



Universitat de Lleida

TRABAJO FINAL DE GRADO



ESCOLA
POLITÈCNICA SUPERIOR
UNIVERSITAT DE LLEIDA
INSPIRING THE FUTURE

Estudiante: Leonardo Dos Santos Lopes

Titulación: Ingeniería Química

Título de Trabajo Final de Grado: Extracción de ácido clorogénico y cafeína a partir de posos de café

Director/a: Dra. Rita Puig Vidal, Dra. Maria Rosa Cantero Gómez

Mes: Septiembre

Año: 2021

Resumen

El café es la segunda materia prima más comercializada a nivel mundial después del petróleo y la segunda bebida más consumida después del agua. Como consecuencia de tal importancia en el mundo, la industria del café genera cantidades elevadas de residuos, los más relevantes son los posos de café y la piel de plata del café.

Se estima que la industria cafetera genera unos 2 mil millones de toneladas de residuos provenientes del procesamiento del fruto del café (cereza), del tueste y de la preparación de la bebida (posos de café).

Los posos de café, aunque presentes en numerosos estudios de obtención de productos de valor añadido y muy ricos en compuestos fenólicos, hidratos de carbono, proteínas y aceites naturales, no son utilizados de forma consistente y efectiva como materia prima en otros procesos industriales.

En este sentido, este proyecto pretende comparar distintos métodos de extracción de fácil aplicación de productos de valor añadido, en específico, los ácidos clorogénicos y la cafeína. Para ello, se realizaron 4 tipos de extracción distintas, todas durante 1 minuto:

- Extracción mediante solventes supramoleculares (concretamente una mezcla de agua, etanol y hexanol);
- Extracción con agua;
- Extracción con agua asistida por ultrasonido a temperatura ambiente;
- Extracción con agua asistida por ultrasonido a 50 °C.

Los resultados muestran que la extracción con agua y ultrasonidos a temperatura ambiente es la que conduce a mejores resultados, obteniendo 1,154 mg de ácido clorogénico por gramo de poso de café y 0,972 mg de cafeína por gramo de poso de café en 1 minuto de extracción.

Abstract

Coffee is the second most commercialized raw material worldwide after petroleum (crude oil), and the second most consumed beverage after water. Due to its importance, the coffee industry generates high amounts of waste, the most relevant of which are spent coffee grounds (SCG) and silver skin of coffee.

It is estimated that the coffee industry produces about 2 billion tons of waste from the processing of coffee fruit (cherry), roasting and the preparation of the beverage (spent coffee grounds).

Spent coffee grounds, although present in many studies to obtain value-added products and very rich in phenolic compounds, carbohydrates, proteins and natural oils, are not used consistently and effectively as raw material in other industrial processes.

In this sense, this project aims to compare different easy-to-apply extraction methods for value-added products, specifically chlorogenic acids and caffeine. For this, 4 different types of extraction have been carried out, all during 1 minute:

- Extraction using supramolecular solvents (specifically a mixture of water, ethanol and hexanol);
- Extraction with water;
- Extraction with water assisted by ultrasound at room temperature;
- Extraction with water assisted by ultrasound at 50 °C.

The results show the extraction with water assisted by ultrasound at room temperature leads to the best results, obtaining 1.154 mg of chlorogenic acid per gram of spent coffee grounds and 0.972 mg of caffeine per gram of spent coffee grounds in 1 minute of extraction.

Índice

Resumen	2
Abstract	3
Objetivo	10
1. Introducción	11
2. Productos bioactivos del poso de café	14
2.1 Hidratos de carbono.....	14
2.2 Lignina	16
2.3 Lípidos	17
2.4 Proteínas	18
2.5 Compuestos fenólicos	18
2.5.1 Ácidos fenólicos.....	20
2.5.1.1 Ácidos hidroxicinámicos.....	20
2.5.1.1.1 Ácidos clorogénicos.....	21
2.5.1.1.2 Ácidos hidroxibenzoicos.....	21
2.5.1.2.1 Taninos	21
2.6 Cafeína.....	23
2.7 Aplicaciones de los compuestos fenólicos y de la cafeína	23
3. Revisión bibliográfica de los métodos de extracción para los posos de café	25
3.1 Extracción sólido-líquido	26
3.2 Extracción por ultrasonido	27
3.3 Extracción con solventes SUPRAS	28
4. Método de cuantificación por HPLC	30
5. Parte experimental	32
5.1 Materiales y métodos	32
5.1.1 Materiales y reactivos	32
5.1.2 Método de extracción vórtex con SUPRAS	33

5.1.3 Método de extracción vórtex con agua	35
5.1.4 Método de extracción con ultrasonido.....	36
5.1.5. Cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector de ultravioleta/visible (UV/Vis)	37
5.2. Optimización de las condiciones de trabajo – HPLC y patrones	37
5.2.1. Condiciones para la fase móvil.....	37
5.2.2. Rectas de calibración de la cafeína y del ácido clorogénico	40
5.2.3. Estabilidad de patrones.....	44
5.3. Extracción con SUPRAS – dopaje con ácido clorogénico	47
5.4. Extracción con AGUA – dopaje con ácido clorogénico.....	50
5.5. Resultados de extracción con “SUPRAS” - vórtex	53
5.6. Resultados de extracción con AGUA – vórtex.....	55
5.7. Resultados de extracción con AGUA – ultrasonido.....	58
5.8. Comparación de los distintos métodos de extracción ensayados	62
5.9. Resultados de las recuperaciones de ácido clorogénico en la fase “SUPRA”	66
6. Conclusiones	69
7. Agradecimientos.....	71
8. Bibliografía.....	72

Índice de figuras

Ilustración 1 – Anatomía de la fruta y de la semilla del café.	12
Ilustración 2 - Proceso de fabricación del café.	13
Ilustración 3 - Principales monosacáridos de la hemicelulosa.	15
Ilustración 4 - Ejemplo de la estructura química de la celulosa.	16
Ilustración 5 - Estructura química de la lignina.	17
Ilustración 6 - Derivados de los ácidos benzoico y cinámico.	20
Ilustración 7 - Principales tipos de ácidos hidroxicinámicos.	20
Ilustración 8 - Formación de la quinolactona durante el proceso de torrefacción del grano del café.	21
Ilustración 9 – Estructuras químicas de los galotaninos y de los elagitaninos.	22
Ilustración 10 - Estructura química de los taninos condensados.	22
Ilustración 11 - Metilxantinas presentes en el café.	23
Ilustración 12 - Principio de la extracción sólido-líquido.	27
Ilustración 13 - Principio de la extracción con ultrasonido.	28
Ilustración 14 - Tipos de micelas según el factor de empaquetamiento.	29
Ilustración 15 - Principio de la extracción con solventes SUPRAS.	29
Ilustración 16 - Componentes básicos de un sistema HPLC.	31
Ilustración 17 - Medida de la altura de la fase superior en extracciones con SUPRAS y con AGUA.	34
Ilustración 18 - Esquema del procedimiento de extracción con SUPRAS.	35
Ilustración 19 - Esquema del procedimiento de extracción con AGUA.	35
Ilustración 20 - Esquema del procedimiento de extracción por ULTRASONIDO.	36
Ilustración 21 - Cromatograma con la fase móvil inicial.	38
Ilustración 22 - Cromatograma con la segunda fase móvil probada.	38
Ilustración 23 - Cromatograma con la fase móvil óptima.	39
Ilustración 24 - Superposición de los cromatogramas resultantes de las tres fases móviles probadas.	40
Ilustración 25 - Recta de calibración del ácido clorogénico.	41
Ilustración 26 - Espectro ultravioleta del ácido clorogénico a 278 nm.	41
Ilustración 27 - Superposición de los cromatogramas de los patrones de la recta de calibración del ácido clorogénico.	42
Ilustración 28 - Recta de calibración de la cafeína y su ecuación de la recta.	43
Ilustración 29 - Espectro ultravioleta de la cafeína a 278 nm.	43

Ilustración 30 - Superposición de los cromatogramas de los patrones de la recta de calibración de la cafeína.....	44
Ilustración 31 - Comparación de las inyecciones del patrón de 1 ppm del ácido clorogénico.....	45
Ilustración 32 - Comparación de las inyecciones del patrón de 100 ppm del ácido clorogénico.....	45
Ilustración 33 - Comparación de las inyecciones del patrón de 100 ppm de la cafeína.....	46
Ilustración 34 - Comparación de las inyecciones del patrón de 600 ppm de la cafeína.....	47
Ilustración 35 - Procedimiento de una extracción con SUPRAS con dopaje.....	48
Ilustración 36 - Procedimiento de extracción convencional con SUPRAS sin dopaje.....	48
Ilustración 37 - Identificación de los picos del ácido clorogénico en las extracciones con SUPRAS.....	49
Ilustración 38 - Superposición de los cromatogramas de una muestra dopada y no dopada.....	50
Ilustración 39 - Procedimiento de una extracción con AGUA y con dopaje.....	51
Ilustración 40 - Procedimiento de extracción convencional con AGUA sin dopaje.....	51
Ilustración 41 - Identificación de los picos del ácido clorogénico en las extracciones con AGUA.....	52
Ilustración 42 - Superposición de los cromatogramas de una muestra dopada y no dopada.....	52
Ilustración 43 - Comparación entre los métodos de extracción en función de la concentración.....	64
Ilustración 44 - Comparación entre los métodos de extracción en función de la masa.....	64
Ilustración 45 - Procedimiento de preparación de las recuperaciones del ácido clorogénico.....	66
Ilustración 46 - Concentración de las extracciones del ácido clorogénico y de la cafeína en las fases inferior y superior.....	67
Ilustración 47 - Masa extraída en las extracciones del ácido clorogénico y de la cafeína en las fases inferior y superior.....	68

Índice de tablas

Tabla 1 - Principales componentes del poso de café.	14
Tabla 2 - Clasificación de los polifenoles según el número de grupos fenólicos y enlaces de carbono.	19
Tabla 3 - Métodos de extracción de los posos de café encontrados en la bibliografía.	25
Tabla 4 - Materiales y reactivos utilizados en los experimentos.	33
Tabla 5 - Fase móvil inicial en elución isocrática.....	37
Tabla 6 - Segunda fase móvil en elución gradiente.....	38
Tabla 7 - Fase móvil óptima en elución gradiente.	39
Tabla 8 - Resultados de la recta de calibración del ácido clorogénico.....	41
Tabla 9 - Resultados de la recta de calibración de la cafeína.....	42
Tabla 10 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón de ácido clorogénico 1 ppm.	44
Tabla 11 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón del ácido clorogénico 100 ppm.	45
Tabla 12 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón de la cafeína 100 ppm.	46
Tabla 13 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón de la cafeína 600 ppm.	47
Tabla 14 – Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de una extracción con SUPRA sin dopaje.	49
Tabla 15 – Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de una extracción con SUPRA con dopaje.	49
Tabla 16 – Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de las extracciones con AGUA sin dopaje.	51
Tabla 17 - Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de una extracción con AGUA con dopaje.	52
Tabla 18 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con SUPRAS (vórtex).	54
Tabla 19 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con SUPRAS (vórtex).....	54
Tabla 20 - Resultados de las extracciones de la cafeína con SUPRAS (vórtex).	55
Tabla 21 - Resultados medios de las extracciones de la cafeína con SUPRAS (vórtex).....	55
Tabla 22 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con AGUA (vórtex).	56
Tabla 23 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con AGUA (vórtex).....	56
Tabla 24 - Resultados de las extracciones de la cafeína con AGUA (vórtex).	57
Tabla 25 – Resultados medios de las extracciones de la cafeína con AGUA (vórtex).	57

Tabla 26 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (temperatura ambiente).....	58
Tabla 27 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (temperatura ambiente).....	59
Tabla 28 - Resultados de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (temperatura ambiente).....	59
Tabla 29 - Resultados medios de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (temperatura ambiente).....	60
Tabla 30 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (50 °C).....	60
Tabla 31 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (50 °C).....	61
Tabla 32 - Resultados de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (50 °C).....	61
Tabla 33 - Resultados medios de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (50 °C).....	62
Tabla 34 - Resumen de los resultados de las extracciones del ácido clorogénico y de la cafeína.....	63
Tabla 35 - Resultados de los tiempos de retención y del área de las recuperaciones del ácido clorogénico.....	66
Tabla 36 - Resultados de las extracciones con los solventes SUPRAS - fases inferior y superior.	67

Objetivo

El objetivo general del presente proyecto es evaluar, comparar y mejorar la extracción del ácido clorogénico y de cafeína del poso de café. Se estudia el método de extracción con solventes supramoleculares (SUPRAS) y se compara con otros métodos de extracción rápidos, sencillos y responsables con el medio ambiente.

Por lo tanto, los métodos de extracción utilizados deberán ser de fácil aplicación a nivel instrumental, eficientes, económicamente viables y deben emplear solventes no tóxicos. Para cumplir este objetivo, se realizará la cuantificación de los analitos obtenidos a partir de los distintos métodos de extracción empleados, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1. Introducción

El café tal y como se conoce cotidianamente, es una bebida obtenida mediante la infusión del grano tostado y molido proveniente del cafeto. Se denomina cafeto al arbusto del café que pertenece al género *Coffea*, dentro de la familia de las Rubiáceas que comprende unos 500 géneros y más de 6 000 especies.[1]

Son especies tropicales y su cultivo abarca una franja delimitada entre los Trópicos de Capricornio y Cáncer. Los cinco principales productores de café son: Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y República Democrática del Congo.[2]

De todas las especies existentes las más cultivadas a nivel mundial son la *Coffea arábica* (café Arábica) y la *Coffea canephora* (café Robusta). Debido a sus características organolépticas y propiedades estimulantes, la infusión del café es una de las bebidas más apreciadas y consumidas en el mundo. Los principales compuestos presentes en la infusión del café Arábica son:

- Polisacáridos (24-29%);
- Lípidos (14,5 – 20%);
- Proteínas (13 – 15%);
- Minerales (3,5 -4,0%);
- Cafeína (1,0%);
- Ácidos clorogénicos (1,20 – 2,30%).[3]

Según el informe de enero de 2021 de la Organización Internacional del Café, en el año de 2020, fueron producidos 101 896 sacos de 60 kg de café Arábica y 70 021 sacos de 60 kg de café Robusta. De los cuales, casi el 50% fueron producidos en Sudamérica.[2] Básicamente el café es comercializado de las siguientes formas:[4]

- Verde (grano del café sin tostar);
- En grano (tostado);
- Molido;
- Soluble;
- En cápsulas.

El fruto del café se compone de las siguientes partes (ver **Ilustración 1**):

- Piel exterior (pericarpio);
- Pulpa (mesocarpio);
- Pergamino (endocarpio);
- Película plateada;
- Semilla o grano;
- Embrión.

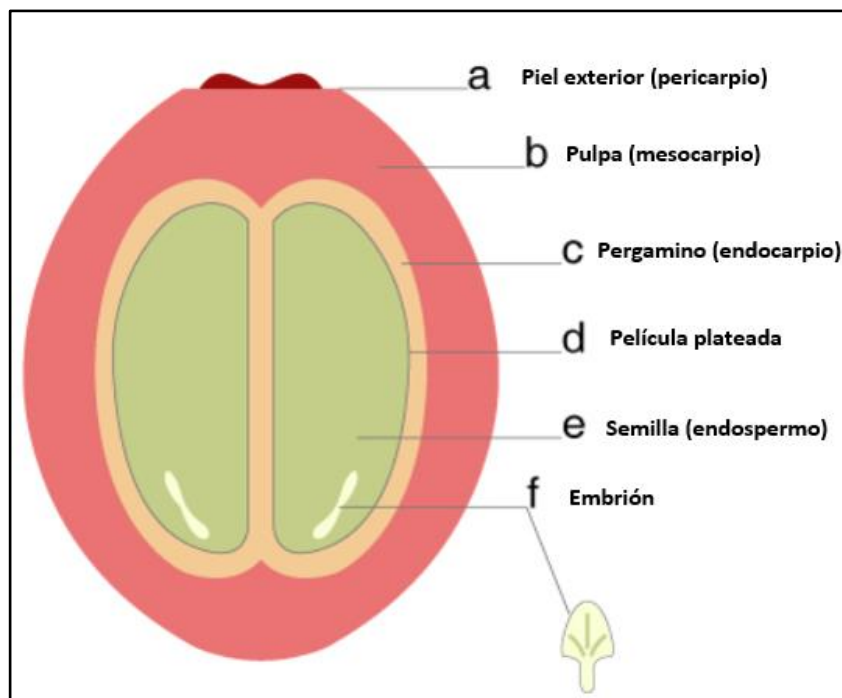


Ilustración 1 – Anatomía de la fruta y de la semilla del café.

[5]

El proceso de fabricación del café tostado consiste en la conversión del fruto del café verde en granos tostados, que posteriormente pueden ser molidos o no; para su uso en la preparación de infusiones. A continuación, en la **Ilustración 2** se presentarán los procesos y operaciones básicos de la producción del café.

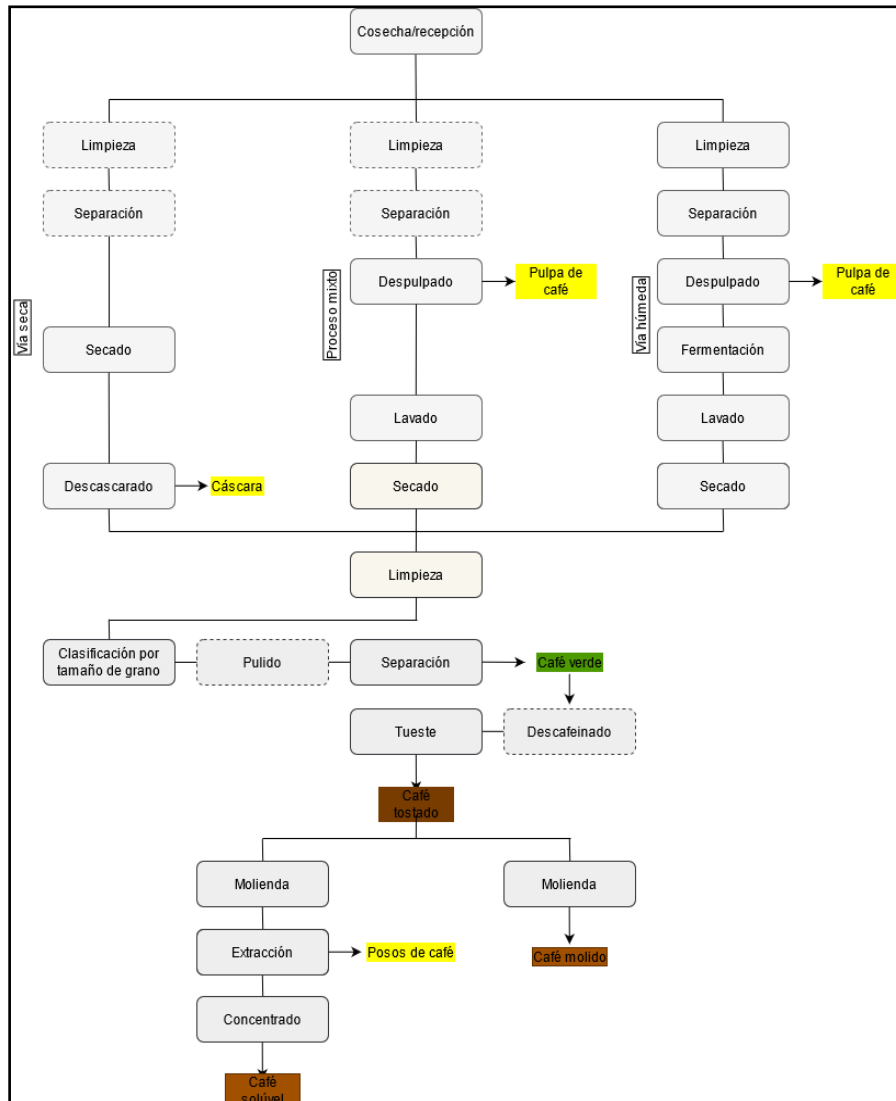


Ilustración 2 - Proceso de fabricación del café.

