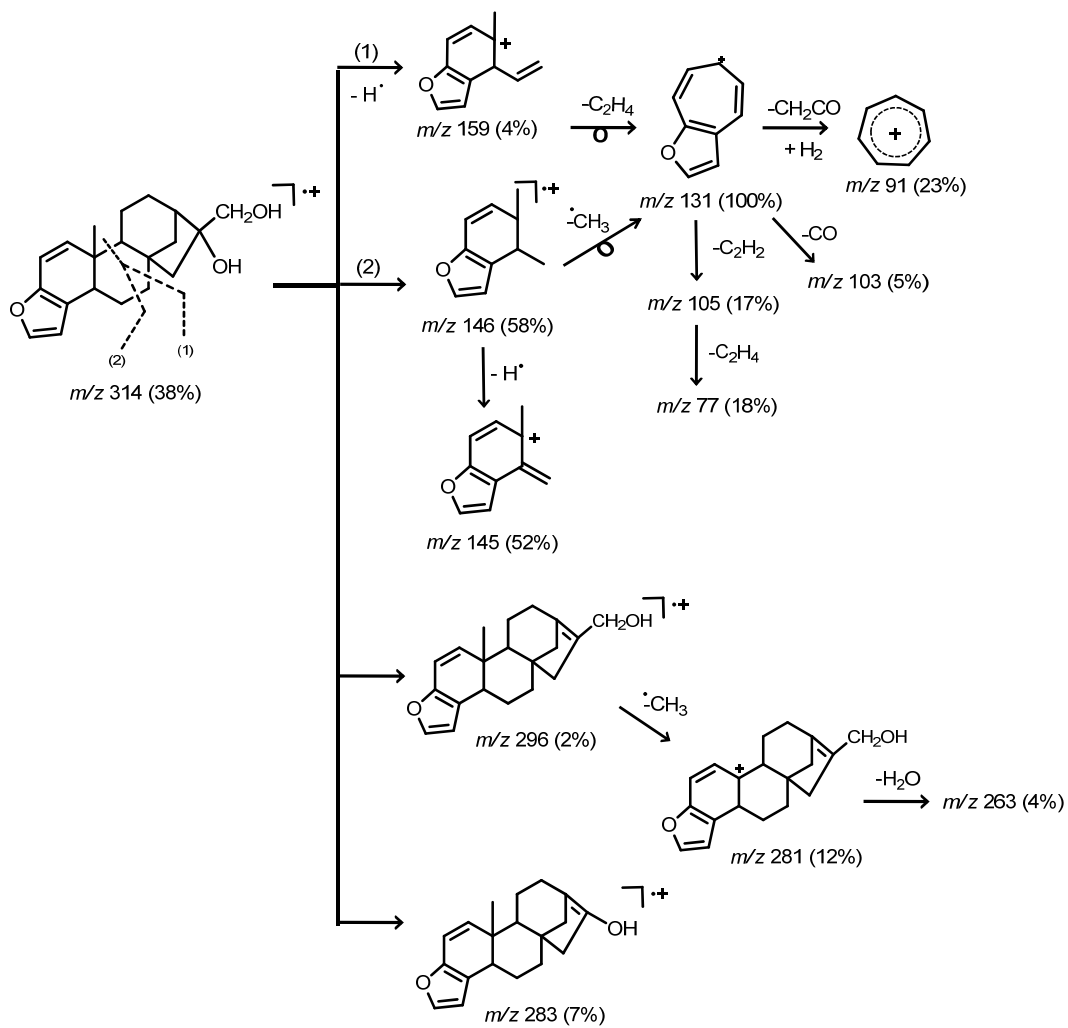


Figura 42. Espectro de masas del kahweol. EI, 70 eV.

Cuando se saponifica y posteriormente se derivatizan los extractos (**Figura 43**) se encuentran dos compuestos en mayor cantidad (TMS-4, TMS-7); las **Figuras 44** y **45** muestran sus espectros de masas. Se propondría que los posibles compuestos que se presentan en mayor cantidad en los extractos que únicamente fueron saponificados (compuestos 4 y 7), se encontrarían derivatizados.

A partir de los iones moleculares propuestos, M^+ , se presenta una pérdida de CH_3^\bullet , y se generaran los iones en m/z 355 (26%) y m/z 353 (4%). Los iones en m/z 133 (24%) y m/z 147 (52%), m/z 131 (100%) y m/z 145 (99%) son típicos y caracterizarían el perfil diterpénico. Igualmente, se presentan los iones en m/z 91, m/z 105 y m/z 119, en ambos espectros de masas, lo que muestra la similitud con los espectros obtenidos experimentalmente para los compuestos no derivatizados (4-9) y con los reportados por Lecker *et al.* (1995) [44].

Esquema 8. Posibles rutas de fragmentación del kahweol.



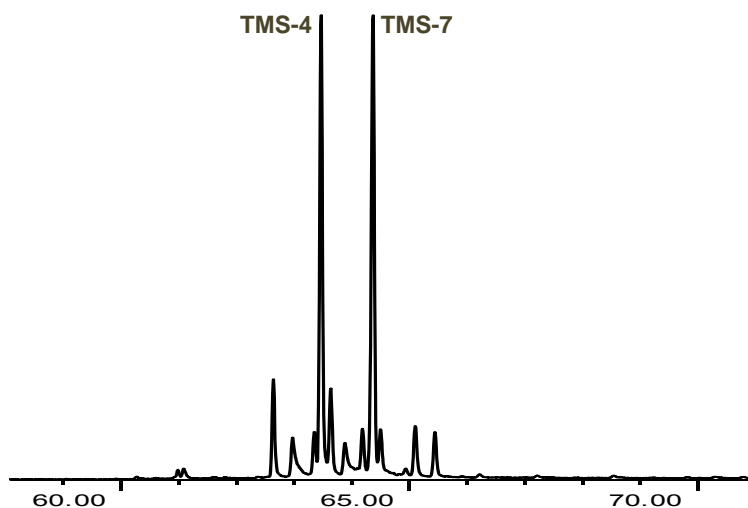


Figura 43. Fragmento del cromatograma de la fracción insaponificable sililada del extracto SFE de café, tipo consumo; compuestos éteres trimetilsilílicos de dehidrokahweol y dehidrocafestol (TMS-4, TMS-7).

Se propone entonces, que el compuesto TMS-4 correspondería a la mezcla de los derivados trimetilsilílicos de 13,16-dehidrocafestol, 15,16-dehidrocafestol; de la misma forma, el TMS-7 a los derivados trimetilsilílicos 13,16-dehidrokahweol, 15,16-dehidrokahweol. Los posibles iones moleculares, M^+ , en m/z 370 (57%) y m/z 368 (60%) del éter trimetilsilílico de dehidrokahweol y del éter trimetilsilílico de dehidrocafestol, respectivamente, equivalen al incremento de 73 una del trimetilsilil, es decir, serían *mono*-derivados O-TMS. Es entonces notorio en los dos espectros el ion $[Si(CH_3)_3]^+$ en m/z 73, con un 59% en el TMS-4 y de un 53% en el TMS-7. Si la formación de derivados TMS de los compuestos se da únicamente cuando se saponifica el extracto, se podría proponer que los compuestos 4-9 serían diterpenos que se encontrarían esterificados con distintos AG, razón por la cual, cuando se analizan los extractos *per se* existiría una variación en los tiempos de retención de dichos compuestos pero no variación significativa en sus espectros de masas.

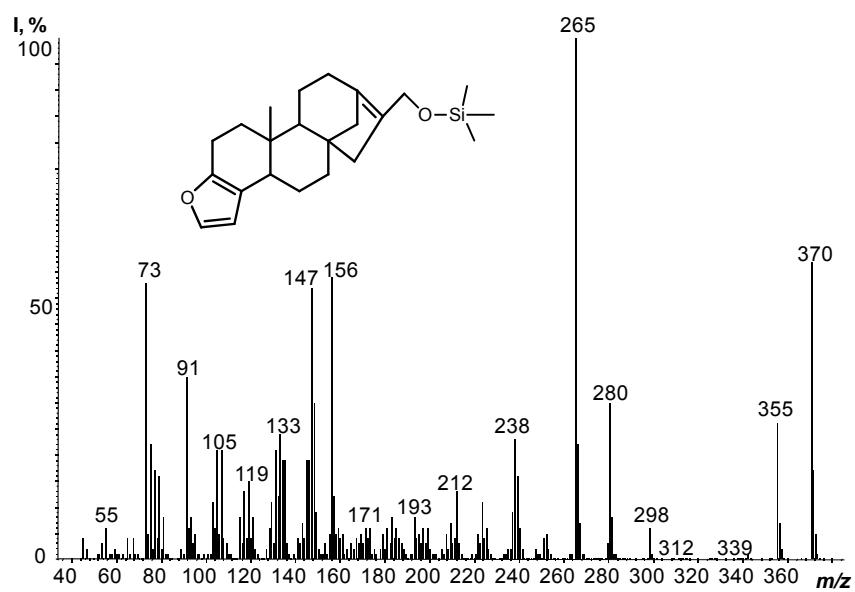


Figura 44. Posible espectro de masas del éter trimetilsilílico de dehidrocafestol. EI, 70 eV.