[6]

Es importante destacar que el presente proyecto tratará del estudio de la extracción de productos de valor añadido del poso de café obtenido en la producción del café molido y no del café soluble. Para cada kilogramo de café molido consumido, se generan 910 gramos de poso de café húmedo.

2. Productos bioactivos del poso de café

El poso o borra de café corresponde al desecho del café tostado y molido después de la preparación de la infusión de la bebida. Los métodos de elaboración de la infusión del café pueden variar, pero el método más tradicional es la percolación con agua caliente. Las máquinas de preparación del café tipo expreso también son muy utilizadas, principalmente en cafeterías. Otro método muy utilizado en los últimos años, son las cápsulas de café. En la **Tabla 1**, se presentan los principales componentes del poso de café molido:

Compuesto	Composición (% p/p)
Celulosa	32 - 42
Hemicelulosa	7 - 13
Lignina	0 - 26
Lípidos	2 - 24
Proteínas	10 - 18
Cafeína	0 - 0,4
Ácidos clorogénicos	1 - 3
Fibras alimentarias	21 - 59

Tabla 1 - Principales componentes del poso de café.

[7]

2.1 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son las biomoléculas más abundantes en el planeta y están compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Son predominantemente, polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas cíclicos o también sustancias que forman tales compuestos por hidrólisis. Muchos de los hidratos poseen la fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$ y también pueden contener átomos de nitrógeno, fósforo o azufre. Están clasificados en tres clases principales según su tamaño:

- **Monosacáridos:** consisten en una única unidad de polihidroxialdehído o polihidroxicetona, el monosacárido más común en la naturaleza es la D-glucosa (dextrosa);
- **Oligosacáridos:** representan los hidratos de carbono formados por la condensación de dos o más unidades de monosacáridos, en general cadenas cortas hasta 20 unidades. Los más abundantes son los disacáridos, compuestos que están formados por dos moléculas de monosacáridos, como, por ejemplo, la sacarosa, que está formada por una unidad de D-glucosa y D-fructosa;

- **Polisacàridos:** este grupo comprende las moléculas formadas por más de 20 unidades de monosacáridos, pueden ser lineales como la celulosa o también ramificadas como el glucógeno.[8]

En los posos de café, los compuestos más abundantes presentes en su composición son los hidratos de carbono, representados por la celulosa y la hemicelulosa, que corresponden aproximadamente a un 52% del peso seco del poso de café.[9]

La hemicelulosa es un heteropolisacárido ramificado formado por unidades distintas de monosacáridos (ver **Ilustración 3**), de los cuales, los más importantes son:[10][9]

- La manosa – 37%;
- La galactosa – 32%;
- La glucosa – 24%;
- La arabinosa – 7%.

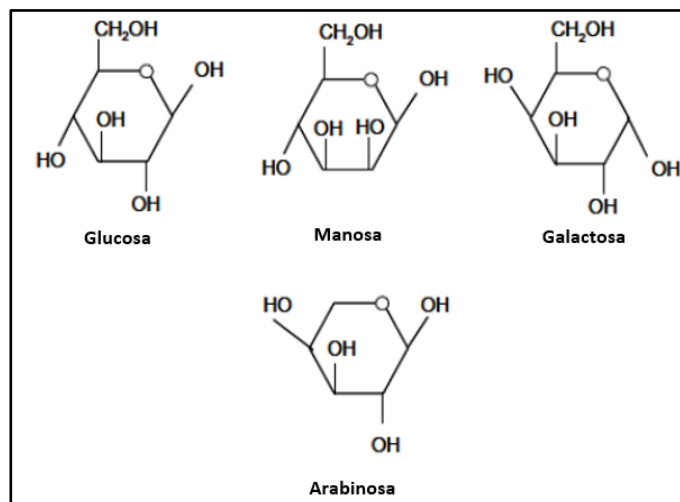
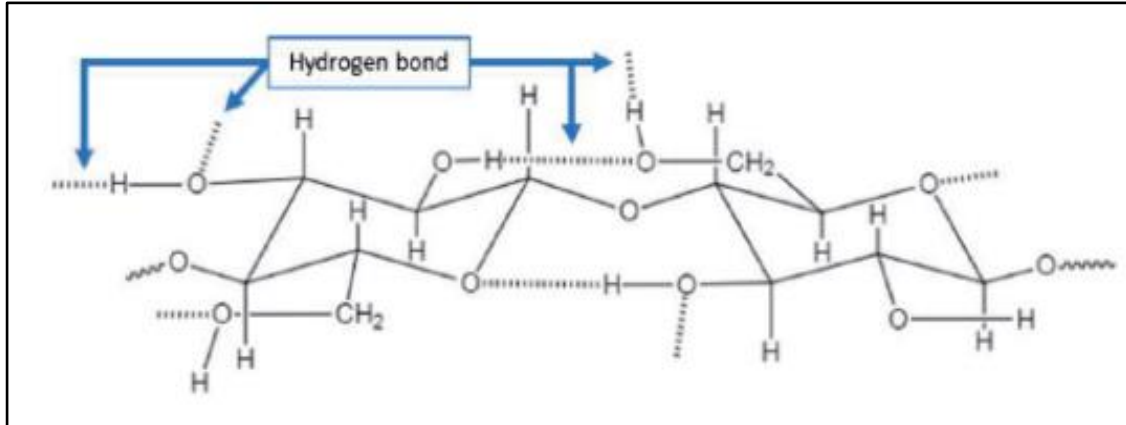


Ilustración 3 - Principales monosacáridos de la hemicelulosa.

[10]

La celulosa es un homopolisacárido lineal formado por unidades de glucosa mediante a enlaces glucosídicos del tipo β , que favorecen la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas vecinas de celulosa y que explican la linealidad y resistencia frente a ataques químicos de la celulosa.[10] En la **Ilustración 4** se muestra la estructura de la celulosa.



Il·lustració 4 - Ejemplo de la estructura química de la celulosa.

[11]

2.2 Lignina

Debido a su alto grado de complejidad y sus múltiples unidades estructurales, así como la fuente de obtención y su método de extracción, no existe una única definición de la molécula de la lignina. La definición más aceptada es la de Brauns, que define la lignina como un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización de unidades de fenilpropano (ver **Ilustración 5**).

Juntamente con la celulosa y la hemicelulosa, es uno de los compuestos más abundantes en los posos de café, en relación a lignina, representa unos 24% del peso seco.[6][10][12]

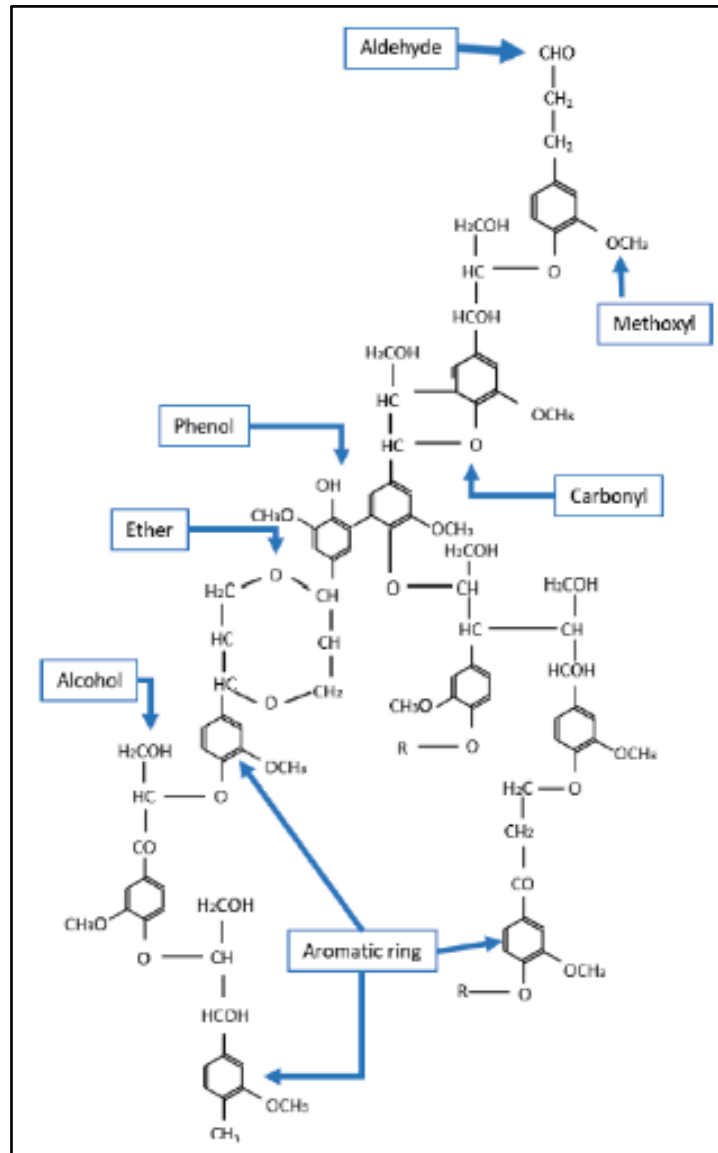


Ilustración 5 - Estructura química de la lignina.

[11]

2.3 Lípidos

Los lípidos consisten en un grupo de moléculas estructural y funcionalmente diverso pero que exhiben una característica común que es la insolubilidad en agua.[8] Se dividen en 5 grandes grupos :[8]

- Triacilgliceroles, triglicéridos o grasas;
- Fosfolípidos;
- Glucolípidos;
- Lípidos éter arqueobacterianos;
- Esteroles.

Según algunos estudios realizados sobre la composición lipídica del poso de café, esta puede variar entre un 7% y 14% del peso del poso de café dependiendo de la especie y del tipo de extracción de la bebida.[13][4][14]

Aproximadamente un 90% del contenido en grasa está compuesto de triglicéridos y lo restante se divide en terpenos, esteroides y tocoferoles.[13]

En el proceso de preparación de la infusión del café, los lípidos no son filtrados y se concentran en el poso de café. Los principales ácidos grasos presentes en los triglicéridos de los posos de café son:[4]

- Ácidos linoleicos;
- Ácidos palmíticos;
- Ácidos esteáricos;
- Ácidos oleicos;
- Ácidos linolénicos.

2.4 Proteínas

Las proteínas son polímeros resultantes de la deshidratación de aminoácidos y de la unión de los mismos, mediante un tipo específico de enlace covalente denominado enlace peptídico. Los posos de café contienen valores significativos de proteínas presentes en su composición, que pueden llegar hasta un 14% del peso total del mismo.[14]

Aunque la información sobre la caracterización de los aminoácidos en los posos de café es algo muy limitado, según Lago et al., 2001, los principales aminoácidos encontrados en los posos de café fueron la isoleucina, leucina, valina y fenilalanina.

El contenido de proteína puede ser sobrevalorado debido a la presencia de otros compuestos nitrogenados en los posos de café, como, por ejemplo, la cafeína, la trigonelina, aminas libres y aminoácidos libres.[14]

2.5 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles comprenden un amplio grupo de sustancias químicas presentes en el reino vegetal con diferentes estructuras químicas que engloban a más de 8 000 compuestos distintos. [15]

Dentro de este grupo de compuestos químicos, están presentes desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta macromoléculas complejas como los taninos condensados y la lignina.[16] Se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol presentes en la molécula y según los elementos estructurales que unen los mismos, como se puede ver en la **Tabla 2**.

Clasificación	Estructura de acuerdo al número de grupos fenólicos (C ₆) y enlaces carbono (C _n)
Fenoles simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁
Ácidos fenilacéticos, acetofenoles	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinámicos, isocumarina	C ₆ -C ₃
Naftoquinona	C ₆ -C ₄
Xantanos	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbeno, antraquinona	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides, isoflavonas	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanós, neolignanós	(C ₆ -C ₃) ₂
Bioflavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Melanoidinas	(C ₆) _n
Taninos	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Tabla 2 - Clasificación de los polifenoles según el número de grupos fenólicos y enlaces de carbono.

[17]

El poso de café es una fuente de obtención de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que pueden ser utilizados como suplementos alimenticios en la industria alimentaria, cosmética y también como aditivos químicos. Muchas literaturas técnicas, así como artículos científicos han tratado de identificar los compuestos fenólicos presentes en los desechos de la preparación del café, se destacan los siguientes:[18] [19]

- Ácidos clorogénicos;
- Catequinas;
- Galocatequinas;
- Ácidos quebúlicos;
- Epigalotequina 3-galato;
- Ácidos gálicos;
- Ácido p-hidroxibenzoicos.

2.5.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se dividen en dos clases (ver **Ilustración 6**): los derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos de estructuras complejas tales como los taninos hidrolizables y los taninos condensados. Los ácidos hidroxicinámicos consisten principalmente en: ácidos clorogénicos, p-cumárico, ferúlico, cafeico y sinápico.[17]

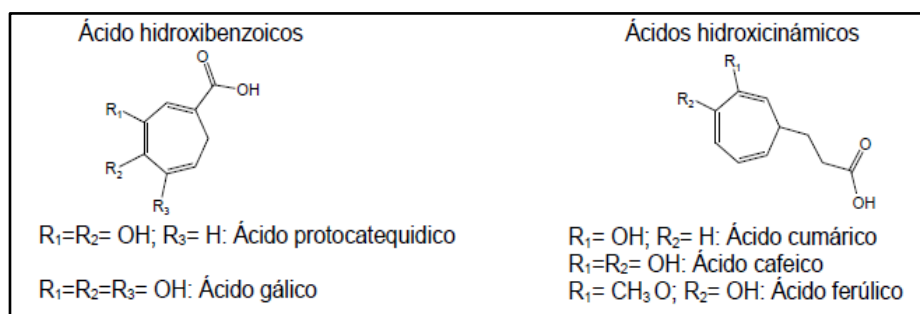


Ilustración 6 - Derivados de los ácidos benzoico y cinámico.

[17]

2.5.1.1 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos presentes en la pared celular vegetal que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático cuyos principales representantes son: el clorogénico, ferúlico, p-cumárico, cafeico y sinápico.[20] En la **Ilustración 7** se indican los principales tipos de ácidos hidroxicinámicos.

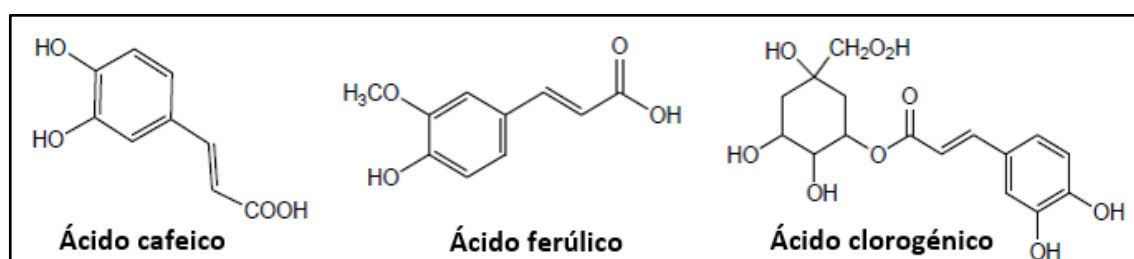


Ilustración 7 - Principales tipos de ácidos hidroxicinámicos.

[17]

2.5.1.1.1 Ácidos clorogénicos

El principal componente de la fracción fenólica de los granos de café verde son los ácidos clorogénicos, alcanzando cerca del 14% (materia seca) del peso del grano. Los principales grupos de ácidos clorogénicos encontrados en el café incluyen los ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos, p-cumaroilquínicos y ésteres mixtos del ácido cafeico y ferúlico con ácido quínico.[21]

La molécula del ácido clorogénico presenta inestabilidad térmica y en el proceso de torrefacción de los granos de café puede alcanzar temperaturas entre 188-282 °C, cosa que puede degradarla y convertirla en quinolactona debido a la pérdida de una molécula de agua y formación de un enlace intramolecular (ver **Ilustración 8**).

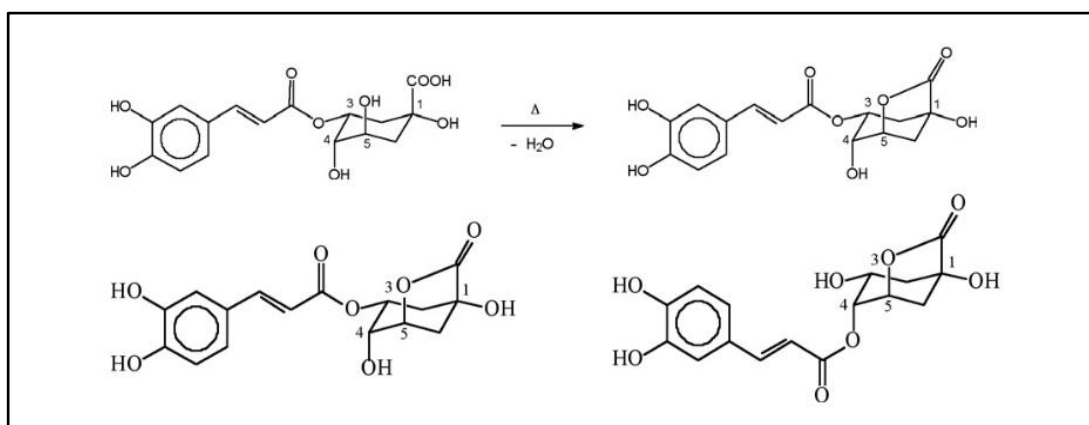


Ilustración 8 - Formación de la quinolactona durante el proceso de torrefacción del grano del café.

2.5.1.2 Ácidos hidroxibenzoicos

Esta clase de ácidos fenólicos se caracteriza por la presencia del grupo $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$ en el remplazo del grupo COOH presente en los ácidos hidroxibenzoicos. Se encuentran libres y ligados como los ésteres de ácido benzoico en muchas especies vegetales y animales. Los principales son el ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecúlico, vanílicico y siríngico.[20]

2.5.1.2.1 Taninos

Los taninos son polímeros polifenólicos naturales presentes en árboles, forrajeros, arbustos, legumbres, frutas, cereales y granos. Poseen alto peso molecular y tienen capacidad de formar complejos, principalmente con proteínas debido a la presencia de un gran número de grupos hidroxilos y fenólicos. Presentan las siguientes características:

- Solubilidad en agua;
- Astringencia;
- Reacción con sales férricas produciendo coloraciones negro azuladas o verdosas;
- Precipitación con gelatina, albúmina y alcaloides en solución.

Se subdividen en dos grupos

- Taninos hidrolizables: se hidrolizan con facilidad por la acción de los ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de monómero, los taninos hidrolizables se dividen en dos grupos (ver **Ilustración 9**):
 - Galotaninos: ácido gálico como monómero;
 - Elagitaninos: ácido elágico como monómero.

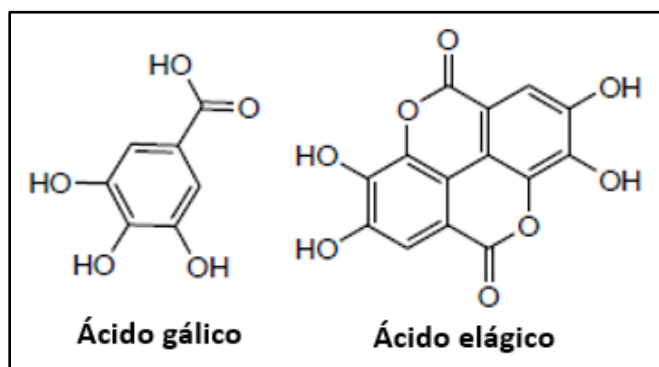


Ilustración 9 – Estructuras químicas de los galotaninos y de los elagitaninos.

- Taninos condensados: también conocidos como proantocianidinas, son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles, catequinas y galocatequinas (ver **Ilustración 10**).

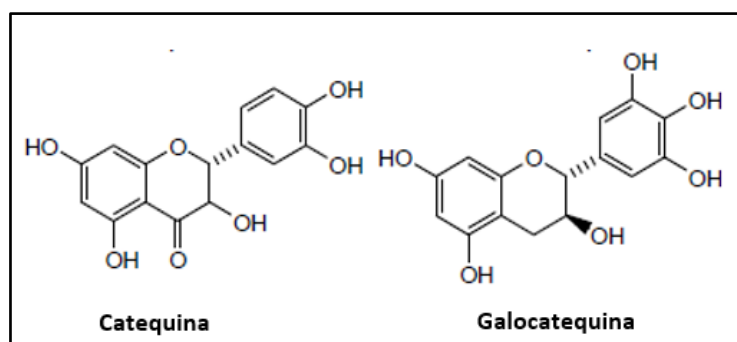


Ilustración 10 - Estructura química de los taninos condensados.

[17]

2.6 Cafeína

La cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) es un alcaloide que pertenece al grupo de las metilxantinas que están presentes en el café, junto con la teofilina y la teobromina (ver **Ilustración 11**). Las metilxantinas son alcaloides estimulantes que actúan en el sistema nervioso central y se encuentran en forma natural en las hojas, semillas y frutos de muchas plantas, como, por ejemplo: hojas de té, chocolate, cacao, guaraná, yerba mate y otras más. [22][23]

Aunque en el proceso de preparación de la infusión del café (extracción sólido-líquido) se extraiga una importante cantidad de cafeína, los posos de café pueden contener cantidades de cafeína que pueden ser de gran interés en aplicaciones industriales.

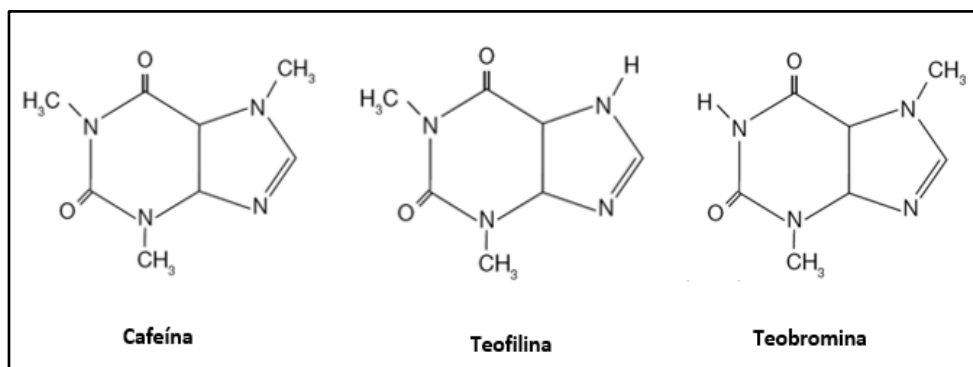


Ilustración 11 - Metilxantinas presentes en el café.

[24]

2.7 Aplicaciones de los compuestos fenólicos y de la cafeína

Los compuestos que presentan propiedades antioxidantes son aquellos que poseen la capacidad de neutralizar radicales libres y evitar o disminuir el daño oxidativo y así prevenir o retardar la aparición de diversas enfermedades de complejo diagnóstico. El deterioro de los tejidos celulares está asociado al daño oxidativo provocado por la acción de radicales libres, en especial, sobre las sustancias lipídicas, ácidos nucleicos y proteínas.[25]

Se entiende por radical libre, toda aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Los radicales libres son altamente reactivos y reaccionan en cadena, presentan rápida propagación con moléculas aledañas y de mayor daño potencial.[26]

En este sentido, los compuestos fenólicos son de extrema importancia para la salud humana porque presentan capacidad de bloquear la producción de radicales libres e inhibir la oxidación y degradación celular. Esta actividad antioxidante, por parte de los compuestos fenólicos, está dada mayoritariamente por mecanismos de óxido reducción.[27]

Es importante tener en cuenta las investigaciones respecto a la acción de los ácidos clorogénicos en el metabolismo de lípidos y glucosa en los desórdenes metabólicos genéticos, y del efecto anti-hipertensivo del ácido ferúlico y ácido cafeico en administraciones orales.[27]

Muchos estudios han señalado una importante actividad microbiana en extractos de café verde y se atribuye dicho efecto debido a la presencia de ácidos clorogénicos. En resumen, las principales aplicaciones de los compuestos fenólicos presentes en los posos de café suelen ser como:

- Antioxidantes naturales;
- Anti-hipertensivos;
- Agentes anti-microbianos.

En relación a la cafeína, que es el alcaloide más importante de las especies de café, esta presenta diversas actividades biológicas como la estimulación del sistema nervioso central, estimulación miocárdica y vasoconstricción periférica.[28]

Algunos estudios sugieren que la cafeína es efectiva en la disminución de peso mediante termogénesis y oxidación de grasa, eficaz en la reducción de los efectos de la radiación ultravioleta y el daño inducido por los radicales libres en la piel y también como adyuvante en el tratamiento de la caída del cabello.[28] En suma, las aplicaciones de la cafeína pueden estar relacionadas a:

- Suplementación deportiva;
- Cosmética (cremas y champús).

3. Revisión bibliográfica de los métodos de extracción para los posos de café

Los métodos de extracción de sustancias químicas de los extractos de posos de café comprenden un campo de estudio bastante variado. Se ha verificado en la búsqueda bibliográfica además de diferentes metodologías de extracción, numerosas modificaciones y adaptaciones de dichos métodos. En relación al tipo de metodología de extracción, se hace una clasificación en dos grupos, estos son:

- Convencional: sólido-líquido, Soxhlet y autohidrólisis;
- No convencional: ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos y subcríticos, enzimáticas y solventes supramoleculares.

En la **Tabla 3** se resumen de forma comparativa los distintos métodos de obtención de ácidos clorogénicos y cafeína a partir del poso de café encontrados en la bibliografía.

Referencia	Tipo de extracción	Solvente	Tiempo	Temperatura	Ratio Solvente/extracto	Resultados
[29]	Autohidrólisis	Agua	50 min	200 °C	15 mL/g	40,36 mg EAG/g
[30]	Sólido/líquido	Etanol 50%	-	Ambiente	5 mL/g	273,34 mg EAG/g
[31]	Sólido/líquido	Etanol 70%	2 h	50 °C	40 mL/g	17,09 mg EAG/g (Expreso)
[31]	Sólido/líquido	Etanol 70%	2 h	50 °C	40 mL/g	19,98 mg EAG/g (Cápsulas)
[32]	Sólido/líquido	Etanol 60%	30 min	60 °C	50 mL/g	28,26 mg EAG/g
[33]	Sólido/líquido	Metanol 60%	90 min	60-65 °C	30 mL/g	16,2 mg EAG/g
[34]	Soxhlet	Etanol	6 h	78 °C	30 mL/g	119 mg EAC/g
[35]	Agua subcrítica	Agua	55 min	177 °C	1L/14,08 g	86,23 mg EAG/g
[36]	Líquida presurizada	Etanol 25-75%	5-20 min	195 °C	-	26,46 mg EAG/g 6,94 mg Caf/g 213,98 mg AC/g
[34]	Ultrasonido	Etanol	2 h	-	30 mL/g	587 mg EAC/g
[37]	Ultrasonido	Etanol 60%	1 h	50 °C	20 mL/g	12,67 mg EAG/g 0,93 mg AC/g
[38]	Asistida con ultrasonido	Etanol	34 min	40 °C	17 mL/g	33,84 mg EAG/g 1,43 mg AC/g
[39]	Microondas	Etanol 20%	40 s	Ambiente	9 mL/g	398,95 mg EAG/g
[40]	Pretratamiento hidrotermal suave	Agua	20 min	120 °C	20 mL/g	32,92 mg EAG/g

Tabla 3 - Métodos de extracción de los posos de café encontrados en la bibliografía.

Los resultados están expresados en diferentes unidades de medida, que son:

- EAG: equivalente de ácido gálico;
- EAC: equivalente de ácidos clorogénicos;
- AC: ácidos clorogénicos.

El objetivo de este proyecto es poder comparar un método novedoso, rápido y sencillo, la extracción con solventes supramoleculares “SUPRAS” (que se explica en el apartado **3.3 Extracción con solventes SUPRAS**), con algunos de los métodos más convencionales, como son la extracción sólido-líquido y la extracción mediante ultrasonidos.

3.1 Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una operación básica de la ingeniería química utilizada en numerosos procesos industriales, como, por ejemplo, en la obtención del aceite de soja. Consiste en una operación de transferencia de masa, donde un solvente o mezcla de estos, extraen selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida.

En este tipo de operación, los componentes que son solubles en el solvente empleado son denominados solutos y la matriz sólida insoluble se denomina “inerte”. El principio de la extracción sólido-líquido se explica en la **Ilustración 12**. Esta técnica también recibe otros nombres, que son:

- Lixiviación;
- Percolación;
- Decocción;
- Elución.

La transferencia de masa se realiza de acuerdo al siguiente orden:

1. Difusión del solvente a través del sólido;
2. Disolución del soluto en el solvente;
3. Transferencia del soluto desde el interior a la superficie y luego hacia la solución como consecuencia del gradiente de la concentración.[41]

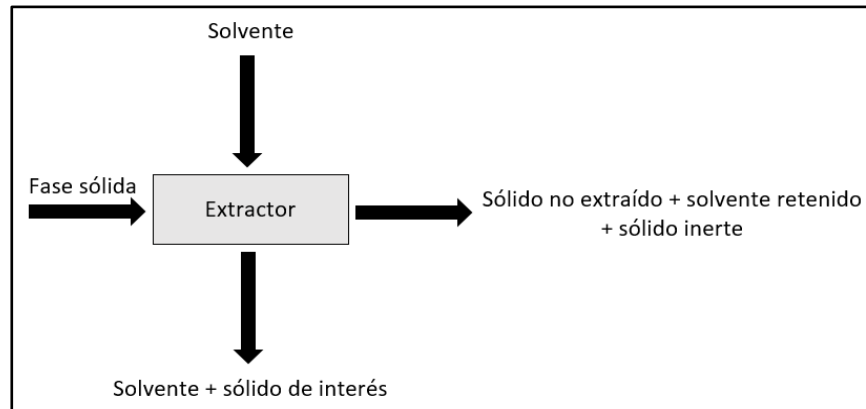


Ilustración 12 - Principio de la extracción sólido-líquido.

3.2 Extracción por ultrasonido

El ultrasonido está basado en la propagación de ondas sonoras mecánicas que se propagan en frecuencias por encima del intervalo audible humano (aproximadamente 20 kHz) y por debajo de las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz). Las principales características de las ondas de ultrasonidos son:

- Longitud: distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción;
- Amplitud: altura máxima de una onda;
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo;
- Velocidad (m/s): producto de la frecuencia por la longitud de onda;
- Potencia (W): cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado;
- Intensidad ($W \cdot cm^{-2}$): cociente de una unidad de potencia a través de una unidad de área.[42]

Las aplicaciones del ultrasonido en el procesamiento, análisis y control de calidad en el sector alimentario están fundamentadas según los niveles de intensidad de energía utilizados en la extracción, que pueden ser altos o bajos.

Los niveles bajos de energía ultrasónica (baja intensidad) se encuentran en frecuencias mayores que 100 KHz y en intensidades menores que $1 W \cdot cm^{-2}$, mientras que los niveles altos (alta intensidad) se encuentran en el intervalo de frecuencia de 20 a 500 KHz y en intensidades mayores que $1 W \cdot cm^{-2}$. [43]

El método de extracción por ultrasonido consiste en varios mecanismos físicos pero la principal fuerza impulsora es la cavitación acústica, capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión (ver **Ilustración 13**). [42]

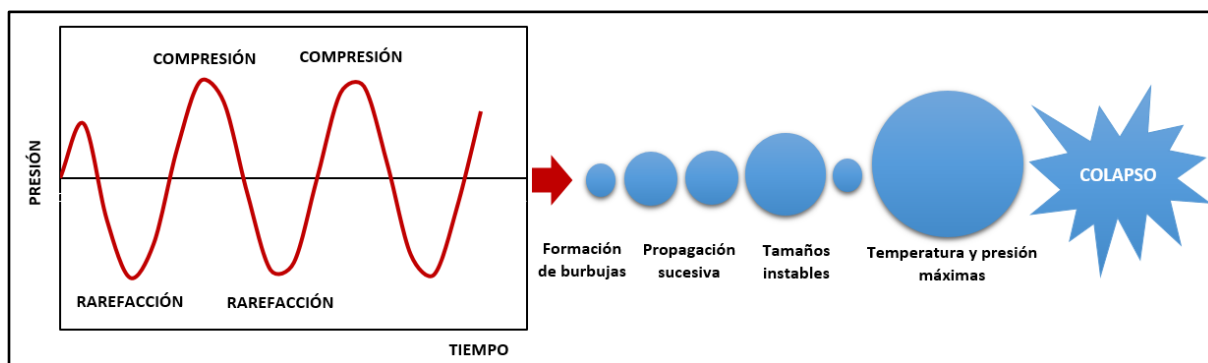


Ilustración 13 - Principio de la extracción con ultrasonido.

3.3 Extracción con solventes SUPRAS

Se denominan solventes supramoleculares (SUPRAS), los líquidos nanoestructurados generados a partir de dispersiones coloidales acuosas o hidro-orgánicas de sustancias anfífilas a través de procesos espontáneos de autoensamblaje y coacervación.[44]

La formación de un solvente SUPRA ocurre cuando moléculas anfífilas (en general tensoactivos y ácidos carboxílicos de cadena larga) se autoorganizan en un proceso compuesto por etapas secuenciales. En la etapa inicial, por consecuencia de la acción de interacciones atractivas y repulsivas, las moléculas anfífilas en solución se orientan de forma que sus segmentos polares y apolares disminuyan las interacciones solvofóbicas.

En esta etapa es donde se originan los agregados tridimensionales, cuya morfología depende de los tamaños relativos de la cabeza polar hidrofílica y de la parte carbónica hidrofóbica de la molécula anfífilica. La morfología de los agregados tridimensionales puede ser predicha según el factor de empaquetamiento (C_{pp}), que se calcula según la siguiente fórmula:[45]

$$C_{pp} = \frac{V}{A \cdot L}$$

Donde:

- C_{pp} = factor de empaquetamiento;
- V = volumen de la cadena carbónica;
- A = área de la sección transversal de la cabeza polar;
- L = longitud total de la molécula.[45]

Los tipos de micelas formadas varían según el valor del factor de empaquetamiento (ver **Ilustración 14**).

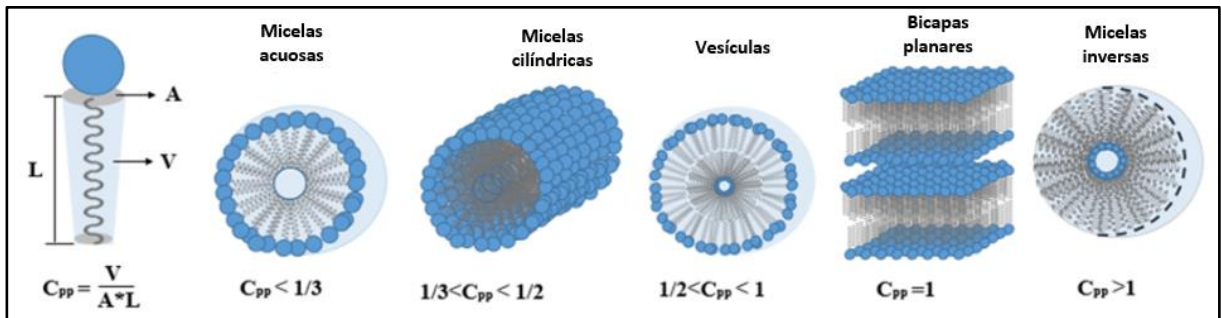


Ilustración 14 - Tipos de micelas según el factor de empaquetamiento.

A continuación, bajo el efecto de estímulo externo (un cambio de temperatura o pH, adición de una sal o un solvente) transcurre la segunda etapa de autoorganización, que consiste en un fenómeno de separación de fases líquidas denominado coacervación.[45][44]

La coacervación más propiamente definida es la separación de un coloide muy solvatado en dos fases líquidas, una de las cuales contiene una alta proporción de coloide (capa de coacervado) y la otra, una baja proporción. Este proceso ocurre a causa de la disminución de la repulsión entre los agregados debido a neutralización de los grupos polares cargados o sino a la deshidratación de los mismos para reducir su área efectiva.[44][46]

En la segunda etapa (coacervación), se observa la formación de gotas de coacervado que luego se organizan en aglomerados (clústeres) de mayor tamaño hasta que, por último, da lugar a una separación líquido-líquido que origina una nueva fase con una micro o nanoestructura diferente inmiscible y dispersa en la fase continua (solución de equilibrio).[44]

A esta nueva fase, que está formada por gotas de coacervado independientes, se denomina SUPRAS y en la **Ilustración 15**, se explica el paso a paso de la formación de dicha fase.