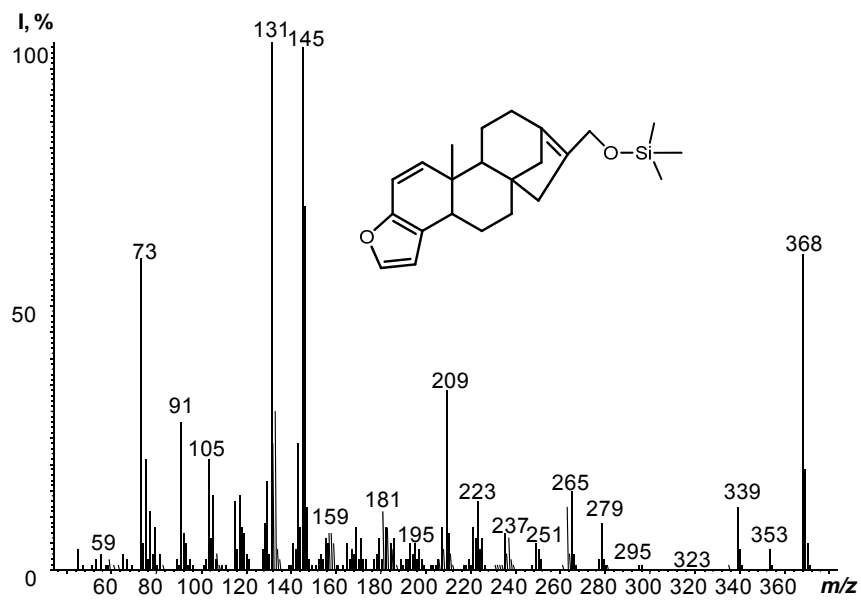


Figura 45. Posible espectro de masas del éter trimetilsilílico de dehidrokahweol. EI, 70 eV.

Tabla 14. Cantidad relativa, (%) e identificación tentativa de los principales compuestos presentes en aceites de café con diferente grado de tosti3n, extraídos por SFE-CO₂ (450 bar, 68 3C).

| No. Pico | Compuesto | I _R exp. DB-5 | CANTIDAD RELATIVA, % | | | |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------------------|--|
| | | | Caf3 tipo verde | Caf3 tipo semitostado | Caf3 tipo cataci3n | Caf3 tipo consumo |
| 1 | Cafeína* | 1863 | 45.5 ^a | 5.8 ^a | 7.0 ^a | 7.5 ^a |
| 2 | No identificado | - | - | - | 0.4 ^b | 0.2 ^b |
| 3 | No identificado | - | - | 0.7 ^a | 1.2 ^a | 1.3 ^a |
| 4 | Dehidrokahweol** | 2479 | 6.5 ^a | 23.8 ^a | 19.8 ^a | 18 ^a 15.8 ^c |
| 5 | Dehidrokahweol II** | 2492 | 5.8 ^a | 5.7 ^a | 3.6 ^a | 3.4 ^a |
| 6 | Dehidrokahweol III** | 2506 | 4.7 ^a | 2.6 ^a | 3.7 ^a | 2.0 ^a |
| 7 | Dehidrocafestol** | 2521 | 7.6 ^a | 22.6 ^a | 16.9 ^a | 15.3 ^a 14.0 ^c |
| 8 | Dehidrocafestol II** | 2533 | 8.5 ^a | 6.4 ^a | 4.2 ^a | 4.4 ^a |
| 9 | Dehidrocafestol III** | 2547 | 11.2 ^a | 2.1 ^a | 1.8 ^a | 1.5 ^a |
| 10 | No identificado | | - | - | 0.4 ^b | 0.2 ^b |
| 11 | 11, 12-isokahweol** | 3209 | - | - | 1.7 ^a 2.7 ^b | 1.4 ^a tr ^b |

Continuación de la **Tabla 14**.

| No. Pico | Compuesto | I _R exp. DB-5 | CANTIDAD RELATIVA, % | | | |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| | | | Café tipo verde | Café tipo semitostado | Café tipo catación | Café tipo consumo |
| 12 | 16-O-isobutylkahweol** | 2310 | 0.7 ^a 13.3 ^c | 5.7 ^c | 9.7 ^c | 10.2 ^c |
| 13 | 16-O-isobutylcafestol** | 2343 | 0.6 ^a 7.5 ^c | 1.8 ^c | 5.6 ^c | 5.9 ^c |
| 14 | Kahweol* | 2377 | 36.5 ^c | 22.3 ^c | 15.3 ^c | 16.3 ^c |
| 15 | Cafestol* | 2414 | 19.2 ^c | 22.3 ^c | 12.4 ^c | 10.1 ^c |
| 16 | No identificado | - | - | 0.6 ^a | 0.8 ^a | 0.9 ^a |
| 17 | β-tocoferol | - | 2.0 ^c | 5.3 ^c | 3.1 ^c | 3.3 ^c |
| 18 | Vitamina E | - | 1.4 ^c | 1.9 ^c | 1.4 ^c | 1.5 ^c |
| 19 | Campesterol | - | 2.3 ^c | 7.5 ^c | 3.2 ^c | 3.4 ^c |
| 20 | Estigmasterol | - | 3.4 ^c | 9.3 ^c | 6.1 ^c | 6.5 ^c |

* Identificado tentativamente por comparación con bases de datos (ADAMS, Wiley138K y NIST 2002)

**Identificado tentativamente por proposición de rutas de fragmentación y comparación con literatura

^a Extracto diluido en diclorometano

^b Extracto derivatizado (TMS-derivados).

^c Fracción insaponificable

tr:<1%.

4.7 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE CAFÉ OBTENIDOS MEDIANTE EL MÉTODO ABTS⁺

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método ABTS⁺ y se expresó en TEAC (mmol de Trolox[®]/ mmol de sustancia) para las sustancias de control: BHA, vitamina E, ácido caféico y para las sustancias de referencia: cafeína y ácido linoleico. La capacidad antioxidante de los extractos de café se expresó en TAA (mmol de Trolox[®] / kg de extracto).

Las soluciones de trabajo (50-550 μ M) de las sustancias de referencia y de control se prepararon a partir de una solución *stock* de 1 mM, y se diluyeron en las microplacas de 96 pozos. La reacción entre las sustancias evaluadas y los extractos de café con la solución del catión-radical ABTS⁺ se monitoreó cada dos minutos hasta alcanzar un estado de equilibrio a 25 °C.

La **Figura 46** muestra una microplaca de 96 pozos donde se desarrolla la reacción entre la solución del catión-radical ABTS⁺, las sustancias de control, las sustancias de referencia y el blanco de la medida.

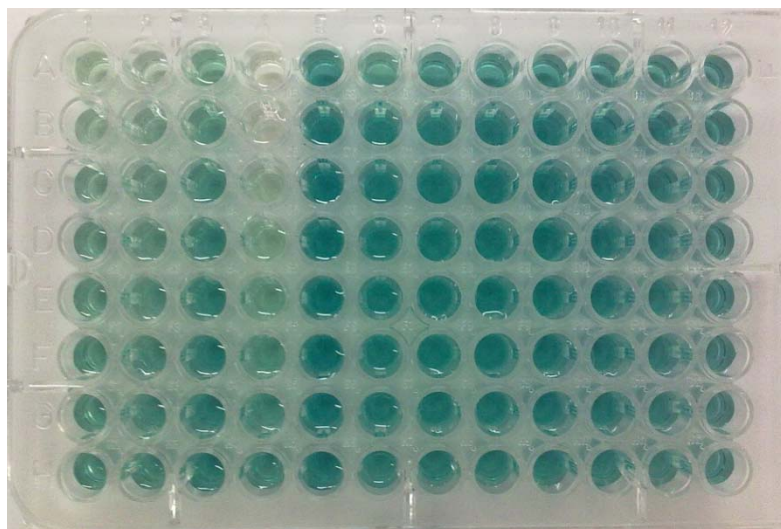


Figura 46. Fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre el ABTS⁺, las sustancias de control y las sustancias de referencia.