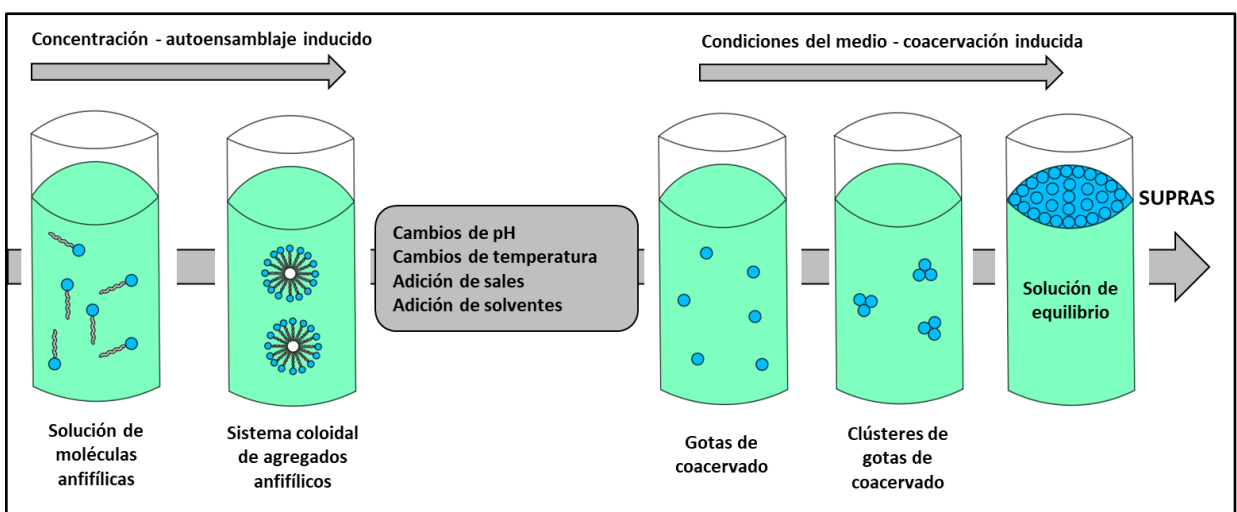


Ilustración 15 - Principio de la extracción con solventes SUPRAS.

4. Método de cuantificación por HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación basada en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fase denominada estacionaria y otra denominada móvil.[47] La cromatografía líquida puede ser de:

- Partición;
- Adsorción;
- Papel;
- Capa delgada;
- Gel;
- Intercambio iónico.

Los tipos anteriormente citados se diferencian según el mecanismo de retención. La técnica utilizada en el presente proyecto es la cromatografía líquida de adsorción, que se basa en la competencia por los analitos neutrales entre la fase móvil (líquida) y la fase estacionaria (sólida). En cuanto a fases móviles, existen tres modos en los que se puede operar la cromatografía líquida de alto resolución:[47]

- Fase reversa;
- Par ion;
- Fase normal.

En la cuantificación de los ácidos clorogénicos y de la cafeína se utilizó el modo de fase reversa, método que es utilizado para analizar la mayoría de muestras, especialmente, aquellas que contienen sustancias neutras o no ionizadas, solubles, en mezclas de compuestos orgánicos y agua. La fase estacionaria es hidrofóbica mientras que la fase móvil es un líquido polar, en este caso, compuesto por una mezcla de agua-metanol. [48]

El tipo de detección puede variar según su mecanismo, los detectores se clasifican en:

- Detectores de propiedades intensivas;
- Detectores específicos;
- Detectores de modificación de la fase móvil;
- Técnicas hífenizadas.

El detector utilizado por defecto es el de Ultravioleta (UV), ya que los analitos a cuantificar absorben radiación en esta zona del espectro. A continuación, en la **Ilustración 16**, se muestran los componentes básicos de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución.

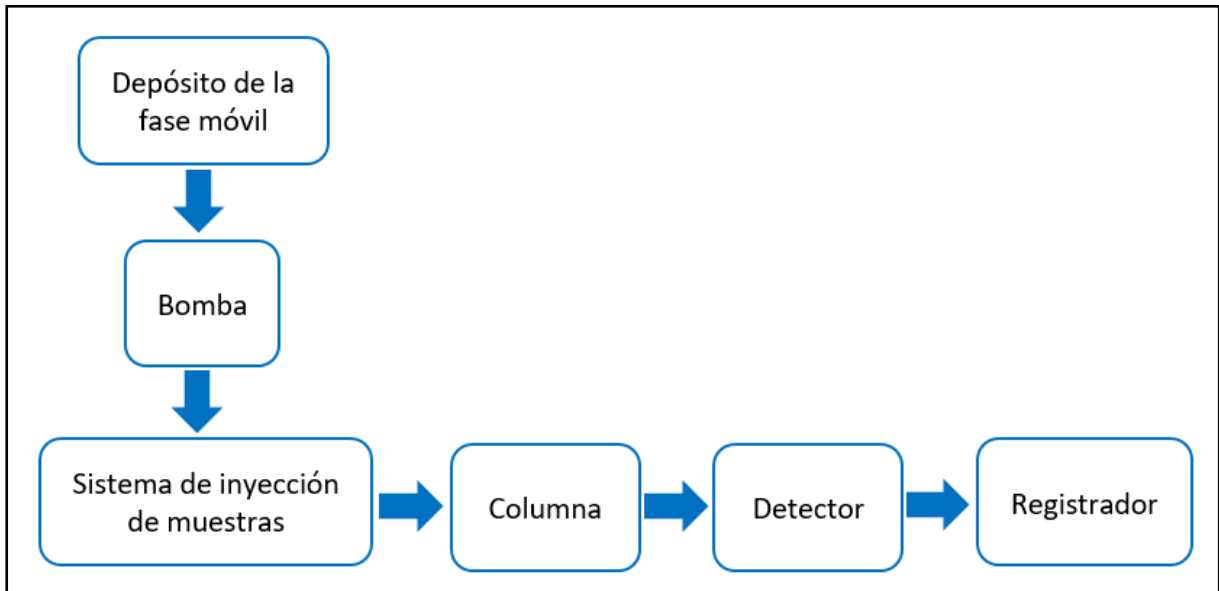


Ilustración 16 - Componentes básicos de un sistema HPLC.

5. Parte experimental

En este capítulo del presente proyecto, se explicarán con más detalles los métodos utilizados en las extracciones de los ácidos clorogénicos y de la cafeína y también, se presentarán los resultados obtenidos en cada experimento.

5.1 Materiales y métodos

A continuación, se enumeran todos los materiales y reactivos utilizados en los métodos de extracción ensayados y también se explica cada etapa realizada en la ejecución de los mismos.

5.1.1 Materiales y reactivos

Para llevar a cabo el procedimiento de extracción con los solventes SUPRAS y la preparación de las muestras que serán analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se necesitarán de los siguientes materiales y reactivos descritos en la **Tabla 4**.

Materiales	Reactivos
Tubos de ensayo de 10 mL con tapón	Etanol absoluto de grado analítico
Vasos de precipitado de 25 mL	Hexanol absoluto de grado analítico
Matraces aforados de 25 mL	Metanol grado HPLC
Matraces aforados de 100 mL	Ácido acético de grado analítico
Gradilla para tubos de ensayo	Agua ultrapura
Balanza analítica de precisión (0,0001 g)	Muestras de poso de café
Pinza	
Agitador vórtex	
Ultrasonido	
Centrífuga	
Microespátula	
Cronómetro	
Pie de rey digital	
Micropipetas de 200-1000 µL y 1000-5000 µL	
Pipetas aforadas de 15 y 20 mL	
Soporte universal con pinza	
Jeringas de cristal de 10 mL	
Microfiltros de 0,45 µm	
Viales de cristal	

Tabla 4 - Materiales y reactivos utilizados en los experimentos.

5.1.2 Método de extracción vórtex con SUPRAS

Coger un tubo de ensayo y dejarlo en una gradilla de soporte. Con el auxilio de una micropipeta, previamente calibrada, transferir al tubo de ensayo 0,96 mL de hexanol absoluto. Para añadir 1,2 mL de etanol absoluto, repetir el procedimiento anteriormente explicado. Adicionar 1,84 mL de agua ultrapura a la mezcla de etanol y hexanol.

En una balanza analítica, colocar el tubo de ensayo que contiene la mezcla de hexanol, etanol y agua en un vaso de precipitado y tarar la misma. Con la ayuda de una microespátula, transferir al tubo de ensayo 0,7 g de la muestra del poso de café.

Tapar el tubo de ensayo y dejarlo durante minuto bajo agitación en un vórtex a 3 000 rpm. Después de esto, centrifugar el tubo de ensayo durante 30 minutos a 4 200 rpm. Con el auxilio de un pie de rey de la marca Mitoyo, modelo CD-15CP, medir la altura de la fase superior. En la **Ilustración 17**, se muestra como se hace la medida de la altura de la fase superior obtenida en un experimento de extracción.

Con una micropipeta, retirar de la fase superior del tubo de ensayo una alícuota de 1 mL, filtrarla y transferirla a un vial de inyección. Para realizar el filtrado de la muestra, primero se deberá ensamblar una jeringa de cristal al soporte con una pinza, para luego realizar un pequeño lavado con el material que será filtrado. En la boquilla de la jeringa, acoplar un filtro de 0,45 μm , transferir el material que se filtrará posteriormente a la jeringa y, por último, montar el émbolo.

Con el auxilio de una pinza, coger un vial de cristal y colocarlo debajo del filtro. Ir apretando con cuidado el émbolo hasta que empiece a salir por el filtro el material que será almacenado dentro del vial de cristal. Tapar el vial para protegerlo de la luz y almacenarlo en nevera.

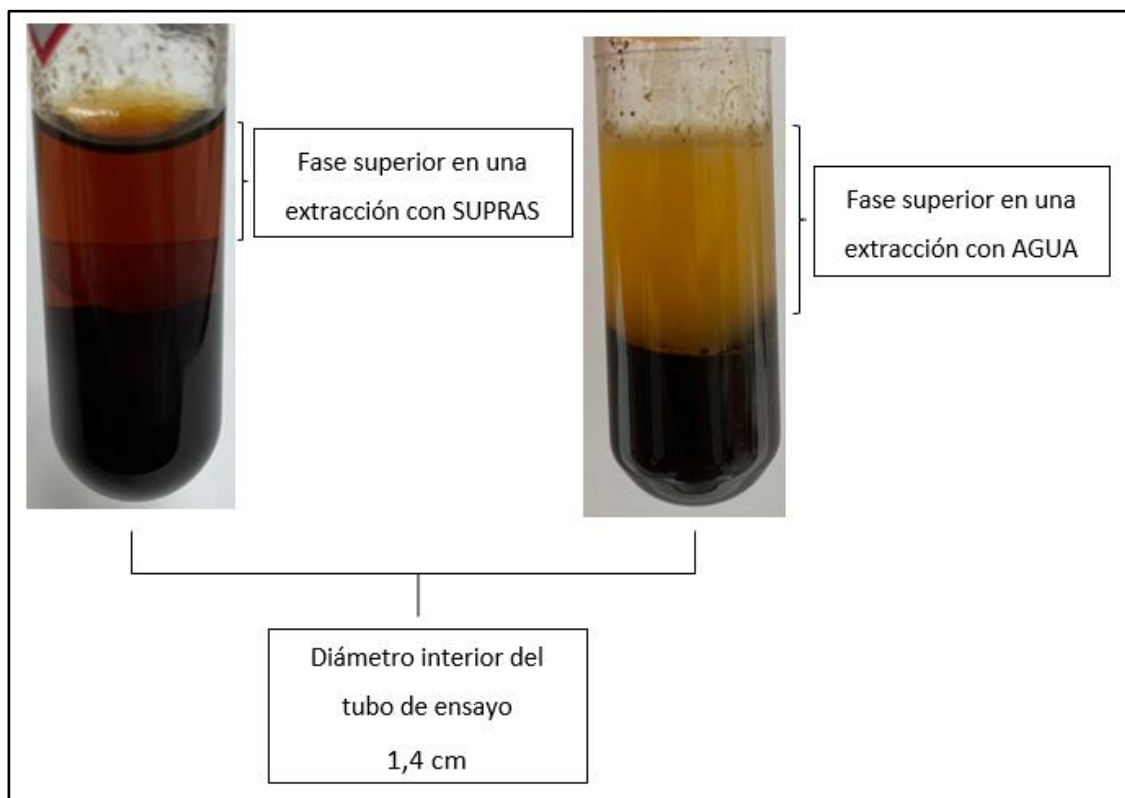


Ilustración 17 - Medida de la altura de la fase superior en extracciones con SUPRAS y con AGUA.

En la **Ilustración 18**, se muestra el procedimiento de extracción con los solventes SUPRAS.

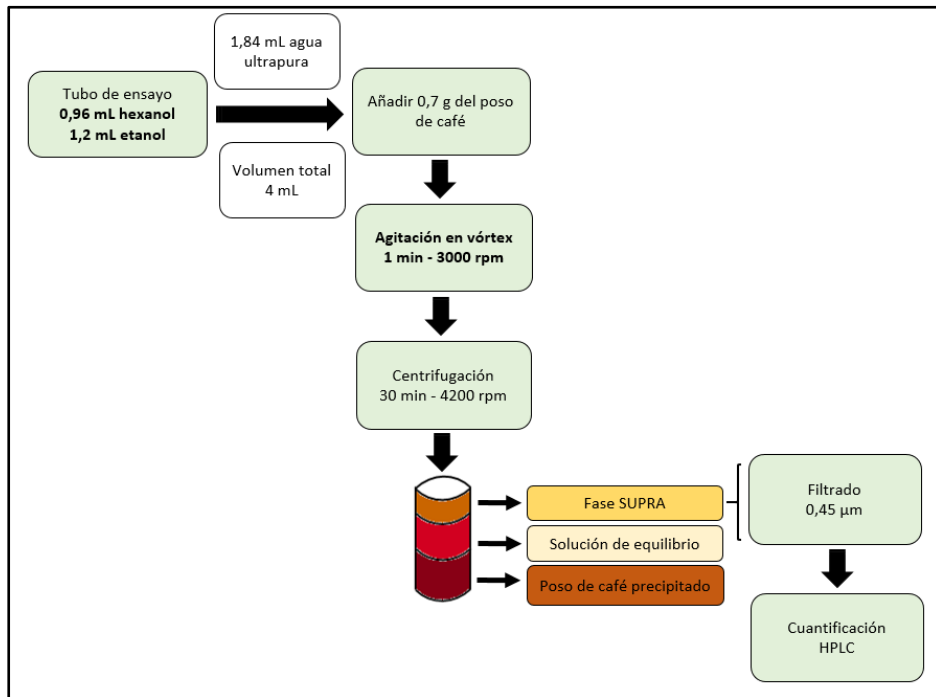


Ilustración 18 - Esquema del procedimiento de extracción con SUPRAS.

5.1.3 Método de extracción vórtex con agua

Para llevar a cabo el método de extracción vórtex con agua (ver **Ilustración 19**), fue repetido casi en su totalidad el procedimiento del apartado anterior (extracción vórtex con SUPRAS), pero en vez de usar una mezcla de disolventes, se ejecutó una extracción con 4 mL de agua ultrapura.

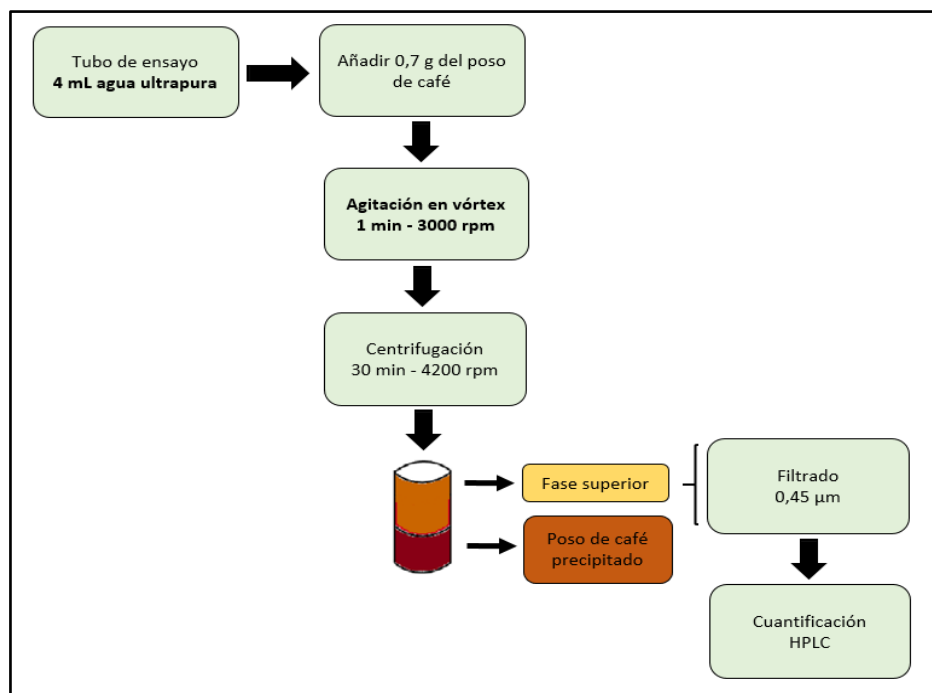


Ilustración 19 - Esquema del procedimiento de extracción con AGUA.

5.1.4 Método de extracción con ultrasonido

El método de extracción con ultrasonido tiene muchas similitudes con los métodos anteriormente descritos, la gran diferencia es la manera de extracción propiamente dicha. Este experimento fue llevado a cabo en dos condiciones de temperatura distintas, uno de ellos a temperatura ambiente (entre 23-25 °C) y el otro a 50 °C.

La preparación para ejecutar este método, consiste en añadir 4 mL de agua ultrapura en un tubo de ensayo y 0,7 g de la muestra del poso de café. Posteriormente, se realizó una extracción en un baño de ultrasonido de la marca J.P. Selecta, modelo HD 5L (3000866), número de serie 574 340, con una potencia máxima de 180 W durante un minuto y con las condiciones de temperatura definidas previamente.

A continuación, se realizaron los mismos procedimientos de centrifugación y filtración en la preparación de la muestra a ser analizada en HPLC. El paso a paso de ejecución de este método está explicado en la **Ilustración 20**.

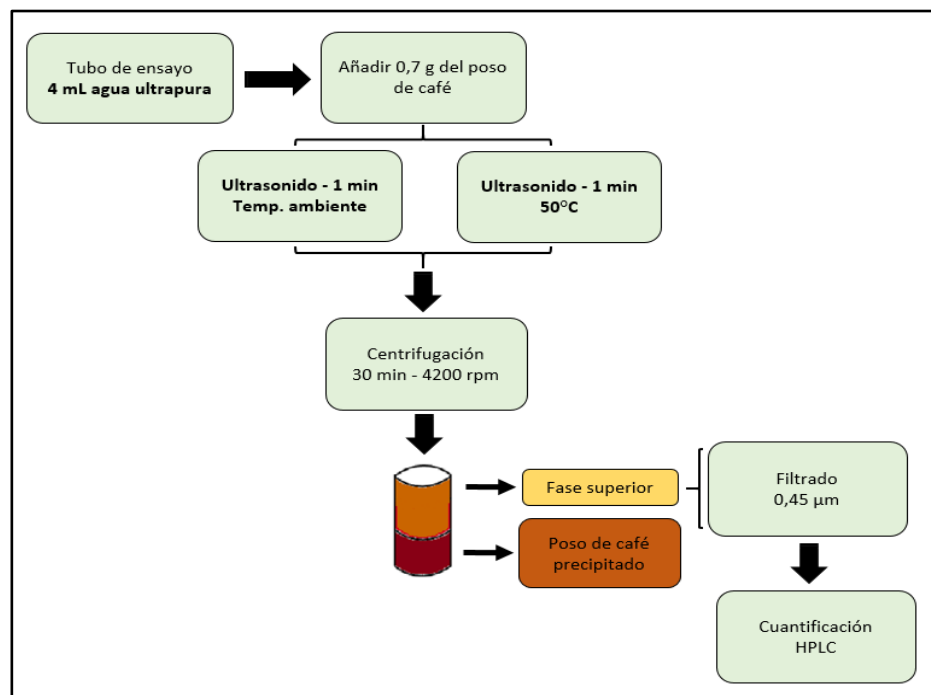


Ilustración 20 - Esquema del procedimiento de extracción por ULTRASONIDO.

5.1.5. Cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector de ultravioleta/visible (UV/Vis)

Para realizar la cuantificación de los ácidos clorogénicos y de la cafeína presentes en los materiales obtenidos mediante extracción, se utilizó un HPLC de la marca Waters modelo Alliance con detector ultravioleta/visible (UV/Vis) de fotodiodos con una columna C8 KromaPhase (Scharlab) de tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro de 100 Å, longitud de 150 mm y diámetro interior de 4,6 mm.

La fase móvil fue preparada con agua ultrapura y metanol, ambos acidificados con 0,1% (v/v) de ácido acético grado HPLC, con elución en gradiente y bajo un flujo de 0,6 mL/min. El gradiente de elución empezó con unos 18% de metanol y un 82% de agua ultrapura y terminó con 30% de metanol y 70% de agua.

El tiempo total de elución fue de 15 minutos. Se determinó un volumen de inyección de 20 μL y una longitud de onda del detector de 278 nm. Esta longitud de onda posibilitó la absorción tanto de las moléculas de ácido clorogénico como la molécula de cafeína.

5.2. Optimización de las condiciones de trabajo – HPLC y patrones

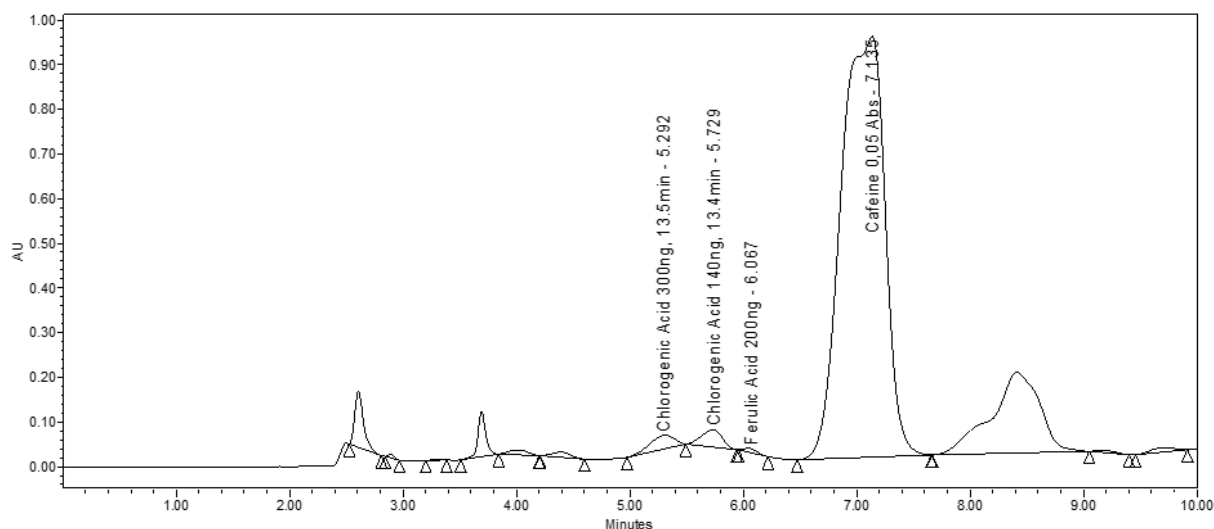
En este subapartado se expondrán los ajustes realizados para llevar a cabo la cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del ácido clorogénico y de la cafeína.

5.2.1. Condiciones para la fase móvil

La primera fase móvil probada consistió de un 30% de metanol y un 70% de agua en elución isocrática con un tiempo total de 10 minutos. Esta es la propuesta indicada según los autores Ballesteros et al. (2019) que se explica en la **Tabla 5**. [49]

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	30	70
10	30	70

Tabla 5 - Fase móvil inicial en elución isocrática.



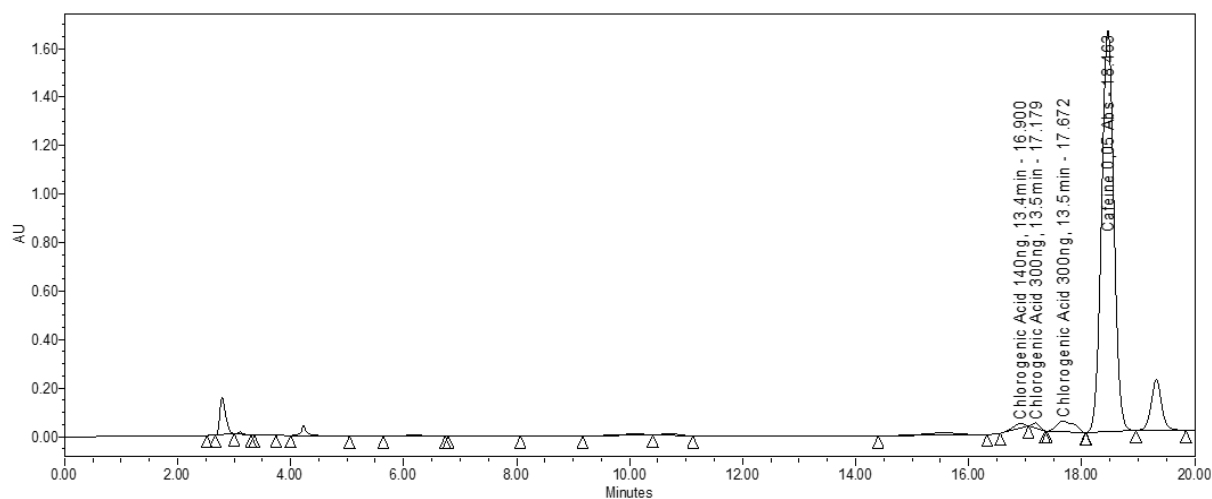
Il·lustració 21 - Cromatograma con la fase móvil inicial.

En el cromatograma de la **Il·lustració 21**, se puede verificar que el pico de cafeína con tiempo de retención de 7 minutos no posee una resolución completa y los tres picos de ácido clorogénico con tiempos de retención entre 5 y 6 minutos no están bien separados.

En la segunda modificación (**Tabla 6**), se cambió la proporción inicial de los constituyentes de la fase móvil a un 12% de metanol y un 88% de agua en elución gradiente con un tiempo total de 20 minutos. La proporción final de los eluyentes fue mantenida en 30% de metanol y 70% de agua.

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	12	88
20	30	70

Tabla 6 - Segunda fase móvil en elución gradiente.



Il·lustració 22 - Cromatograma con la segunda fase móvil probada.

Es posible ver en este cromatograma de la **Ilustración 22** el efecto del cambio de la polaridad de la fase móvil debido el desplazamiento de los picos de ácido clorogénico y cafeína hacia los tiempos de retención de 17 y 18 minutos respectivamente.

Como el tiempo de elución se alargó mucho, se hicieron unos ajustes de gradientes de la fase móvil y se probó una proporción de un 18% de metanol y un 82% de agua en 15 minutos de elución con la misma proporción final del experimento anterior (ver Error! Reference source not found.).

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	18	82
15	30	70

Tabla 7 - Fase móvil óptima en elución gradiente.

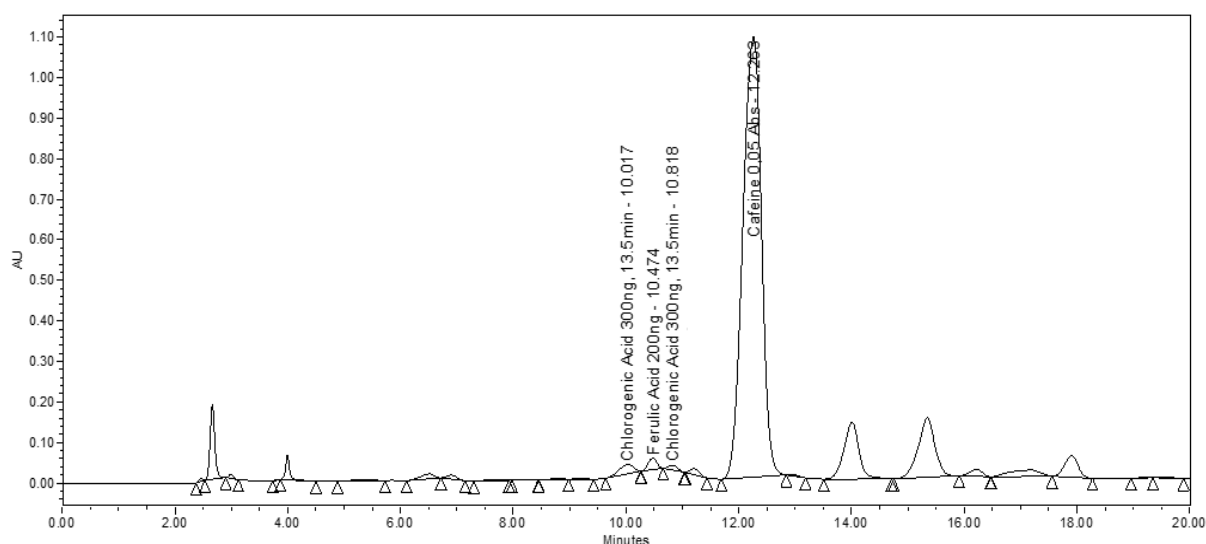
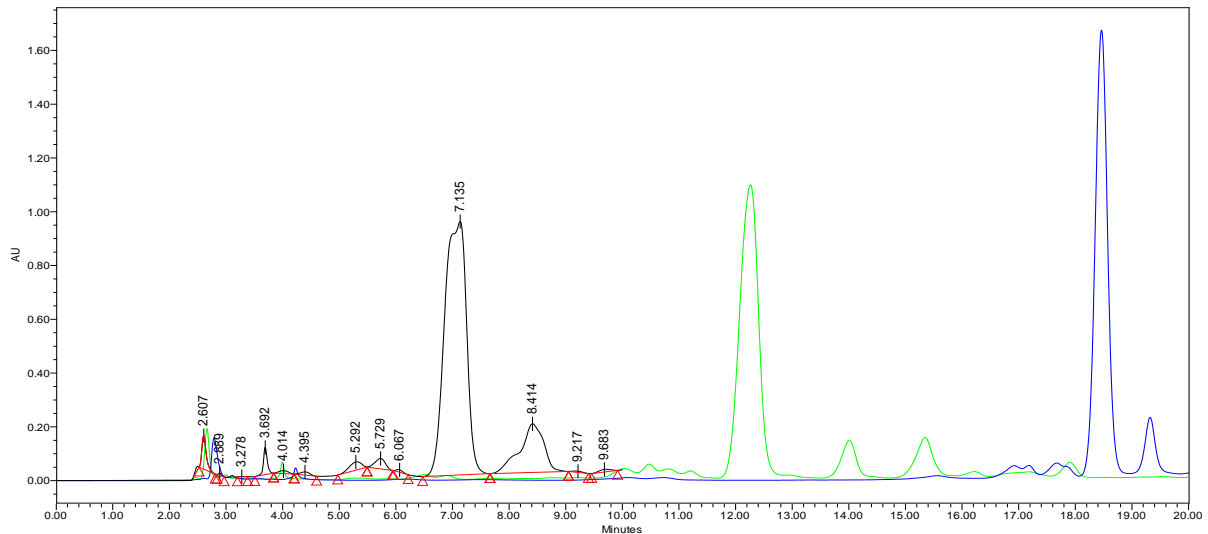


Ilustración 23 - Cromatograma con la fase móvil óptima.

Con el ajuste del gradiente de elución, en la **Ilustración 23** se aprecia la mejora de resolución del pico de cafeína con tiempo de retención de 12 minutos y una aceptable separación de los picos de ácido clorogénico con tiempo de retención entre 10 y 11 minutos.



Il·lustració 24 - Superposició de los cromatogramas resultantes de las tres fases móviles probadas.

En esta superposición de cromatogramas en la **Ilustración 24** se contrastan los distintos sistemas de elución, la primera respuesta en color negro representa la fase móvil isocrática (30% metanol y 70% agua), la segunda en color verde representa la elución en gradiente con un 18% de metanol y un 82% de agua y la última, en color azul representa la elución en gradiente con un 12% de metanol y un 88% de agua.

El gradiente definido como estándar de trabajo fue de 18% de metanol y 82% de agua en condiciones iniciales y en condiciones finales, 30% y 70% respectivamente con 15 minutos de elución. Este método fue el que presentó una buena resolución de los picos de ácido clorogénico y cafeína, y también un menor tiempo de análisis.

5.2.2. Rectas de calibración de la cafeína y del ácido clorogénico

Para la construcción de las rectas de calibración de la cafeína y del ácido clorogénico, se prepararon patrones de 1, 5, 20, 40, 100, 160 y 200 ppm para el ácido clorogénico y patrones de 100, 240, 360, 480 y 600 ppm para la cafeína.

En la **Tabla 8** y en la **Ilustración 25**, se muestran los resultados obtenidos para la recta de calibración del ácido clorogénico.

Ácido clorogénico	
Concentración real (ppm)	Área
1	29 358
5,32	224 589
21,31	947 204
42,41	1 940 413
100,09	4 497 597
160,32	7 251 419
200	9 176 909

Tabla 8 - Resultados de la recta de calibración del ácido clorogénico.

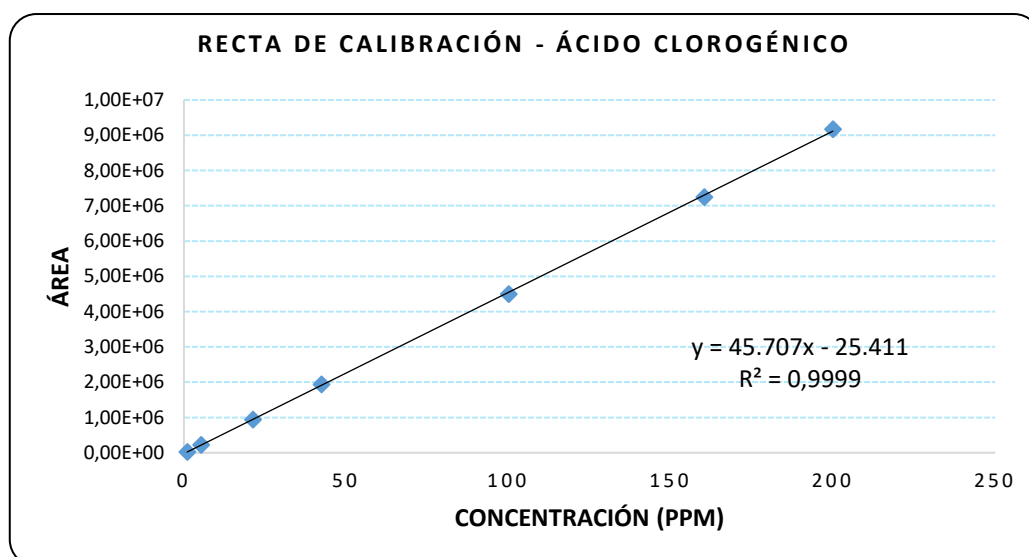


Ilustración 25 - Recta de calibración del ácido clorogénico.

El valor del coeficiente de determinación (R^2) de la recta de calibración del patrón de ácido clorogénico confirma la robustez de la misma.

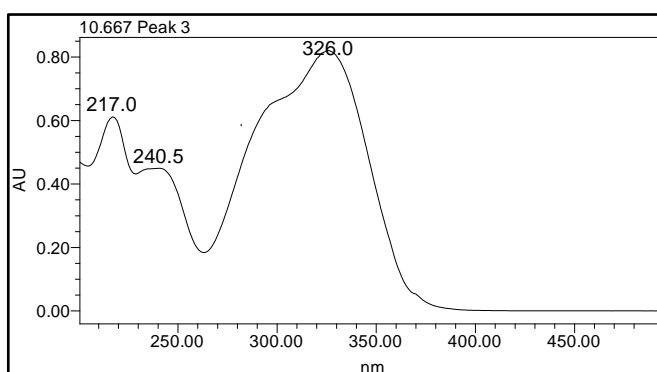


Ilustración 26 - Espectro ultravioleta del ácido clorogénico a 278 nm.

El espectro de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS) del ácido clorogénico (ver **Ilustración 26**) se caracteriza por un pico de absorción claramente definido a 217 nm y una banda de máxima absorción a 326 nm.

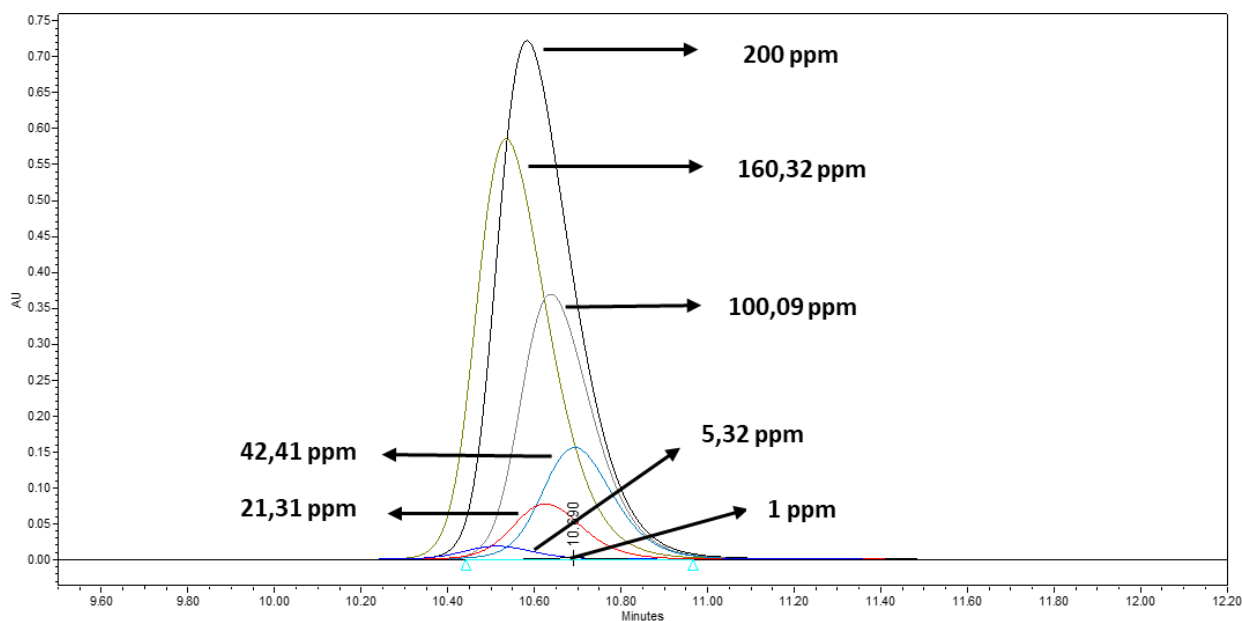


Ilustración 27 - Superposición de los cromatogramas de los patrones de la recta de calibración del ácido clorogénico.