Para calcular el valor TEAC se tomo como base lo descrito por Muñoz en su tesis de doctorado [93], donde explica que no todas las sustancias poseen un comportamiento lineal (función logarítmica, varias pendientes) y que éste varía según la cinética de reacción. El valor TEAC como la relación de pendientes dependerá del rango de inhibición seleccionado y, por tanto no será un valor sino un rango. Así, el valor TEAC se cálculo como la relación entre las concentraciones inhibitorias al 50% (IC₅₀) de Trolox®.

La **Figura 47** muestra la capacidad AO del Trolox® medida en el ensayo. Se observa la relación lineal entre la concentración de Trolox® y el porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS⁺, indicando su capacidad para atrapar radicales libres.

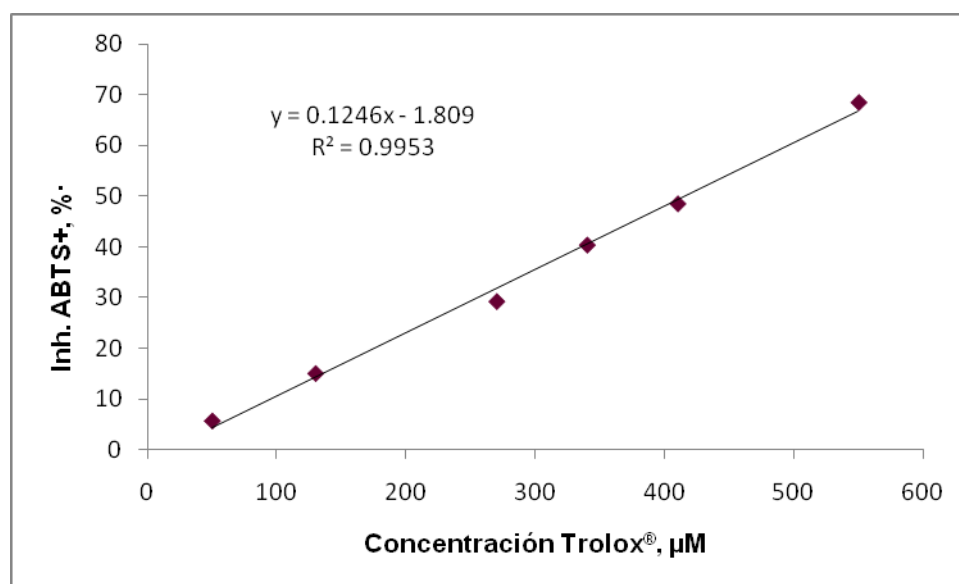


Figura 47. Efecto de la inhibición de ABTS⁺ por la adición de diferentes concentraciones de Trolox®.

Las muestras control empleadas también poseen curvas lineales de porcentaje de inhibición Vs concentración (**Figura 48**). Los valores de TEAC obtenidos para las sustancias control se determinaron a los 30 min, tiempo en el que se alcanzó el estado estacionario, es decir, condiciones cercanas al equilibrio [112].

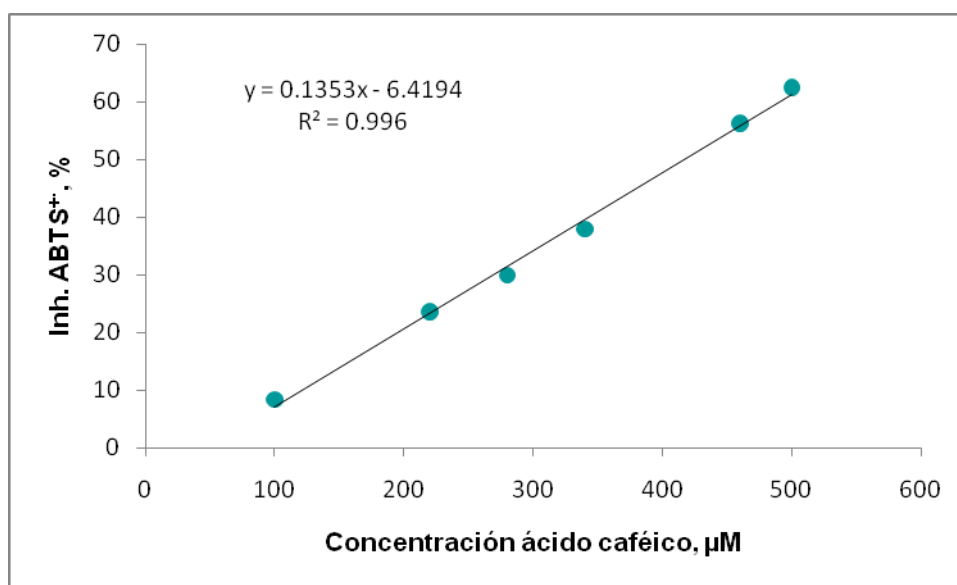
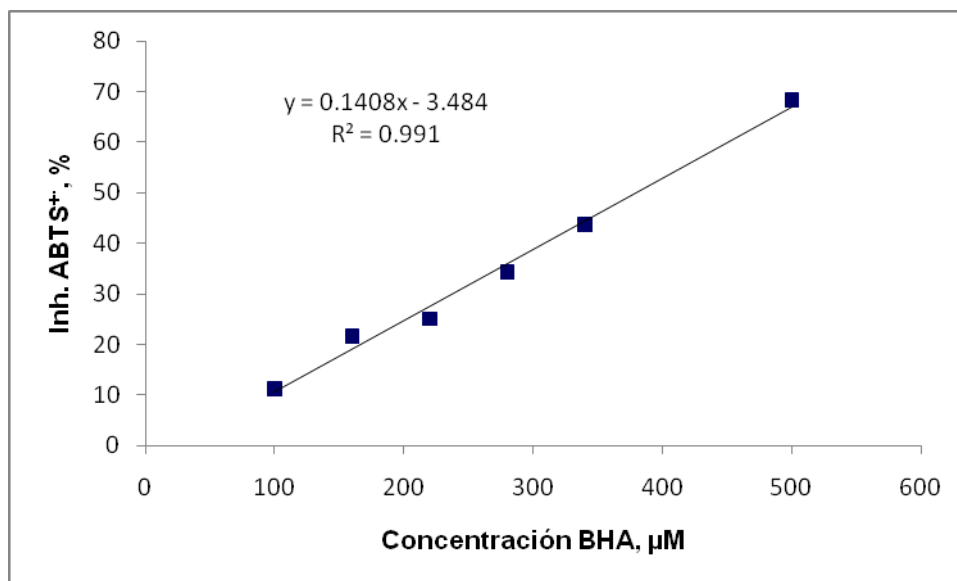


Figura 48. Efecto de la inhibición de ABTS^{•+} por la adición de diferentes concentraciones de BHA y ácido caféico.

Las sustancias de referencia, cafeína y ácido linoleico presentan menor capacidad antiradicalaria en comparación con el antioxidante sintético BHA y el antioxidante natural ácido caféico (**Tabla 15**).

Tabla 15. Valores TEAC de las sustancias de referencia y de las sustancias control.

| Sustancia evaluada | TEAC (IC ₅₀ Trolox [®] / IC ₅₀ AO) | |
|---------------------|---|-------------------------------|
| | IC ₅₀ Trolox [®] (μM) | TEAC* |
| Trolox [®] | 415.80 | ----- |
| BHA | 379.86 | 1.095 ± 0.04 |
| Vitamina E | 664.53 | 0.626 ± 0.06 |
| Ácido caféico | 417.00 | 0.997 ± 0.03 |
| Cafeína | 499,893 | 8.318×10 ⁻⁴ ± 0.04 |
| Ácido linoleico | 499,816 | 8.319×10 ⁻⁴ ± 0.05 |

*Valor promedio ± desviación estándar, n = 3 (réplicas)

La capacidad antioxidante de los extractos de café presentó valores de TAA de 10.20 ± 0.2, 8.40 ± 0.4, 23.16 ± 0.3, 26.38 ± 0.2 para el aceite de café tipo verde, aceite de café tipo semitostado, aceite de café tipo catación, y aceite de café tipo consumo, respectivamente (**Tabla 16**). Estos resultados en comparación con los obtenidos por el antioxidante sintético BHA (6070 ± 57) y el antioxidante natural ácido caféico (5530 ± 69) indican la baja capacidad antiradicalaria de los extractos de café obtenidos por CO₂ supercrítico. Esto puede ser atribuido a la ausencia o baja concentración de compuestos fenólicos, que se encuentran presentes en el café [6] y que a pesar de la modificación de las condiciones de extracción del CO₂ no se lograron obtener, como consecuencia de la naturaleza apolar de este disolvente [113]. Los valores de TAA obtenidos para los extractos se determinaron a los 120 min, tiempo en el que se alcanzó el estado estacionario.

Teniendo en cuenta que la composición de los extractos de café con diferente nivel de tostión presentan alta concentración de cafeína y ácido linoleico, se puede explicar la baja capacidad antioxidante de éstos. Sin embargo, los extractos exhiben mejores resultados que las muestras de referencia debido posiblemente a la presencia de compuestos activos que aun en bajas concentraciones como la vitamina E y el β-tocoferol, o en sinergia con los compuestos principales [114], pueden lograr un mínimo comportamiento como potenciales antioxidantes.

Tabla 16. Valores de TAA para las sustancias de referencia, de control y extractos de café.

| Sustancia evaluada | TAA (mmol de Trolox [®] / kg de AO) |
|----------------------------------|--|
| Trolox [®] | ----- |
| BHA | 6070 ± 57 |
| Vitamina E | 1500 ± 196 |
| Ácido caféico | 5530 ± 69 |
| Cafeína | 4.3 ± 0.3 |
| Ácido linoleico | 3.0 ± 0.4 |
| Aceite de café, tipo verde | 10.2 ± 0.2 |
| Aceite de café, tipo semitostado | 8.4 ± 0.4 |
| Aceite de café, tipo catación | 23.2 ± 0.3 |
| Aceite de café, tipo consumo | 26.4 ± 0.2 |

La variación de la capacidad antioxidante de las muestras según el grado de tuestión concuerda con lo descrito por Sánchez *et al.* (2005) [88]. Se puede establecer que hay un incremento en la capacidad antioxidante en aceites de café provenientes de café con tostado oscuro, siendo difícil concluir un comportamiento lineal de la actividad biológica con base en el nivel de tuestión del café.

5. CONCLUSIONES

- Se determinaron las mejores condiciones de extracción para obtener altos rendimientos del aceite de café mediante la técnica SFE, empleando un diseño experimental factorial 2^3 , con diferentes niveles de presión, temperatura y grado de tostión, fijando como condiciones finales una presión de 450 bar y una temperatura de 68 °C para las cuatro muestras de café con diferentes nivel de tostión.
- Los rendimientos del aceite de café variaron según el grado de tostión de las muestras, encontrando una relación directamente proporcional, un aumento en la tostión del café aumenta el rendimiento de extracto. El mayor rendimiento lo presentó el café tipo consumo (6.2%), seguido de café tipo catación (5.3%). Los rendimientos de extracción bajos se observaron para el café tipo semitostado (4.8%), seguido de café tipo verde (4.6%).
- En este trabajo la SFE-CO₂ a pesar de ser una técnica que posee varias ventajas, no permitió obtener extractos con contenido de compuestos polares, como polifenoles, a los que se atribuye la capacidad antioxidante del café. La modificación de las condiciones del estado supercrítico del CO₂ no fueron suficientes para que este tipo de compuestos logren solubilizarse en él, debido a su naturaleza apolar.
- La composición química del aceite de café se reconoció tentativamente, a partir de bases de datos, comparación con la literatura existente y proposición de rutas de fragmentación. Los compuestos mayoritarios en los extractos SFE de cafés tostados son los diterpenos dehidrocafestol y dehidrokahweol, con cantidades relativas de 22.6% y 23.8%, y en café verde la cafeína con una cantidad relativa de 45.5%.

- Mediante la saponificación de los extractos fue posible la liberación de diterpenos que previamente podían estar esterificados con los ácidos grasos presentes, de modo que fue posible reconocer parte de la fracción diterpénica no encontrada en el análisis del aceite diluido; compuestos como el cafestol, kahweol, 16-O-isobutilcafestol, 16-O-isobutylkahweol pudieron ser distinguidos.
- El perfil de ácidos grasos de los extractos de café indicó que no existe variación en la composición según el nivel de tuestión. En mayor proporción se encontraron el ácido linoléico (43.6%), el ácido palmítico (35.5%) y el ácido oleico (7.5%), respectivamente.
- Se evaluó la capacidad antioxidante de las sustancias de control, las sustancias de referencia y de los cuatro extractos de café con diferente grado de tuestión, a través del método de la decoloración del catión-radical ABTS⁺. Se estableció que hay variación en la capacidad antioxidante del aceite de café según el nivel de tuestión. El extracto con mejor actividad fue el aceite de café tipo consumo (TAA 26.38), seguido del aceite de café tipo catación (TAA 23.16). La baja capacidad antioxidante de los extractos de café es debida a la gran cantidad de compuestos lipídicos, como ácidos grasos y diterpenos; permitiendo afirmar que la fracción lipídica no contribuye en forma significativa en la capacidad antioxidante del café.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar un diseño experimental estableciendo como respuesta no sólo el rendimiento de aceite sino la variación de la capacidad antioxidante, observable que se encuentra directamente relacionado con la composición de los extractos.
- Emplear cosolventes como etanol en la obtención de los extractos de café con SC-CO₂ comparando la composición química de los mismos.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de café utilizando otras metodologías (ORAC, DPPH, peroxidación lipídica).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SHIBAMOTO, T. An overview of coffee aroma and flavor chemistry. *Quartozieme Colloque Scientifique International sur le Café*. **1991**, 107–116.
2. Variedades de café: Estilos de Tostión. Disponible en: http://www.colombia.com/gastronomia/especiales/especial_4/variedades.asp. Fecha de consulta 5 de octubre **2010**.
3. DE OLIVEIRA, A.; CRUZ, P.; EBERLIN, M.; CABRAL, F. Brazilian roasted coffee oil obtained by mechanical expelling: compositional analysis by GC-MS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, 25, 677-682
4. CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, V; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40, 1155–1163.
5. REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids.* **2006**, 38, 146–166.
6. FLAMENT, I.; BESSIÈRE-THOMAS, Y. Coffee Flavor Chemistry. John Wiley and Sons, LTD, Chichester. **2001**, 3-4, 11, 26-29, 12-26, 37-40.
7. WAGNER, R.; WILLIAM H. H.; ROTHKIRCH VON, C. Historia del Café de Guatemala. Asociación Nacional del Café (Guatemala), Villegas Asociados. **2003**, 22.
8. CADENA, G. Ciencia y Tecnología: Café y Desarrollo. **1995**, 123-128.
9. URIBE, A. Brown gold: the amazing story of coffee. Random House, New York. **1954**, 105.

10. Café de Colombia: El árbol y el entorno. Disponible en: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno/. Fecha de consulta: 5 de octubre 2010.
11. SPILLER, G. The coffee plant and its processing. ALTON, M. *Caffeine*. CRC Press, Boca Ratón, EE. UU. **1998**, 12,80-82.
12. ALVES, R.; CASAL, S.; ALVES, M.; OLIVEIRA, M. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chem.* **2009**, 114, 295–299.
13. RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Coffee: a perspective on processing and products. RAMASWAMY, H.; RAGHAVAN, G.; CHAKRAVERTY, A.; MUJUMDAR, A. *Handbook of postharvest technology: cereals, fruits, vegetables, tea and spices*. CRC Press LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2003**, 697-699.
14. El café de Colombia, Caficultura Colombiana: Variedades de café sembradas en Colombia. Disponible en: <http://www.federaciondecafeteros.org/static/files/EI%20Caf%C3%A9%20de%20Colombia%20Contexto%20General.pdf>. Fecha de consulta: 3 de octubre **2010**.
15. FELDMAN J., RYDER W., KUNG J. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17, 733-739.
16. DEL CASTILLO, D.; GORDON, M.; AMES, J. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, 221, 471-447.
17. Tostado y molido del café. Disponible en: www.infoagro.net/shared/docs/a5/gtecnol3.pdf. Fecha de consulta 11 febrero **2010**.
18. FRANCA, S.; MENDONÇA, J.; OLIVEIRA, S. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT.* **2005**, 38, 709–715.