En la **Ilustración 27** se presenta la superposición de los cromatogramas de los patrones utilizados en la recta de calibración del ácido clorogénico. Se puede verificar como todos los picos salen en un tiempo de retención similar y que la intensidad de absorción del pico de cada patrón es proporcional a la concentración. Los tiempos de retención están situados entre 10,51 y 10,69 minutos. A continuación, en la **Tabla 9** se presentarán los resultados para la recta de calibración de la cafeína.

Cafeína	
Concentración real (ppm)	Área
101,68	8 922 874
245,13	20 944 218
363	30 058 205
489,78	39 029 593
604	45 841 174

Tabla 9 - Resultados de la recta de calibración de la cafeína.

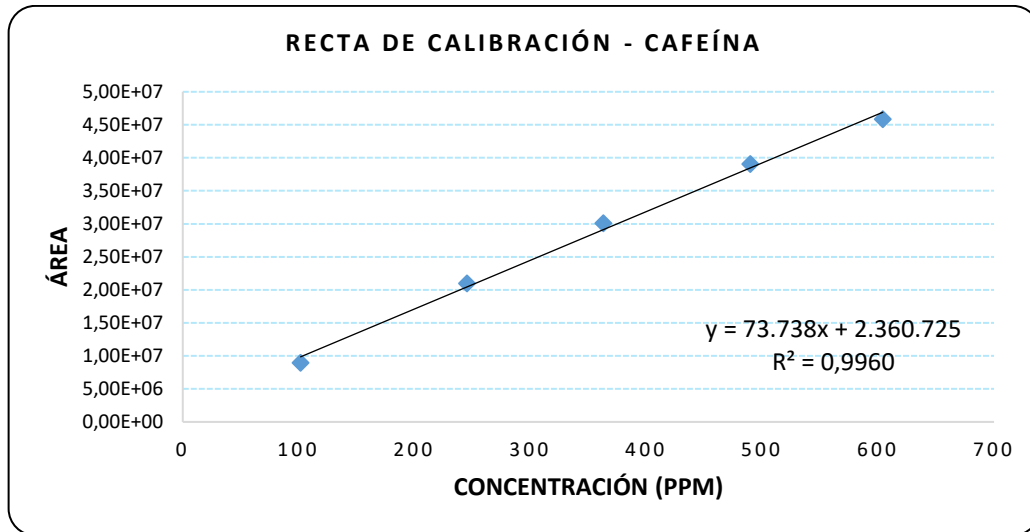


Ilustración 28 - Recta de calibración de la cafeína y su ecuación de la recta.

La recta de calibración de la cafeína no presenta la misma robustez que la recta del ácido clorogénico, pero de todas las formas, el valor del coeficiente de determinación (R^2) es considerado aceptable.

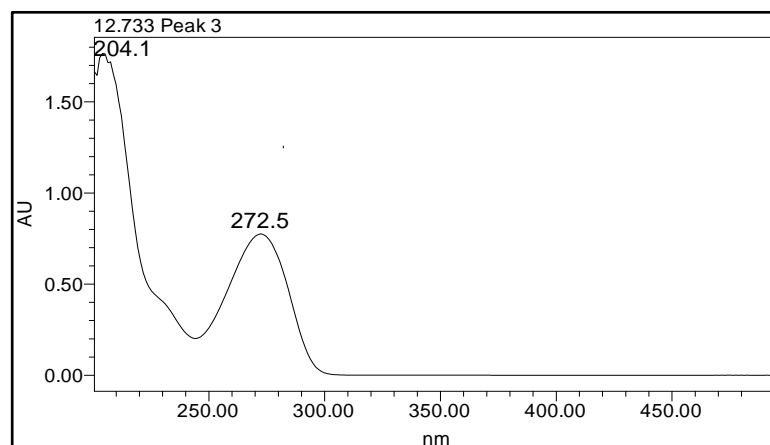
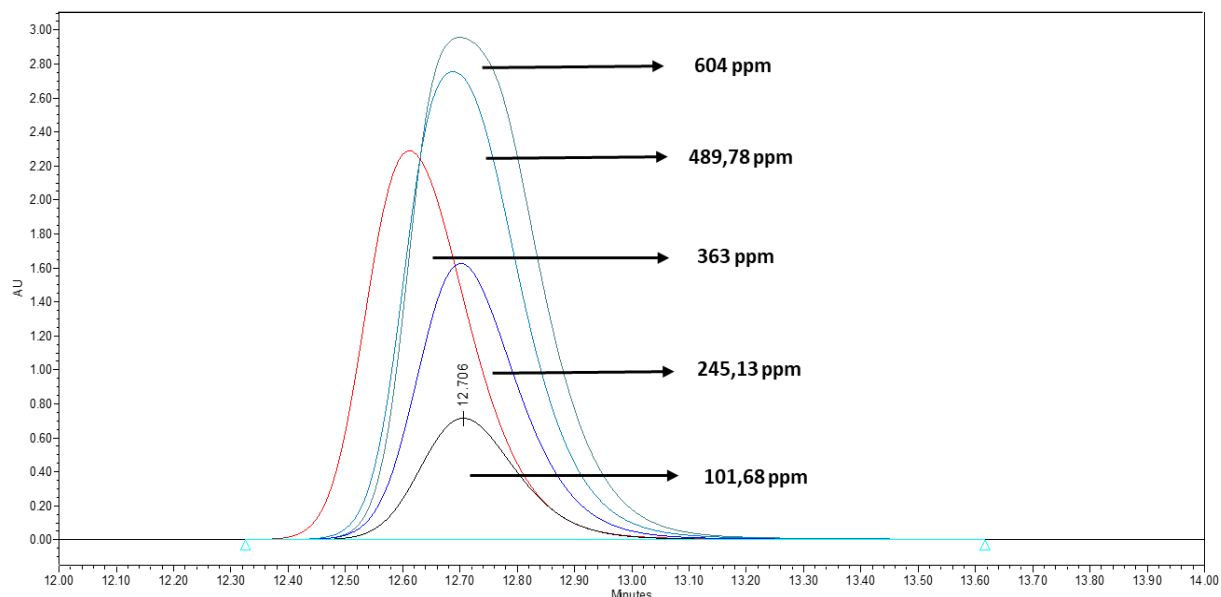


Ilustración 29 - Espectro ultravioleta de la cafeína a 278 nm.

En el espectro de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de la cafeína (**Ilustración 29**) el pico característico de la molécula se encuentra a 272,5 nm.



Il·lustració 30 - Superposició de los cromatogramas de los patrones de la recta de calibración de la cafeína.

En esta superposición de cromatogramas de los patrones de cafeína (**Ilustración 30**), así como en el caso del ácido clorogénico, se comprueba la similitud de los tiempos de retención para cada patrón y también la proporcionalidad entre el área y la concentración. El rango de los tiempos de retención para los patrones de cafeína está situado entre 12,61 y 12,71 minutos.

5.2.3. Estabilidad de patrones

El estudio de la estabilidad de los patrones de la cafeína y del ácido clorogénico consistió en una evaluación de similitud de los tiempos de retención y del área de cada patrón a lo largo del tiempo. Los patrones de 1 y 100 ppm de ácido clorogénico y de 100 y 600 ppm de cafeína fueron inyectados el mismo día de su preparación, después de una semana y después de dos semanas.

Ácido clorogénico - 1 ppm			
Color del cromatograma	Observación	Tiempo de retención (min)	Área
Negro	Preparación e inyección en el mismo día	10,69	29 358
Azul	Inyección después de una semana	9,58	42 511
Rojo	Inyección después de dos semanas	5,56	33 883

Tabla 10 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón de ácido clorogénico 1 ppm.

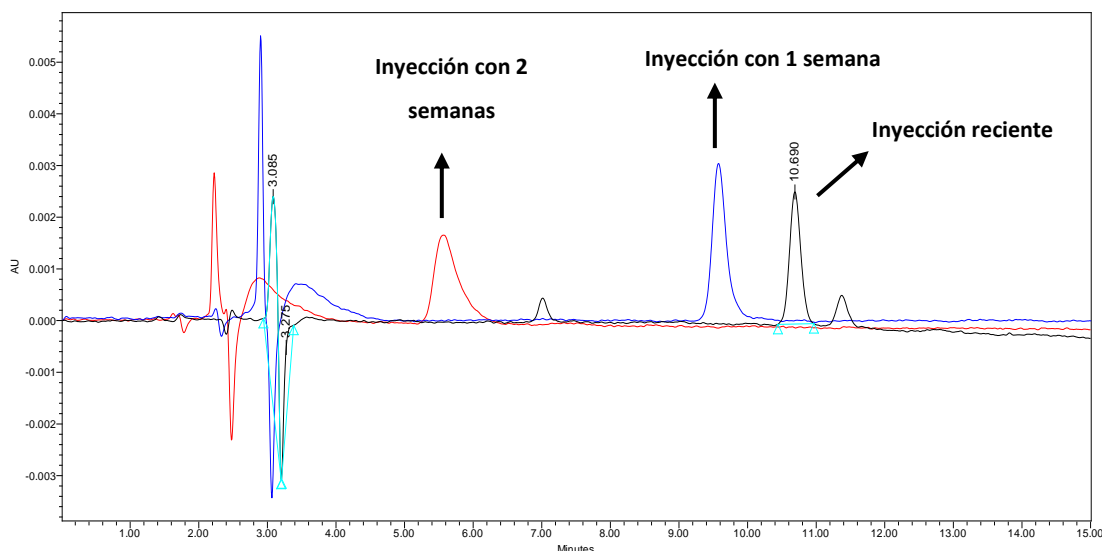


Ilustración 31 - Comparación de las inyecciones del patrón de 1 ppm del ácido clorogénico.

En la **Ilustración 31**, se verifica que el patrón de 1 ppm de ácido clorogénico después de una semana almacenado en nevera y protegido de la luz, presentó un valor muy discrepante en relación al área y también en relación al tiempo de retención. Pasadas dos semanas, se volvió a inyectar el patrón y se confirmó la inestabilidad del mismo.

Ácido clorogénico - 100 ppm			
Color del cromatograma	Observación	Tiempo de retención (min)	Área
Negro	Preparación e inyección en el mismo día	10,63	4 497 597
Azul	Inyección después de una semana	10,54	4 350 756
Rojo	Inyección después de dos semanas	6,77	430 911

Tabla 11 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón del ácido clorogénico 100 ppm.

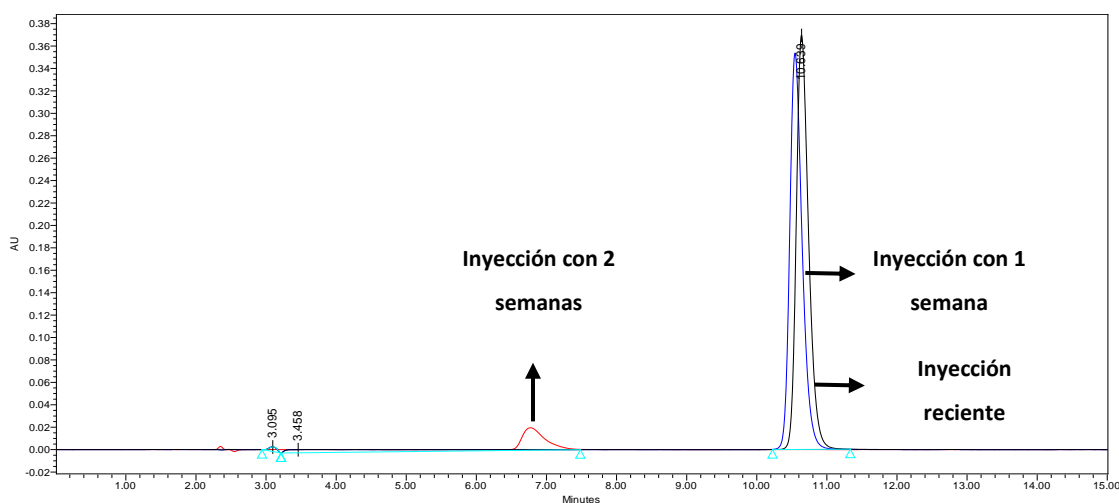


Ilustración 32 - Comparación de las inyecciones del patrón de 100 ppm del ácido clorogénico.

En el caso del patrón de 100 ppm (**Ilustración 32**), después de una semana de almacenamiento en las mismas condiciones que el patrón anterior, el resultado fue todo lo contrario. Los valores de área y de tiempo de retención después de una semana, en este caso, fueron muy parecidos a los valores del patrón recién preparado.

Pasadas dos semanas, el patrón de 100 ppm de ácido clorogénico presentó una disminución bastante significativa en relación al tiempo de retención y también en relación al área. A continuación, se procederá con la evaluación de la estabilidad de los patrones de cafeína.

Cafeína - 100 ppm			
Color del cromatograma	Observación	Tiempo de retención (min)	Área
Negro	Preparación e inyección en el mismo día	12,70	8 922 874
Azul	Inyección después de una semana	12,65	9 055 130
Rojo	Inyección después de dos semanas	8,17	8 984 530

Tabla 12 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón de la cafeína 100 ppm.

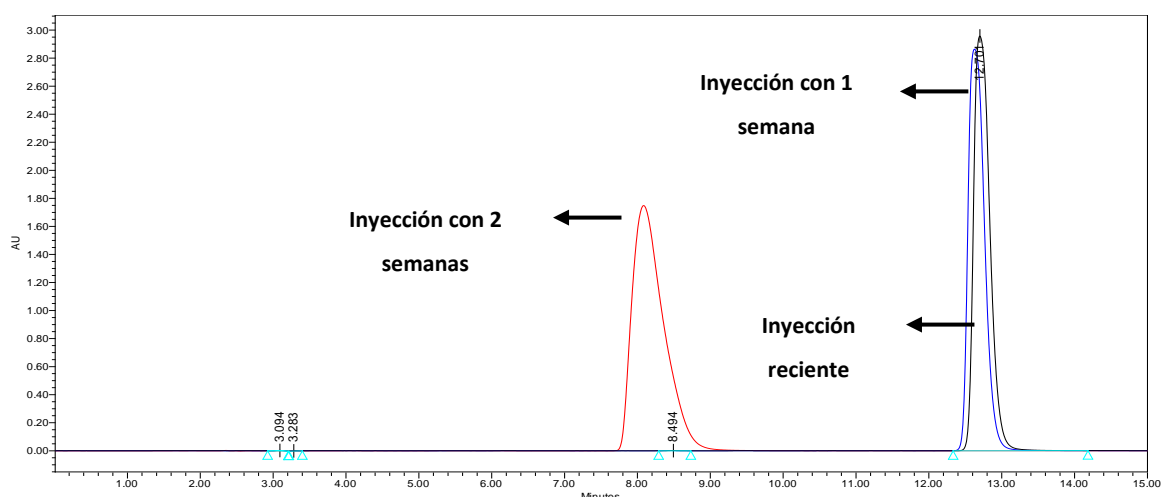


Ilustración 33 - Comparación de las inyecciones del patrón de 100 ppm de la cafeína.

El patrón de 100 ppm de cafeína después de una semana de preparación (**Ilustración 33**), demostró un resultado muy parecido al obtenido en la inyección del patrón recién preparado. Después de dos semanas, el patrón de 100 ppm de cafeína mantuvo un valor del área cercano al valor inicial, pero el tiempo de retención sufrió una disminución considerable.

Cafeína - 600 ppm			
Color del cromatograma	Observación	Tiempo de retención (min)	Área
Negro	Preparación e inyección en el mismo día	12,70	45 841 174
Azul	Inyección después de una semana	12,63	44 988 773
Rojo	Inyección después de dos semanas	8,08	52 847 976

Tabla 13 - Resultados de los tiempos de retención y del área del patrón de la cafeína 600 ppm.

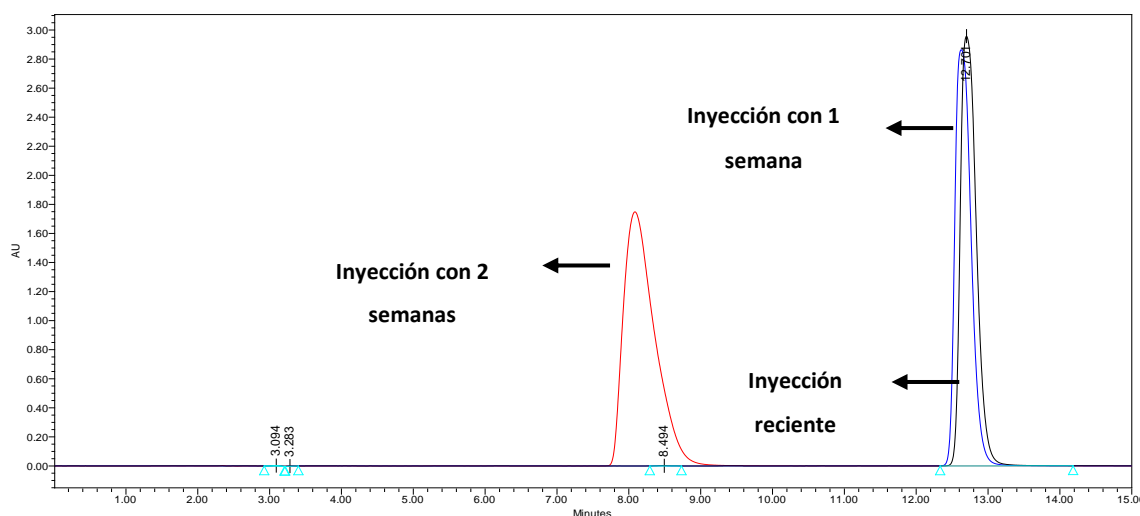


Ilustración 34 - Comparación de las inyecciones del patrón de 600 ppm de la cafeína.

En relación al patrón de 600 ppm de cafeína (**Ilustración 34**), el resultado obtenido puede ser considerado muy parecido a los resultados del patrón de 100 ppm. El ensanchamiento del pico de cafeína en la inyección del patrón después de dos semanas, resultó en un aumento considerable en el valor del área del mismo.

Por lo tanto, se puede concluir que **los patrones del ácido clorogénico y de la cafeína son estables tan solo durante 1 semana, guardados en la nevera y protegidos de la luz**, a excepción del patrón de 1 ppm de ácido clorogénico que ya se deterioró a la primera semana.

5.3. Extracción con SUPRAS – dopaje con ácido clorogénico

Los ácidos clorogénicos son definidos como un grupo de moléculas formadas por la esterificación de ácidos trans-cinámicos y ácidos quínicos. Son compuestos químicos que presentan isomería cis/trans debido a la esterificación en diferentes posiciones en los átomos de carbono del ácido quínico.

Para determinar cuál de los picos de ácido clorogénico presentes en las muestras de poso de café se corresponde con el del patrón (utilizado en la recta de calibración), se realizaron una serie de extracciones con y sin dopaje. En este sentido, el dopaje consistió en agregar un volumen determinado de una solución de concentración conocida de patrón de ácido clorogénico para comprobar cual era el pico que aumentaba de tamaño (área).

El primer experimento realizado, fue la comparación de una extracción con solventes SUPRAS dopada (con adición de una alícuota de 1,84 mL de una solución de 100 ppm de ácido clorogénico) y una sin dopaje. En la **Ilustración 35**, se explica el experimento de extracción con SUPRAS con dopaje y en la **Ilustración 36**, el procedimiento de extracción con SUPRAS pero sin dopaje.