19. HERNÁNDEZ, J.; HEYD, B.; IRLES, C.; VALDOVINOS, B.; TRYSTRAM, G. Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting. *J. Food Eng.* 2007, 78, 1141-1148.
20. SCHWARTZBERG, H. Modeling bean heating during batch roasting of coffee beans. WELTI-CHANES, J.; BARBOSA-CÁNOVAS, V.; AGUILERA J. *Engineering and Food for the 21st Century*. CRC Press LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2002**, 871-873.
21. ADRIANA, S.; FRANCA, A.; OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, R.; MANCHA, P.; AUGUSTI, R. "A preliminary evaluation of the effect of processing temperature on coffee roasting degree assessment". *J. Food Eng.* **2009**, 92, 345–352.
22. EGGERS, R.; PIETSCH, A. Technology: I roasting. CLARKE, R.; VITZTHUM O. *Coffee recent developments*, Blackwell Science, primera edición, Oxford. **2001**, 90-107.
23. SACCHETTI, G.; DI MATTIA, C.; PITTIA, P.; MASTROCOLA, D. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* 2009, 90, 74-80.
24. BAGGENSTOSS, J.; POISSON, L.; KAEGI, R.; PERREN, R.; ESCHER, F. Coffee roasting and aroma formation: application of different time-temperature conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 5836–5846.
25. PITTIA, P.; DALLA, M.; LERICI, C. Textural changes of coffee beans as affected by roasting conditions. *Lebensm. Wiss u. Technol.* **2001**, 34, 167-175.
26. MOTTRAM, D.; LOW M.; ELMORE, J. The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods. ALEXANDER, J.; SKOG, K. *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*. CRC Press LLC, Boca Ratón EE.UU. **2006**.
27. REINECCIUS G.; HEATH H.B. Flavor chemistry and technology. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón EE.UU. **2006**, 103-107.

28. BIRCH, G.; LINDLEY, M. Developments in food flavours. Elsevier applied Science. New York, **1986**, 1-19,173-189.
29. SPEER, K.; KÖLLING-SPEER I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, 18, 201-216.
30. LÓPEZ, E. Extracting oil from coffee. *Revista ingeniería e investigación.* **2007**, 27, 25-31.
31. SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. Lipids. CLARKE, R.; VITZTHUM O. *Coffee recent developments*, Blackwell Science, primera edición, Oxford. **2001**, 33-38.
32. ALVAREZ, A.; RODRIGUEZ, M. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grassas Y aceites.* **2000**, 51, 74–79.
33. GROLLIER, J.; PLESSIS, S. Use of coffee bean oil as a sun filter. United States Patent n° 4,793,990. *US Patent & Trademarker Office.* **1988**.
34. PELLE, E. Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis. United States Patent n° 5,855,897. *US Patent & Trademarker Office.* **1999**.
35. CALLIGARIS, S.; MUNARI, M.; ARRIGHETTI, G.; BARBA, L. Insights into the physicochemical properties of coffee oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, 111, 1270–1277.
36. OLIVEIRA L.; FRANCA A.; CAMARGOS R.; FERRAZ V. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Biores. Technol.* **2008**, 99, 3244–3250.
37. KONDAMUDI, N.; MOHAPATRA, S.K.; MISRA, M. Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 11757-11760.
38. SPILLER, G. The chemical components of coffee. ALTON, M. *Caffeine* CRC Press, Boca Ratón, EE. UU. **1998**, 38-44, 80-82.

39. DE ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN M. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *coffea*. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3065-3069.
40. RATNAYAKE, W.; HOLLYWOOD, R.; O'GRADY, E.; STAVRIC, B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, 31, 263-269.
41. KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER K.; Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1999**, 22, 43–46.
42. KURZROCK T.; SPEER K.; Diterpenes and diterpene esters in coffee. *Food Rev. Int.* **2001**, 17, 433-450.
43. GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. Analysis of the content of the diterpenes cafestol y kahweol in coffe brews. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, 35, 547-554.
44. LERCKER, G.; FREGA N.; BOCCI; E.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. *Chromatographia.* **1995**, 41, 29-33.
45. KURZROCK, T.; SPEER K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 843–848.
46. URGERT, R.; VAN DER WEG, G.;KOSMEIJER-SCHUIL, T.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN M. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. *J. Agric. Food Chem.***1995**, 43, 2167-2172.
47. ELOY, R.; CAMPANHA, F.; ESTEVES, L.; PIRES L.; POT D.; MARRACCINI P.; DE TOLEDO, M. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 88–93.

48. ANNEKATHRIN, K.; SPEER, K. A new component in the lipid fraction of coffee. *Olaj, Szappan, Kozmetika 51. évfolyam 1. Szám.* **2002**, 14-15.
49. HECKERS, H.; GÖBEL, U.; KLEPPEL U. End of the coffee mystery: diterpene alcohols raise serum low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels. *J. Intern. Med.* **1994**, 235, 192–193.
50. TVERDAL, A.; STENSVOLD, I.; SOLVOLL, K.; FOSS, O.; LUND-LARSEN, P.; BJARTVEIT K. Coffee consumption and death from coronary heart disease in middle aged Norwegian men and women. *Br. Med. J.* **1990**, 300, 566–569.
51. LAM, L.; SPARNINS, V.; WATTENBERG L. Isolation and identification of kahweol, palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione-S-transferase activity in the mouse. *Cancer Res.* **1982**, 42, 1193-1198.
52. MASTEN, S. Toxicological summary for cafestol and kahweol. *Review of Toxicological Literature.* **1999**, 1-39.
53. VALDENEBRO, M.; LEÓN-CAMACHO, M.; PABLO F.; GONZÁLEZA A.; MARTÍN M. Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their sterolic content. *Analyst.* **1999**, 124, 999–1002.
54. GONZÁLEZ, A.; PABLOS, F.; MARTIN M.; LEÓN-CAMACHO, M.; VALDENEBRO, M. HPLC analysis of tocopherol and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chem.* **2002**, 93-101.
55. ALVES, R.; CASAL S.; OLIVEIRA M. Determination of vitamin E in coffee beans by HPLC using a micro-extraction method. *Food Sci. Technol. Int.* **2009**, 15, 51-63.
56. SARRAZIN, C.; QUÉRÉ, J.; GRETSCH, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. *Food Chem.* **2000**, 70, 99-106.

57. COMBARIZA, M. Y. Estudio comparativo del aroma de 10 marcas comerciales de café colombiano por diferentes métodos de extracción y análisis. Tesis maestría en Química, Universidad Industrial de Santander. **1997**.
58. DE AZEVEDO, A.B.A.; KIECKBUSH, T.G.; TASHIMA, A.K.; MOHAMEDA, R.S.; MAZZAFERA, P.; VIEIRA DE MELO, S.A.B. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *J. of Supercrit. Fluids*. **2008**, 44,186–192.
59. NICOLI, M. C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICI, C.R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Lebensm. Wiss. u.Technol.* **1997**, 30, 292–297.
60. FERRARI, M.; RAVERA, F.; DE ANGELISA, E.; SUGGI, F.; NAVARINI, L. Interfacial properties of coffee oils. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*. **2010**, article in press.
61. DUNFORD, N. T.; KING, J. W.; GARY, R. Supercritical fluid extraction in food engineering. TZIA, C.; LIADAKIS, G. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Boca Ratón, EE. UU. **2003**, 57-60.
62. ASKIN, R.; GOTO, M.; SASAKI, M. Supercritical fluid extraction in food. ÖTLEŞ, S. *Analysis handbook of food analysis instruments*. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2008**.
63. DOANE-WEIDEMAN T.; LIESCHESKI P.B. Analytical supercritical fluid extraction for food applications. LUTHRIA D. L. *Oil extraction and analysis critical issues and competitive studies*. AOCS press, AOCS publishing. **2004**.
64. SHI J.; ZHOU, X. Solubility of food components and product recovery in the supercritical fluid separation process. *Functional food ingredients and nutraceuticals processing technologies*. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2007**. 48-51.

65. BROGLE, H., Carbon dioxide as a solvent: its properties and applications. *Chem. Ind.* **1982**, 19, 385.
66. BUNKER, C. Supercritical fluid extraction. CAZES, J. *Encyclopedia of chromatography*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2010**, 2263-2265.
67. SHI J.; KASSAMA L. S. Supercritical fluid technology for extraction of bioactive components. SHI, J. *Functional food ingredients and nutraceuticals processing technologies*. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2007**.
68. POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of natural antioxidants. POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. *Antioxidants in food: practical applications*. CRC Press, Woodhead publishing limited, Boca Ratón, EE. UU. **2001**.
69. MODEY, W.K.; MULHOLLAND D.A.; RAINOR, M.W. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Anal.* **1996**, 7, 1-15.
70. LEE, Y.; LEE, Y. Flavor and aroma substances. LIADAKIS G.; TZIA C. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Marcel Dekker, Inc., Boca Ratón, EE. UU. **2003**.
71. RIVEROL, C.; COONEY, J. Assessing control strategies for the supercritical extraction from coffee beans: process-based control versus proportional integral derivative. *J. Food Process Eng.* **2005**, 28, 494–505.
72. PEKER, H.; SRINIVASAN, M.; SMITH, J.; MCCOY B. Caffeine extraction rates from supercritical carbon coffee beans with dioxide. *AIChE J.* **1992**, 38, 761-770.
73. ARAÚJO, J.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* **2006**, 101, 1087–1094.

74. RAMOS, E.; VALERO, E.; IBAÑEZ, E.; REGLERO, G.; TABERA, J. Obtention of a brewed coffee aroma extract by an optimized supercritical CO₂-based process. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4011-4016.
75. 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.
76. MADHAVI, D.; DESHPANDE, S.; SALUNKHE, D. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. Marcel Decker, Inc., New York. **1996**, 41-53, 70-80, 99-103.
77. HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, 16, 33-50.
78. KRINSKY, N. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1992**, 200, 248-254.
79. HEATH, H.B. Source book of flavors. New York. Van Nostrand Reinhold. **1981**.
80. BREZOVÁ, V.; ŠLEBODOVÁ, A.; STAŠKO, A. Coffee as a source of antioxidants: an EPR study. *Food Chem.* **2009**, 114, 859–868.
81. NAIDU, M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S.; SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chem.* **2008**, 107, 377–384.
82. CIORI, M. Antioxidative effect of maillard reaction products in coffee brew. Fogliano, V. Henle, T. *Melanoidins in Food and Health*. European Communities: Luxembourg. **2002**, 3, 159-162.
83. SACCHETTI, G.; DI MATTIA, C.; PITTIA, P.; MASTROCOLA, D. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* **2009**, 90, 74-80.

84. GOMEZ, J.; AMES, J.; LEAKE, D. Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1017-1024.
85. DAGLIA, M.; PEAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Chem.* **2000**, 48, 1449-1454.
86. DAGLIA, M.; RACCHI, M.; PAPEPTTI, A.; LANNI, C; GOVONI, S.; GAZZANI, G. In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1700-1704.
87. NICOLI, M.C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICI, C.R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **1997**, 30, 292-297.
88. SANCHEZ, I.; JIMENEZ, A.; SAURA, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem.* **2005**, 90, 133-139.
89. BORRELLI, R.; VISCONTI, A.; MENNELLA, C.; ANESE, M.; FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6527-6533.
90. SERAFINI, M.; TESTA, M. Redox ingredients for oxidative stress prevention: the unexplored potentiality of coffee. *Clin. Dermatol.* **2009**, 27, 225-229.
91. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.* **1999**, 26, 1231-1237.
92. OZGEN, M.; REESE-NEIL, R.; TULIO, A.; SCHEERENS, J.; MILLER-RAYMOND, A modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing

- antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1151-1157.
93. MUÑOZ, A. Estudio de las especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, trans-anetol o estragol y empleo de fenoles y sus derivados en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas y evaluación de sus actividades biológicas. Tesis doctorado en Química, Universidad Industrial de Santander. **2010**.
94. REVERCHN, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids.* **2006**, 38, 146-166.
95. STAHL, E.; SCHUTZ, E.; MANGOLD, H. Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. *J Agric Food Chem.* **1980**, 28, 1153-1157.
96. PERREN, R.; GEIGER, R.; SCHENKER, S.; ESCHER, F. Recent developments in coffee roasting technology. Disponible en: <http://www.rpnag.ch/downloads/L1%20-%20ASIC%202004%20F407.pdf>. Fecha de consulta 4 de marzo de **2011**.
97. PITTIA, P.; SACCHETTI, G.; MANCINI, L.; VOLTOLINI, SODINI, N.; TROMBA, G.; ZANINI, F. Evaluation of microstructural properties of coffee beans by synchrotron x-ray microtomography: a methodological approach. *J. Food Sci.* **2011**, 76, 222-231.
98. SNYDER, J.; FRIEDRICH, J.; CHRISTIANSON, D. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, 61, 1851-1856.
99. LIST, G.R.; KING, J.W.; DUNFORD, N.T. Supercritical Fluid Extraction in Food Engineering. LIADAKIS, G. AND TZIA, C. *Extraction Optimization in Food Engineering*. CRC Press, Marcel Dekker, Inc., Boca Ratón, EE. UU. **2003**.
100. ALVES, R.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.; FERREIRA, M. Contribution of FA profile obtained by high-resolution GC/chemometric techniques to the authenticity of green and roasted coffee varieties. *JAOCS.* **2003**, 80, 511-517.
101. CONNOR, W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, 171S-175S.

102. FRITSCHÉ, J.; STEINHART, H. Analysis, occurrence, and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Europ. J. Lipid Sci. Technol.* **1998**, 100, 190-210.
103. GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chemosystematic of diterpenoids in green coffee beans. *Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on coffee*, India. **2004**, 292-296
104. SHI, J.; KAKUDA, Y.; AND KASSAMA L. Supercritical fluid technology for extraction of bioactive components. SHI, J. *Functional food ingredients and nutraceuticals processing technologies*, CRC Press LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2006**, 25-26.
105. PEKER, H., SRINIVASAN, M.P., SMITH, J.M., AND MCCOY, B.J., Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide, *AIChE I.* **1992**, 38, 761–770.
106. GOTO, M.; ASKIN, R. SASAKI M. Supercritical fluid extraction in food analysis ÖTLEŞ, S. *Handbook of food analysis instruments*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, EE.UU. **2008**, 18.
107. KOLLING-SPEER, I.; KURZROCK, T.; SPEER, K. Is the GC analysis of cafestol and kahweol a problem?. *Proceedings of the 21st International Scientific Colloquium on coffee*. Montpellier, France. **2006**, 194-196.
108. VALDENEbro, M.; LEÓN-CAMACHO, M.; PABLOS, F.; GONZÁLEZA, A.; MARTÍN, J. Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their sterolic content. *Analyst.* **1999**, 124, 999–1002.
109. KOLLING-SPEER, I.; KURZROCK, T.; SPEER, K. Tocopherols in green coffees harvested in different years. *Proceedings of the 21st International Scientific Colloquium on Coffee*, Montpellier, France. **2006**, 200-203.

110. OGAWA, M.; KAMIYA, C.; IIDA, Y. Contents of tocopherols in coffee beans, coffee infusions and instant coffee. *Journal Japanese Society Food Science Technology*. **1989**, 36, 490-494.
111. AOYAMA, M.; MARUYAMA, T.; KANEMATSU, H.; NIIYA, I.; TSUKAMOTO, M.; TOKAIRIN, S.; MATSUMOTO, T. Studies on the improvement of antioxidant effect of tocopherols. XVII. Synergistic effect of extracted components from coffee beans. *JOCS*. **1988**, 37, 606-612.
112. CHEMPAKAM, B.; BALAJI, S. Star anise. CHEMPAKAN, B.; ZACHARIAH, T. *Chemistry of spices*. Cambridge, CAB International. **2008**, 319-330.
113. BELTRÁN, S.; SANZ, M.; SANTAMARÍA, B.; MURGA, R.; SALAZAR, G. Recovery of antioxidants from grape products by using supercritical fluids and membrane technology. *EJEAFChe*. **2008**, 7, 3270-3278.
114. ROBERTS, J. The sesquiterpenes. Newman, A. *Chemistry of terpenes and terpenoids*. London, Academic Press. **1972**, 88-154.

BIBLIOGRAFÍA

115. ADRIANA, S.; FRANCA, A.; OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, R.; MANCHA, P.; AUGUSTI, R. "A preliminary evaluation of the effect of processing temperature on coffee roasting degree assessment". *J. Food Eng.* **2009**, 92, 345–352.
116. ALVAREZ, A.; RODRIGUEZ, M. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grassas Y aceites.* **2000**, 51, 74–79.
117. ALVES, R.; CASAL, S.; ALVES, M.; OLIVEIRA, M. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chem.* **2009**, 114, 295–299.
118. ALVES, R.; CASAL S.; OLIVEIRA M. Determination of vitamin E in coffee beans by HPLC using a micro-extraction method. *Food Sci. Technol. Int.* **2009**, 15, 51-63.
119. ALVES, R.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.; FERREIRA, M. Contribution of FA profile obtained by high-resolution GC/chemometric techniques to the authenticity of green and roasted coffee varieties. *JAOCS.* **2003**, 80, 511-517.
120. ANNEKATHRIN, K.; SPEER, K. A new component in the lipid fraction of coffee. *Olaj, Szappan, Kozmetika 51. évfolyam 1. Szám.* **2002**, 14-15.
121. AOYAMA, M.; MARUYAMA, T.; KANEMATSU, H.; NIIYA, I.; TSUKAMOTO, M.; TOKAIRIN, S.; MATSUMOTO, T. Studies on the improvement of antioxidant effect of tocopherols. XVII. Synergistic effect of extracted components from coffee beans. *JOCS.* **1988**, 37, 606–612.
122. ARAÚJO, J.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* **2006**, 101, 1087–1094.
123. ASKIN, R.; GOTO, M.; SASAKI, M. Supercritical fluid extraction in food. ÖTLEŞ, S. *Analysis handbook of food analysis instruments.* CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2008**.