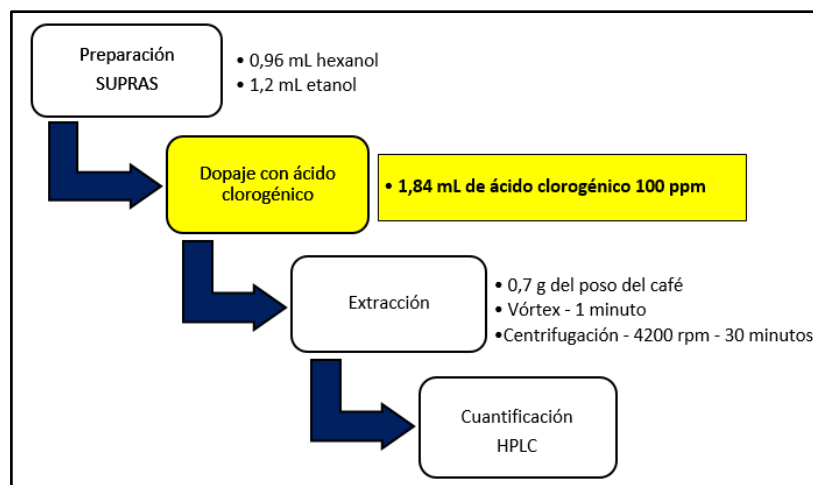


Ilustración 35 - Procedimiento de una extracción con SUPRAS con dopaje.

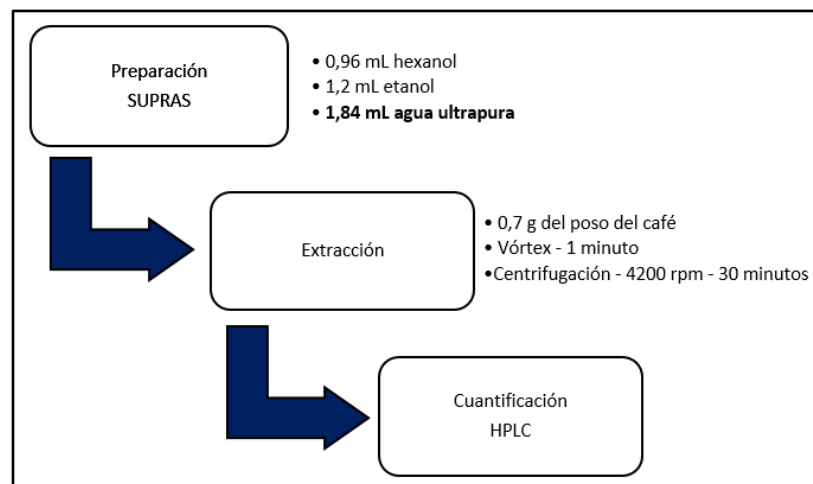


Ilustración 36 - Procedimiento de extracción convencional con SUPRAS sin dopaje.

En la **Tabla 14**, están plasmados los valores de las áreas de los tres picos de ácido clorogénico en una extracción con SUPRAS sin dopaje, situados en una franja de tiempo de retención entre 9,77 y 10,82 minutos.

SUPRAS sin dopaje		
Tiempo de retención (min)	Tipo del pico	Área
9,77	Pico 1 – Ácido clorogénico	425 043
10,19	Pico 2 - Ácido clorogénico	1 151 873
10,82	Pico 3 - Ácido clorogénico	477 543

Tabla 14 – Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de una extracción con SUPRA sin dopaje.

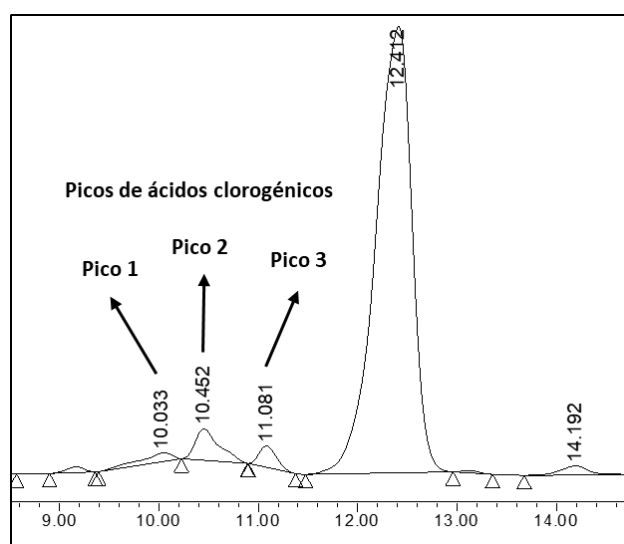
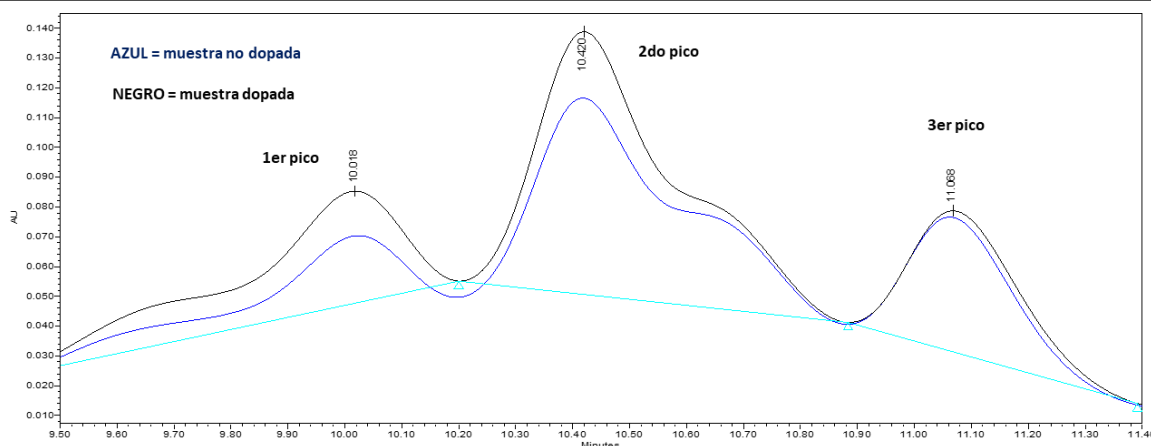


Ilustración 37 - Identificación de los picos del ácido clorogénico en las extracciones con SUPRAS.

En la **Ilustración 37**, es posible identificar los tres picos de ácido clorogénico que se asemejan en relación a los tiempos de retención al patrón utilizado en la construcción de la recta de calibración. En la **Tabla 15**, están reflejados los resultados de la muestra dopada con ácido clorogénico, la franja del tiempo de retención está situada entre 10,02 y 11,07 minutos.

Supras - Con dopaje		
Tiempo de retención (min)	Tipo del pico	Área
10,02	Pico 1 – Ácido clorogénico	744 233
10,42	Pico 2 - Ácido clorogénico	1 495 222
11,07	Pico 3 - Ácido clorogénico	626 967

Tabla 15 – Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de una extracción con SUPRA con dopaje.



Il·lustració 38 - Superposició de los cromatogramas de una muestra dopada y no dopada.

El efecto del dopaje en las muestras del poso de café promueve un aumento simultáneo de los tres picos de ácido clorogénico que se observa en la **Ilustración 38** y que poseen sus tiempos de retención entre 10 y 11 minutos.

El primer pico (pico 1) de la muestra dopada sufrió un aumento de 1,75 veces en relación a su valor de área inicial (muestra sin dopaje), mientras que el segundo y el tercer pico (pico 2 y 3 respectivamente), sufrieron aumentos relativos de sus valores de área iniciales de aproximadamente 1,3 veces.

Debido a este comportamiento del ácido clorogénico, en la determinación del contenido del mismo en las muestras del poso de café, se utilizará como resultado final, **la concentración en ppm de la suma de las áreas de los tres picos del ácido clorogénico.**

5.4. Extracción con AGUA – dopaje con ácido clorogénico

De la misma forma que en las extracciones con solventes SUPRAS, se llevó a cabo un estudio comparativo de extracciones con agua con dopaje y sin dopaje. El objetivo de estos experimentos es el mismo que en el apartado anterior, comprobar cual de los picos de ácido clorogénico se corresponde con el del patrón. El experimento con dopaje se muestra en la **Ilustración 39** y el sin dopaje, en la **Ilustración 40.**

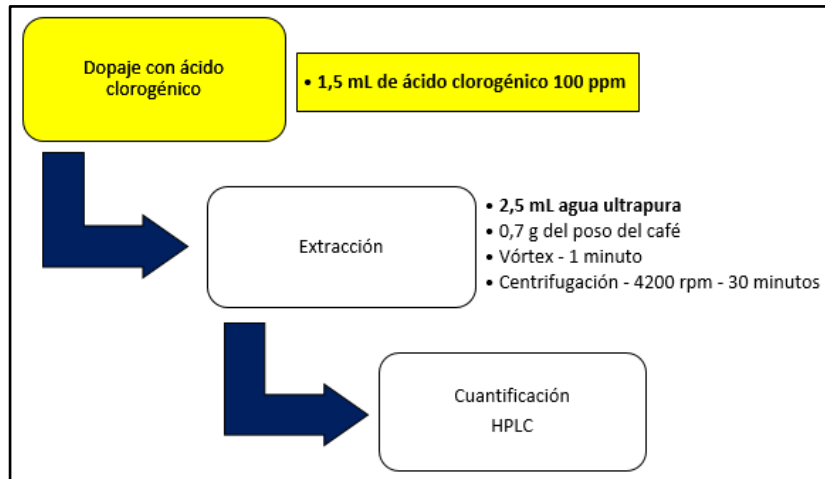


Ilustración 39 - Procedimiento de una extracción con AGUA y con dopaje.

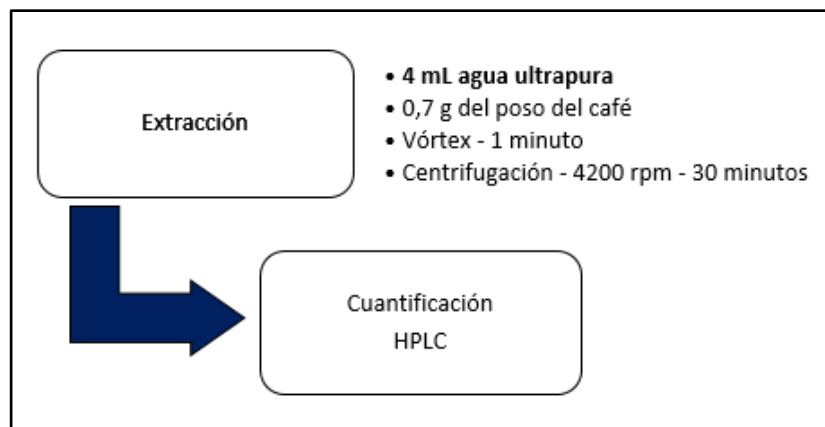


Ilustración 40 - Procedimiento de extracción convencional con AGUA sin dopaje.

AGUA sin dopaje		
Tiempo de retención (min)	Tipo del pico	Área
10,34	Pico 2 - Ácido clorogénico	5 158 298
10,92	Pico 3 - Ácido clorogénico	5 059 809

Tabla 16 – Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de las extracciones con AGUA sin dopaje.

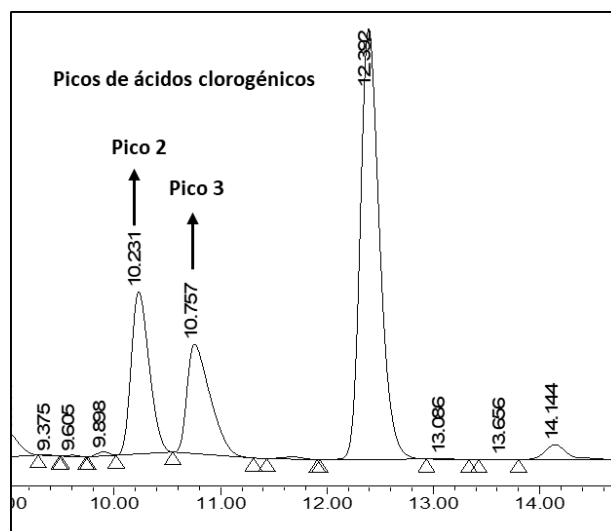


Ilustración 41 - Identificación de los picos del ácido clorogénico en las extracciones con AGUA.

En las extracciones con agua (**Ilustración 41**), el primer pico (pico 1) es prácticamente despreciable mientras que los demás (pico 2 y pico 3) son los que presentan resultados significativos en relación al área y también en relación a los tiempos de retención. El rango del tiempo de retención observado tanto en las extracciones sin dopaje como en las extracciones con dopaje, se encuentra entre 10,27 y 10,92 minutos.

AGUA con dopaje		
Tiempo de retención (min)	Tipo del pico	Área
10,27	Pico 2 - Ácido clorogénico	8 580 370
10,83	Pico 3 - Ácido clorogénico	6 173 900

Tabla 17 - Resultados de los tiempos de retención y de las áreas de los picos de una extracción con AGUA con dopaje.

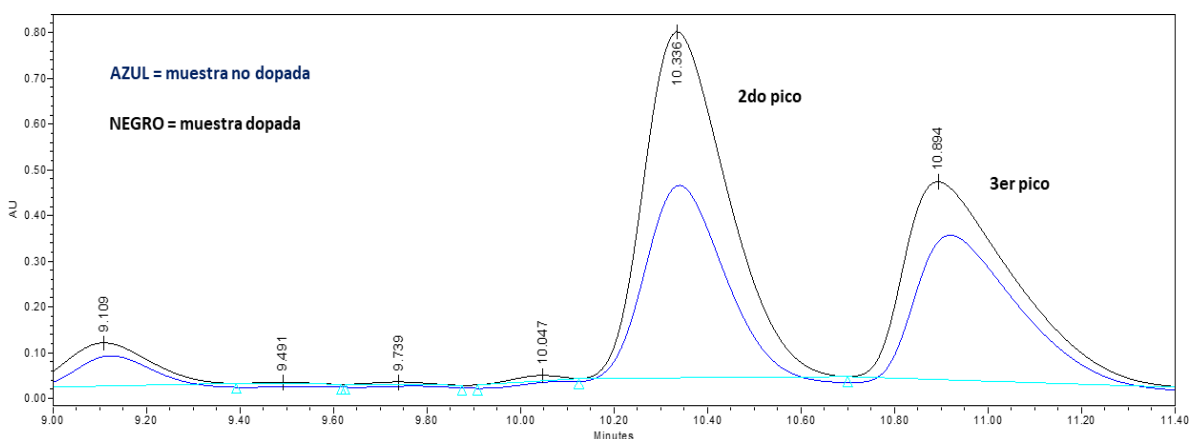


Ilustración 42 - Superposición de los cromatogramas de una muestra dopada y no dopada.

Así como en las extracciones con los solventes SUPRAS, el dopaje en las extracciones con AGUA también aumenta los valores de áreas de forma simultánea pero el efecto es observado solamente en los picos 2 y 3 (ver **Tabla 17** e **Ilustración 42**).

El segundo pico (pico 2) de la muestra dopada obtuvo un aumento de área de 1,6 veces en relación a su valor de área inicial (muestra sin dopaje) y el tercer pico (pico 3), alcanzó un aumento de área de 1,2 veces.

Por lo tanto, para determinar la cantidad de ácido clorogénico extraída en las muestras del poso de café, **se utilizará la suma de las áreas de los 2 picos (pico 2 y 3) para calcular la concentración en ppm de cada experimento.**

5.5. Resultados de extracción con “SUPRAS” - vórtex

Los resultados de las extracciones de ácido clorogénico realizadas en triplicado con los solventes SUPRAS (vórtex) están plasmados en la **Tabla 18**. **El área total representa la suma de las áreas de los tres picos de ácido clorogénico y la concentración total fue calculada en función de la misma.** El valor medio de las extracciones de ácido clorogénico y la cantidad extraída por gramo de muestra de poso de café están reflejados en la **Tabla 19**.

Triplicado 1 - Extracción con SUPRAS - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	11,08	654 989	2 498 101	56	0,132
Pico 2	10,45	1 326 409			
Pico 1	10,03	516 703			
Triplicado 2 - Extracción con SUPRAS - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,73	405 764	2 205 111	50	0,113
Pico 2	10,11	1 169 651			
Pico 1	9,60	629 696			
Triplicado 3 - Extracción con SUPRAS - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,69	360 339	2 207 863	50	0,113
Pico 2	10,08	1 187 008			
Pico 1	9,57	660 516			

Tabla 18 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con SUPRAS (vórtex).

Ácido clorogénico (AC)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
52	3,68	7,07%
mg de AC/g muestra (promedio)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,119	0,011	9,19%

Tabla 19 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con SUPRAS (vórtex).

El proceso con los solventes SUPRAS más vórtex obtuvo un valor promedio de aproximadamente 0,12 miligramos (mg) de ácido clorogénico extraídos por cada gramo (g) de poso de café. En la **Tabla 20**, se muestran los valores obtenidos en las extracciones de cafeína también realizadas en triplicado. Los valores promedios de las extracciones de cafeína están expresados en la **Tabla 21**.

Triplicado 1 - Extracción con SUPRAS - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración total (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,41	28 352 104	352	0,581	0,828
Triplicado 2 - Extracción con SUPRAS - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración total (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,05	26 070 752	322	0,512	0,730
Triplicado 3 - Extracción con SUPRAS - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración total (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,01	26 237 602	324	0,515	0,734

Tabla 20 - Resultados de las extracciones de la cafeína con SUPRAS (vórtex).

Cafeína (Caf)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
333	17,24	5,18%
mg de Caf/g muestra (promedio)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,764	0,055	7,26%

Tabla 21 - Resultados medios de las extracciones de la cafeína con SUPRAS (vórtex).

Con relación a la extracción de la cafeína, los solventes SUPRAS alcanzaron a extraer 0,76 miligramos (mg) de ácido clorogénico para cada gramo (g) de peso de café.

5.6. Resultados de extracción con AGUA – vórtex

A partir de los triplicados de las extracciones de ácido clorogénico con agua (vórtex) se obtuvieron los resultados que están expresados en la **Tabla 22**. A continuación, en la **Tabla 23**, se muestran el valor medio de la concentración de ácido clorogénico y el valor medio de miligramos de ácido clorogénico obtenidos por gramo de peso de café.

Triplicado 1 – Extracción con AGUA – Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,76	6 140 403	13 267 749	291	1,157
Pico 2	10,23	7 127 346			
Triplicado 2 – Extracción con AGUA – Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,92	5 059 809	10 218 107	225	0,854
Pico 2	10,34	5 158 298			
Triplicado 3 – Extracción con AGUA – Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,91	4 949 868	10 106 364	222	0,808
Pico 2	10,33	5 156 496			

Tabla 22 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con AGUA (vórtex).

Ácido clorogénico (AC)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
246	39,25	15,95%
mg de Caf/g muestra (promedio)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,940	0,190	20,18%

Tabla 23 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con AGUA (vórtex).

En las extracciones con vórtex llevadas a cabo con la utilización de agua como disolvente único, el valor extraído de ácido clorogénico fue de 0,94 miligramos (mg) por cada gramo (g) de poso de café. Con relación a los valores de cafeína extraídos en este método, los resultados están reflejados en la **Tabla 24** y también en la **Tabla 25**.