124. BAGGENSTOSS, J.; POISSON, L.; KAEGI, R.; PERREN, R.; ESCHER, F. Coffee B
125. BELTRÁN, S.; SANZ, M.; SANTAMARÍA, B.; MURGA, R.; SALAZAR, G. Recovery of antioxidants from grape products by using supercritical fluids and membrane technology. *EJEAFChe.* **2008**, 7, 3270-3278.
126. BIRCH, G.; LINDLEY, M. Developments in food flavours. Elsevier applied Science. New York, **1986**, 1-19, 173-189.
127. BORRELLI, R.; VISCONTI, A.; MENNELLA, C.; ANESE, M.; FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6527-6533.
128. BREZOVÁ, V.; ŠLEBODOVÁ, A.; STAŠKO, A. Coffee as a source of antioxidants: an EPR study. *Food Chem.* **2009**, 114, 859–868.
129. BROGLE, H., Carbon dioxide as a solvent: its properties and applications. *Chem. Ind.* **1982**, 19, 385.
130. BUNKER, C. Supercritical fluid extraction. CAZES, J. *Encyclopedia of chromatography*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2010**, 2263-2265.
131. Café de Colombia: El árbol y el entorno. Disponible en: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno/. Fecha de consulta: 5 de octubre 2010.
132. Café de Colombia, Caficultura Colombiana: Variedades de café sembradas en Colombia. Disponible en: <http://www.federaciondecafeteros.org/static/files/EI%20Caf%C3%A9%20de%20Colombia%20Contexto%20General.pdf>. Fecha de consulta: 3 de octubre **2010**.
133. CADENA, G. Ciencia y Tecnología: Café y Desarrollo. **1995**, 123-128.

134. CALLIGARIS, S.; MUNARI, M.; ARRIGHETTI, G.; BARBA, L. Insights into the physicochemical properties of coffee oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, 111, 1270–1277.
135. CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, V; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40, 1155–1163.
136. CHEMPAKAM, B.; BALAJI, S. Star anise. CHEMPAKAN, B.; ZACHARIAH, T. *Chemistry of spices*. Cambridge, CAB International. **2008**, 319-330.
137. CIORI, M. Antioxidative effect of maillard reaction products in coffee brew. Fogliano, V. Henle, T. *Melanoidins in Food and Health*. European Communities: Luxembourg. **2002**, 3, 159-162.
138. COMBARIZA, M. Y. Estudio comparativo del aroma de 10 marcas comerciales de café colombiano por diferentes métodos de extracción y análisis. Tesis maestría en Química, Universidad Industrial de Santander. **1997**.
139. CONNOR, W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, 171S-175S.
140. DAGLIA, M.; PEAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Chem.* **2000**. 48, 1449-1454.
141. DAGLIA, M.; RACCHI, M.; PAPEPTTI, A.; LANNI, C; GOVONI, S.; GAZZANI, G. In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1700-1704.
142. DE AZEVEDO, A.B.A.; KIECKBUSH, T.G.; TASHIMA, A.K.; MOHAMEDA, R.S.; MAZZAFERA, P.; VIEIRA DE MELO, S.A.B. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *J. of Supercrit. Fluids.* **2008**, 44,186–192.

143. DE OLIVEIRA, A.; CRUZ, P.; EBERLIN, M.; CABRAL, F. Brazilian roasted coffee oil obtained by mechanical expelling: compositional analysis by GC-MS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, 25, 677-682
144. DE ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN M. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *coffea*. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3065-3069.
145. DEL CASTILLO, D.; GORDON, M.; AMES, J. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, 221, 471-447.
146. DOANE-WEIDEMAN T.; LIESCHESKI P.B. Analytical supercritical fluid extraction for food applications. LUTHRIA D. L. *Oil extraction and analysis critical issues and competitive studies*. AOCS press, AOCS publishing. **2004**.
147. DUNFORD, N. T.; KING, J. W.; GARY, R. Supercritical fluid extraction in food engineering. TZIA, C.; LIADAKIS, G. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Boca Ratón, EE. UU. **2003**, 57-60.
148. EGGERS, R.; PIETSCH, A. Tecnology: I roasting. CLARKE, R.; VITZTHUM O. *Coffee recent developments*, Blackwell Science, primera edición, Oxford. **2001**, 90-107.
149. ELOY, R.; CAMPANHA, F.; ESTEVES, L.; PIRES L.; POT D.; MARRACCINI P.; DE TOLEDO, M. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 88–93.
150. FELDMAN J., RYDER W., KUNG J. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17, 733-739.
151. FERRARI, M.; RAVERA, F.; DE ANGELISA, E.; SUGGI, F.; NAVARINI, L. Interfacial properties of coffee oils. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects.* **2010**, article in press.

152. FLAMENT, I.; BESSIÈRE-THOMAS, Y. Coffee Flavor Chemistry. John Wiley and Sons, LTD, Chichester. **2001**, 3-4, 11, 26-29, 12-26, 37-40.
153. FRANCA, S.; MENDONÇA, J.; OLIVEIRA, S. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT*. **2005**, 38, 709–715.
154. FRITSCHÉ, J.; STEINHART, H. Analysis, occurrence, and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **1998**, 100, 190-210.
155. 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.
156. GOMEZ, J.; AMES, J.; LEAKE, D. Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1017-1024.
157. GONZÁLEZ, A.; PABLOS, F.; MARTIN M.; LEÓN-CAMACHO, M.; VALDENEBRO, M. HPLC analysis of tocopherol and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chem.* **2002**, 93-101.
158. GOTO, M.; ASKIN, R. SASAKI M. Supercritical fluid extraction in food analysis ÖTLEŞ, S. *Handbook of food analysis instruments*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, EE.UU. **2008**, 18.
159. GROLLIER, J.; PLESSIS, S. Use of coffee bean oil as a sun filter. United States Patent n° 4,793,990. *US Patent & Trademark Office*. **1988**.
160. GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. Analysis of the content of the diterpenes cafestol y kahweol in coffe brews. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, 35, 547-554.

161. GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chemosystematic of diterpenoids in green coffee beans. *Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on coffee*, India. **2004**, 292-296
162. HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, 16, 33-50.
163. HEATH, H.B. Source book of flavors. New York. Van Nostrand Reinhold. **1981**.
164. HECKERS, H.; GÖBEL, U.; KLEPPEL U. End of the coffee mystery: diterpene alcohols raise serum low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels. *J. Intern. Med.* **1994**, 235, 192–193.
165. HERNÁNDEZ, J.; HEYD, B.; IRLLES, C.; VALDOVINOS, B.; TRYSTRAM, G. Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting. *J. Food Eng.* 2007, 78, 1141-1148.
166. KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER K.; Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1999**, 22, 43–46.
167. KOLLING-SPEER, I.; KURZROCK, T.; SPEER, K. Is the GC analysis of cafestol and kahweol a problem?. *Proceedings of the 21st International Scientific Colloquium on coffee*. Montpellier, France. **2006**, 194-196.
168. KOLLING-SPEER, I.; KURZROCK, T.; SPEER, K. Tocopherols in green coffees harvested in different years. *Proceedings of the 21st International Scientific Colloquium on Coffee*, Montpellier, France. **2006**, 200-203.
169. KONDAMUDI, N.; MOHAPATRA, S.K.; MISRA, M. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 11757-11760.
170. KRINSKY, N. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1992**, 200, 248-254.

171. KURZROCK T.; SPEER K.; Diterpenes and diterpene esters in coffee. *Food Rev. Int.* **2001**, 17, 433-450.
172. KURZROCK, T.; SPEER K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 843-848.
173. LAM, L.; SPARNINS, V.; WATTENBERG L. Isolation and identification of kahweol, palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione-S-transferase activity in the mouse. *Cancer Res.* **1982**, 42, 1193-1198.
174. LEE, Y.; LEE, Y. Flavor and aroma substances. LIADAKIS G.; TZIA C. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Marcel Dekker, Inc., Boca Ratón, EE. UU. **2003**.
175. LERCKER, G.; FREGA N.; BOCCI; E.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. *Chromatographia.* **1995**, 41, 29-33.
176. LIST, G.R.; KING, J.W.; DUNFORD, N.T. Supercritical Fluid Extraction in Food Engineering. LIADAKIS, G. AND TZIA, C. *Extraction Optimization in Food Engineering*. CRC Press, Marcel Dekker, Inc., Boca Ratón, EE. UU. **2003**.
177. LÓPEZ, E. Extracting oil from coffee. *Revista ingeniería e investigación.* **2007**, 27, 25-31.
178. MADHAVI, D.; DESHPANDE, S.; SALUNKHE, D. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. Marcel Decker, Inc., New York. **1996**, 41-53, 70-80, 99-103.
179. MASTEN, S. Toxicological summary for cafestol and kahweol. *Review of Toxicological Literature.* **1999**, 1-39.
180. MODEY, W.K.; MULHOLLAND D.A.; RAINOR, M.W. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Anal.* **1996**, 7, 1-15.

181. MOTTRAM, D.; LOW M.; ELMORE, J. The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods. ALEXANDER, J.; SKOG, K. *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*. CRC Press LLC, Boca Ratón EE.UU. **2006**.
182. MUÑOZ, A. Estudio de las especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, trans-anetol o estragol y empleo de fenoles y sus derivados en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas y evaluación de sus actividades biológicas. Tesis doctorado en Química, Universidad Industrial de Santander. **2010**.
183. NAIDU, M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S.; SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chem.* **2008**, 107, 377–384.
184. NICOLI, M. C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICI, C.R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **1997**, 30, 292–297.
185. OGAWA, M.; KAMIYA, C.; IIDA, Y. Contents of tocopherols in coffee beans, coffee infusions and instant coffee. *Journal Japanese Society Food Science Technology.* **1989**, 36, 490-494.
186. OLIVEIRA L.; FRANCA A.; CAMARGOS R.; FERRAZ V. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Biores. Technol.* **2008**, 99, 3244–3250.
187. OZGEN, M.; REESE-NEIL, R.; TULIO, A.; SCHEERENS, J.; MILLER-RAYMOND, A modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1151-1157.
188. PELLE, E. Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis. United States Patent n° 5,855,897. *US Patent & Trademark Office.* **1999**.

189. PEKER, H., SRINIVASAN, M.P., SMITH, J.M., AND MCCOY, B.J., Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide, *AIChE J.* **1992**, 38, 761–770.
190. PERREN, R.; GEIGER, R.; SCHENKER, S.; ESCHER, F. Recent developments in coffee roasting technology. Disponible en: <http://www.rpnag.ch/downloads/L1%20-%20ASIC%202004%20F407.pdf>. Fecha de consulta 4 de marzo de **2011**.
191. PITTIA, P.; DALLA, M.; LERICI, C. Textural changes of coffee beans as affected by roasting conditions. *Lebensm. Wiss u. Technol.* **2001**, 34, 167-175.
192. PITTIA, P.; SACCHETTI, G.; MANCINI, L.; VOLTOLINI, SODINI, N.; TROMBA, G.; ZANINI, F. Evaluation of microstructural properties of coffee beans by synchrotron x-ray microtomography: a methodological approach. *J. Food Sci.* **2011**, 76, 222-231.
193. POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of natural antioxidants. POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. *Antioxidants in food: practical applications*. CRC Press, Woodhead publishing limited, Boca Ratón, EE. UU. **2001**.
194. RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Coffee: a perspective on processing and products. RAMASWAMY, H.; RAGHAVAN, G.; CHAKRAVERTY, A.; MUJUMDAR, A. *Handbook of postharvest tecnology: cereals, fruits, vegetables, tea and spices*. CRC Press LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2003**, 697-699.
195. RAMOS, E.; VALERO, E.; IBAÑEZ, E.; REGLERO, G.; TABERA, J. Obtention of a brewed coffee aroma extract by an optimized supercritical CO₂-based process. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4011-4016.
196. RATNAYAKE, W.; HOLLYWOOD, R.; O'GRADY, E.; STAVRIC, B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, 31, 263-269.

197. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **1999**, 26, 1231-1237.
198. REINECCIUS G.; HEATH H.B. Flavor chemistry and technology. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón EE.UU. **2006**, 103-107.
199. REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids*. **2006**, 38, 146–166.
200. RIVEROL, C.; COONEY, J. Assessing control strategies for the supercritical extraction from coffee beans: process-based control versus proportional integral derivative. *J. Food Process Eng.* **2005**, 28, 494–505.
201. ROBERTS, J. The sesquiterpenes. Newman, A. Chemistry of terpenes and terpenoids. London, Academic Press. **1972**, 88-154.
202. SACCHETTI, G.; DI MATTIA, C.; PITTIA, P.; MASTROCOLA, D. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* **2009**, 90, 74-80.
203. SANCHEZ, I.; JIMENEZ, A.; SAURA, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem.* **2005**, 90, 133–139.
204. SARRAZIN, C.; QUÉRÉ, J.; GRETSCH, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. *Food Chem.* **2000**, 70, 99-106.
205. SCHWARTZBERG, H. Modeling bean heating during batch roasting of coffee beans. WELTI-CHANES, J.; BARBOSA-CÁNOVAS, V.; AGUILERA J. *Engineering and Food for the 21st Century*. CRC Press LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2002**, 871-873.

206. SERAFINI, M.; TESTA, M. Redox ingredients for oxidative stress prevention: the unexplored potentiality of coffee. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 225-229.
207. SHI J.; ZHOU, X. Solubility of food components and product recovery in the supercritical fluid separation process. *Functional food ingredients and nutraceuticals processing technologies*. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2007**. 25-26, 48-51.
208. SHI J.; KASSAMA L. S. Supercritical fluid technology for extraction of bioactive components. SHI, J. *Functional food ingredients and nutraceuticals processing technologies*. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Ratón, EE. UU. **2007**.
209. SHIBAMOTO, T. An overview of coffee aroma and flavor chemistry. *Quartozieme Colloque Scientifique International sur le Café.* **1991**, 107–116.
210. SNYDER, J.; FRIEDRICH, J.; CHRISTIANSON, D. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1851–1856.
211. SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. Lipids. CLARKE, R.; VITZTHUM O. *Coffee recent developments*, Blackwell Science, primera edición, Oxford. **2001**, 33-38.
212. SPEER, K.; KÖLLING-SPEER I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, *18*, 201-216.
213. SPILLER, G. The coffee plant and its processing. ALTON, M. *Caffeine*. CRC Press, Boca Ratón, EE. UU. **1998**, 12,80-82.
214. SPILLER, G. The chemical components of coffee. ALTON, M. *Caffeine* CRC Press, Boca Ratón, EE. UU. **1998**, 38-44.
215. STAHL, E.; SCHUTZ, E.; MANGOLD, H. Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. *J Agric Food Chem.* **1980**, *28*, 1153-1157.

216. Tostado y molido del café. Disponible en: www.infoagro.net/shared/docs/a5/gtecnol3.pdf. Fecha de consulta 11 febrero **2010**.
217. TVERDAL, A.; STENSVOLD, I.; SOLVOLL, K.; FOSS, O.; LUND-LARSEN, P.; BJARTVEIT K. Coffee consumption and death from coronary heart disease in middle aged Norwegian men and women. *Br. Med. J.* **1990**, 300, 566–569.
218. URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN M. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2167-2172.
219. URIBE, A. Brown gold: the amazing story of coffee. Random House, New York. **1954**, 105
220. VALDENE BRO, M.; LEÓN-CAMACHO, M.; PABLO F.; GONZÁLEZA A.; MARTÍN M. Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their sterolic content. *Analyst.* **1999**, 124, 999–1002.
221. Variedades de café: Estilos de Tostión. Disponible en: http://www.colombia.com/gastronomia/especiales/especial_4/variedades.asp. Fecha de consulta 5 de octubre **2010**.
222. WAGNER, R.; WILLIAM H. H.; ROTHKIRCH VON, C. Historia del Café de Guatemala. Asociación Nacional del Café (Guatemala), Villegas Asociados. **2003**, 22.