Triplicado 1 - Extracci3n con AGUA - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retenci3n (min)	Área	Concentraci3n (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,39	20 246 506	243	0,668	0,953
Triplicado 2 - Extracci3n con AGUA - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retenci3n (min)	Área	Concentraci3n (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,47	17 674 485	208	0,551	0,786
Triplicado 3 - Extracci3n con AGUA - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retenci3n (min)	Área	Concentraci3n (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,46	17 578 205	206	0,524	0,746

Tabla 24 - Resultados de las extracciones de la cafeína con AGUA (v3rtex).

Cafeína (Caf)		
Concentraci3n total media (ppm)	Desviaci3n est3ndar	Coficiente de variaci3n
219	20,53	9,38%
mg de Caf/g muestra (promedio)	Desviaci3n est3ndar	Coficiente de variaci3n
0,828	0,110	13,26%

Tabla 25 – Resultados medios de las extracciones de la cafeína con AGUA (v3rtex).

En cuanto al valor de cafeína extraído con v3rtex y agua, el resultado fue de aproximadamente 0,83 miligramos (mg) de cafeína para cada gramo (g) de poso de café.

5.7. Resultados de extracción con AGUA – ultrasonido

Los experimentos llevados a cabo con ultrasonido y agua fueron realizados a distintas temperaturas, en la primera tanda de triplicados de ultrasonidos se utilizó agua a temperatura ambiente (23 - 25 °C) y los resultados alcanzados con relación a los ácidos clorogénicos se encuentran en la **Tabla 26** y en **Tabla 27**.

Triplicado 1 - Extracción con ultrasonido a temperatura ambiente - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,89	7 576 806	16 479 494	362	1,342
Pico 2	10,37	8 902 688			
Triplicado 2 - Extracción con ultrasonido a temperatura ambiente - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,86	7 089 262	14 372 893	316	1,072
Pico 2	10,30	7 283 631			
Triplicado 3 - Extracción con ultrasonido a temperatura ambiente - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,88	7 150 991	14 543 977	319	1,047
Pico 2	10,33	7 392 986			

Tabla 26 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (temperatura ambiente).

Ácido clorogénico (AC)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
332	25,60	7,71%
mg de Caf/g muestra (promedio)		
1,154	0,164	14,18%

Tabla 27 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (temperatura ambiente).

En las extracciones de ácido clorogénico con ultrasonido y agua a temperatura ambiente (23 - 25 °C), el resultado obtenido fue de 1,15 miligramos (mg) por cada gramo (g) de poso de café. Con respecto a las extracciones de cafeína con ultrasonido a temperatura ambiente, los resultados conseguidos se encuentran en la **Tabla 28** y en la **Tabla 29**.

Triplicado 1 - Extracción con ultrasonido a temperatura ambiente - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,53	23 703 588	289	0,75	1,064
Triplicado 2 - Extracción con ultrasonido a temperatura ambiente - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,49	22 894 866	278	0,66	0,942
Triplicado 3 - Extracción con ultrasonido a temperatura ambiente - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,49	22 960 520	279	0,64	0,911

Tabla 28 - Resultados de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (temperatura ambiente).

Cafeína (Caf)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
282	6,09	2,16%
mg de Caf/g muestra (promedio)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,972	0,081	8,31%

Tabla 29 - Resultados medios de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (temperatura ambiente).

Con relación a las extracciones de cafeína con ultrasonido y agua a temperatura ambiente (23 - 25 °C), el resultado obtenido fue de 0,97 miligramos (mg) por cada gramo (g) de peso de café. A continuación, en la **Tabla 30** y en la **Tabla 31** se exponen los resultados de las extracciones de ácidos clorogénicos con ultrasonido a 50 °C.

Triplicado 1 - Extracción con ultrasonido a 50 °C - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	11,17	6 231 145	13 465 695	296	1,126
Pico 2	10,62	7 234 550			
Triplicado 2 - Extracción con ultrasonido a 50 °C - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,79	5 928 903	12 813 216	281	1,021
Pico 2	10,28	6 884 313			
Triplicado 3 - Extracción con ultrasonido a 50 °C - Ácido clorogénico (AC)					
Ácidos clorogénicos	Tiempo de retención (min)	Área	Área total	Concentración total (ppm)	mg de AC/g muestra
Pico 3	10,81	5 808 451	12 470 807	274	0,948
Pico 2	10,29	6 662 356			

Tabla 30 - Resultados de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (50 °C).

Ácido clorogénico (AC)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
284	11,60	3,90%
mg de Caf/g muestra (promedio)		
Desviación estándar	Coefficiente de variación	
1,032	0,089	8,67%

Tabla 31 - Resultados medios de las extracciones del ácido clorogénico con ultrasonido (50 °C).

Acerca de las extracciones con ultrasonido y agua a 50 °C, fueron obtenidos de 1,03 miligramos (mg) de ácido clorogénico por cada gramo (g) de peso de café. Respecto a la cafeína, los resultados de las extracciones con ultrasonido a 50 °C están plasmados en la **Tabla 32** y en la **Tabla 33**.

Triplicado 1 - Extracción con ultrasonido a 50 °C - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,72	19 265 943	229	0,61	0,866
Triplicado 2 - Extracción con ultrasonido a 50 °C - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,52	19 632 429	234	0,59	0,839
Triplicado 3 - Extracción con ultrasonido a 50 °C - Cafeína (Caf)				
Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Masa Caf (mg)	mg de Caf/g muestra
12,50	19 345 467	230	0,55	0,784

Tabla 32 - Resultados de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (50 °C).

Cafeína (Caf)		
Concentración total media (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
231	2,61	1,13%
mg de Caf/g muestra (promedio)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,830	0,042	5,04%

Tabla 33 - Resultados medios de las extracciones de la cafeína con ultrasonido (50 °C).

El valor de cafeína extraído en las extracciones con ultrasonido y agua a 50 °C fue de 0,83 miligramos (mg) por cada gramo de poso de café. El efecto de la temperatura en los experimentos con ultrasonido no resultó en ninguna mejora con relación a los valores obtenidos en las extracciones de ácido clorogénico y cafeína, tanto en función de la concentración como en función de la masa extraída por gramo de poso de café, los experimentos con ultrasonido a temperatura ambiente tuvieron los mejores resultados.

5.8. Comparación de los distintos métodos de extracción ensayados

En la **Tabla 34**, se refleja el resumen de los métodos de extracción y los resultados en función de la concentración total y en función de la masa de ácido clorogénico y cafeína por gramo de poso de café. Estos resultados son la media aritmética de tres experimentos realizados y se muestran juntamente con la desviación estándar y el coeficiente de variación. La desviación estándar mide la dispersión de los valores con respecto a la media y cuanto más alto este valor, más dispersos están los valores. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Donde:

S = desviación estándar

N = número de muestras

X = valor observado

\bar{X} = valor medio

El coeficiente de variación es el equivalente a la desviación estándar expresada en porcentaje respecto a la media y se calcula según la fórmula:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}}$$

Donde:

CV = coeficiente de variación

S = desviación estándar

\bar{X} = valor medio

Ácido clorogénico (AC)						
Tipo de extracción	Concentración total media (ppm)	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	mg AC/g muestra	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación
SUPRAS + vórtex	52	3,68	7,07%	0,119	0,011	9,19%
AGUA + vórtex	246	39,25	15,95%	0,940	0,190	20,18%
Ultrasonido Temp. Ambiente	332	25,60	7,71%	1,154	0,164	14,18%
Ultrasonido - 50 °C	284	11,06	3,90%	1,032	0,089	8,67%
Cafeína (Caf)						
Tipo de extracción	Concentración total (ppm)	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	mg Caf/g muestra	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación
SUPRAS + vórtex	333	17,24	5,18%	0,764	0,055	7,26%
AGUA + vórtex	219	20,53	9,38%	0,828	0,110	13,26%
Ultrasonido Temp. Ambiente	282	6,09	2,16%	0,972	0,081	8,31%
Ultrasonido - 50 °C	231	2,61	1,13%	0,830	0,042	5,04%

Tabla 34 - Resumen de los resultados de las extracciones del ácido clorogénico y de la cafeína.

La extracción llevada a cabo con agua (método vórtex) en la obtención del ácido clorogénico y de la cafeína presentaron los resultados más elevados con relación a la desviación estándar y al coeficiente de variación. En cuanto a los resultados expresados en concentración, la extracción con agua obtuvo un 39,25 de desviación estándar para el ácido clorogénico y un 20,53 para la cafeína, lo que representa un 15,95% de coeficiente de variación y un 9,38% respectivamente.

Respecto a los resultados expresados en miligramos de analito por gramo de muestra, los valores de las desviaciones estándares para el ácido clorogénico y para la cafeína fueron de 0,190 y 0,110 respectivamente. El coeficiente de variación para el ácido clorogénico fueron un 20,18% y para la cafeína un 13,26%.

A continuación, en la **Ilustración 43** e **Ilustración 44** se presentarán los resultados comparativos entre los distintos métodos de extracción probados en la etapa experimental de este proyecto.

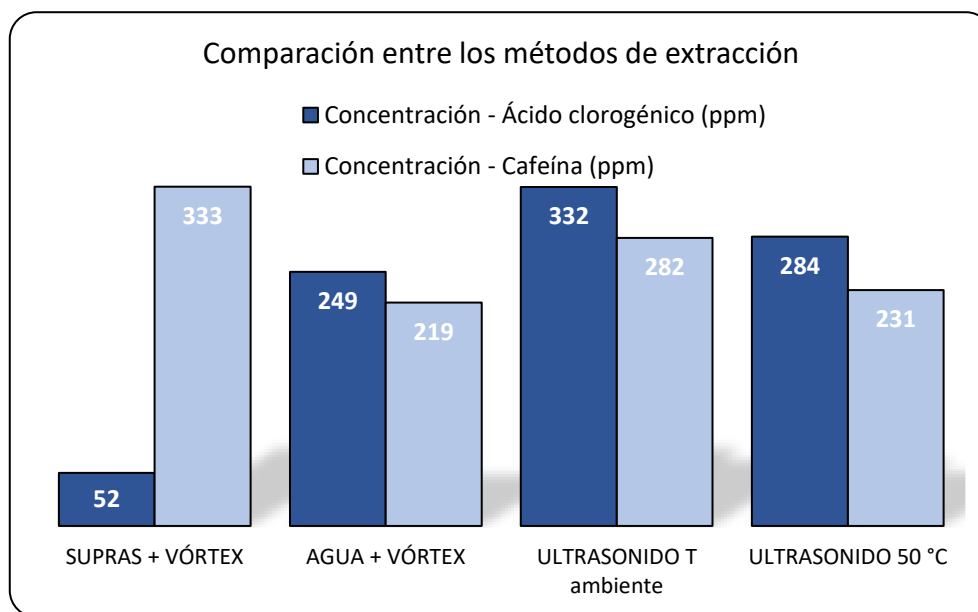


Ilustración 43 - Comparación entre los métodos de extracción en función de la concentración.

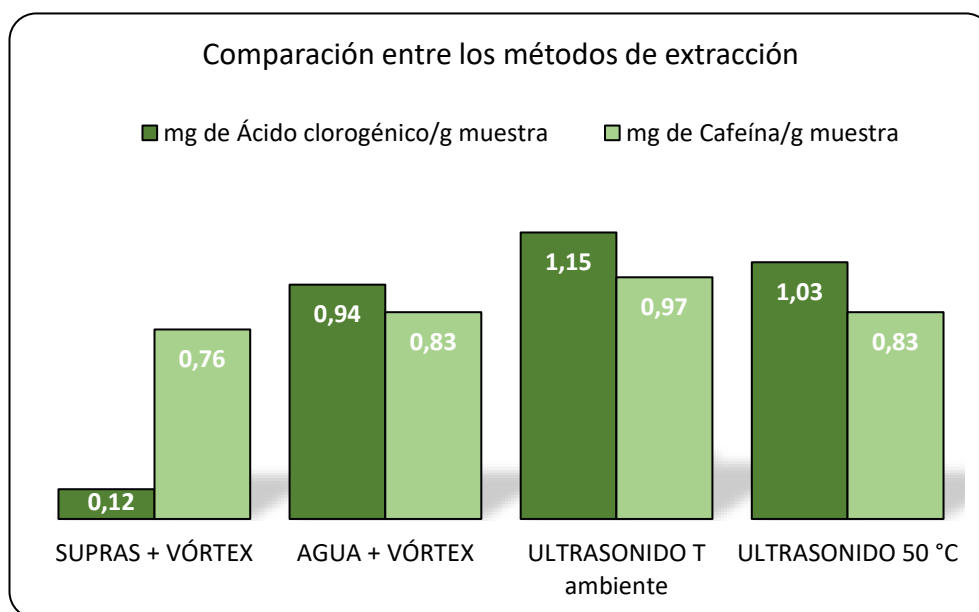


Ilustración 44 - Comparación entre los métodos de extracción en función de la masa.

Respecto a la extracción del ácido clorogénico, el método que arrojó mejor resultado, tanto en función de la concentración como de la masa de analito, fue el ejecutado con ultrasonido a temperatura ambiente, 332 ppm y 1,154 mg/g de peso de café respectivamente.

Con relación a la cafeína, la extracción con los solventes SUPRAS obtuvo el mayor valor en función de la concentración (333 ppm) mientras que, la extracción llevada a cabo con ultrasonido a temperatura ambiente, presentó mayor valor respecto a la masa de analito extraída (0,972 mg/g de peso de café).

Curiosamente los solventes "SUPRAS" van mejor para poder obtener una concentración más elevada de cafeína (332 ppm), cosa que puede resultar interesante para alguna utilización de este compuesto que requiera aplicarla a altas concentraciones y que tenga en cuenta la presencia de otros compuestos en el extracto.

Tanto la extracción del ácido clorogénico como la de la cafeína no es selectiva, es decir, el extracto obtenido tendrá otros componentes que están presentes en el poso de café, como, por ejemplo, los ácidos ferúlico, cumárico y otros isómeros de los ácidos clorogénicos.

Según unos de los artículos de Ballesteros et al. (2019), los valores máximos de extracción de ácidos clorogénicos y cafeína obtenidos fueron de 4,3 mg/g de muestra y 3,32 mg/g respectivamente. Es importante considerar algunos aspectos que diferencian dicho artículo y el presente proyecto, que son:

- Método de preparación del café (obtención del poso);
- Tipo de café;
- Centrifugación;
- Condiciones de la fase móvil (HPLC).

El poso de café utilizado en este proyecto fue obtenido de una máquina de café expreso y el tipo de café utilizado fue una mezcla de cafés arábigos y robusta local mientras que el utilizado en el artículo se produjo mediante filtración y el origen del café es colombiano 100% arábica. La máxima centrifugación conseguida fue de 4 200 rpm mientras que, en el artículo anteriormente citado, la centrifugación fue de 4 519 g (5 799 rpm). En cuanto a las condiciones de la fase móvil, ver apartado **5.2.1. Condiciones para la fase móvil.**

5.9. Resultados de las recuperaciones de ácido clorogénico en la fase "SUPRA"

Debido a que los resultados anteriores muestran que la extracción con solventes SUPRAS consigue extraer menor cantidad de ácido clorogénico que la extracción con agua, se realizaron una serie de experimentos denominados recuperaciones para medir la afinidad de la fase SUPRA por el ácido clorogénico.

Las recuperaciones consistieron en una simulación por triplicado de una extracción con los solventes SUPRAS sin la adición del poso de café, pero, con la adición de una alícuota de aproximadamente 1 mL de una solución de 100 ppm de ácido clorogénico.

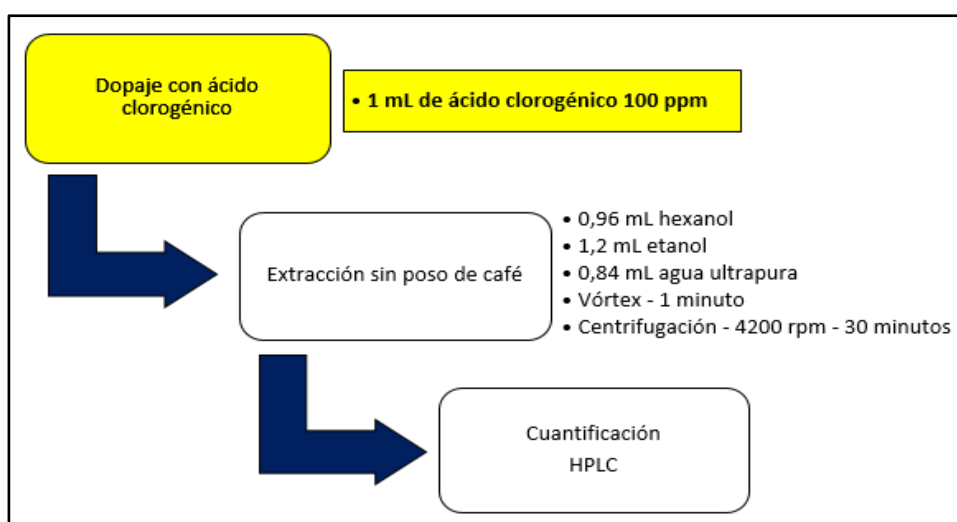


Ilustración 45 - Procedimiento de preparación de las recuperaciones del ácido clorogénico.

Muestra	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (ppm)	Ácido clorogénico en la fase "SUPRA" (mg)	Ácido clorogénico añadido (mg)	Recuperación
Recuperación 1	10,21	886 635	18,84	0,0341	0,1003	33,96%
Recuperación 2	10,26	918 981	19,55	0,0353	0,1003	35,23%
Recuperación 3	10,33	826 953	17,54	0,0317	0,1003	31,60%

Tabla 35 - Resultados de los tiempos de retención y del área de las recuperaciones del ácido clorogénico.

En la **Tabla 35**, están presentes los resultados conseguidos en los triplicados de las recuperaciones del ácido clorogénico presente en la fase superior que se denomina fase "SUPRA". Los valores de los tiempos de retención son bastantes similares entre ellos, así como el valor del área y consecuentemente, los valores de concentración.

También en la **Tabla 35**, se muestran los porcentajes de recuperación del ácido clorogénico en la fase "SUPRA" con relación a cantidad inicial añadida en cada experimento. Solo se consigue recuperar en la fase "SUPRA" aproximadamente el 34% del total de ácido clorogénico añadido, por lo tanto, queda en 66% del ácido clorogénico en la fase inferior (fase "INFRA"). Esto demuestra que la fase con mayor afinidad con el ácido clorogénico es esta última.

Es por ello que se realizaron tres nuevos experimentos de extracción con poso de café en los que se midió la cantidad de ácido clorogénico y de cafeína presente en cada una de las dos fases: supra e infra. En la **Tabla 36**, se muestran los resultados medios comparativos de las fases inferior y superior de las extracciones llevadas a cabo con solventes SUPRAS.

Ácido clorogénico (AC)		
Tipo de fase	Concentración total (ppm)	mg AC/g muestra
Fase superior "SUPRA"	49	0,118
Fase inferior "INFRA"	119	0,187
Cafeína (Caf)		
Tipo de fase	Concentración total (ppm)	mg Caf/g muestra
Fase superior "SUPRA"	370	0,885
Fase inferior "INFRA"	355	0,352

Tabla 36 - Resultados de las extracciones con los solventes SUPRAS - fases inferior y superior.

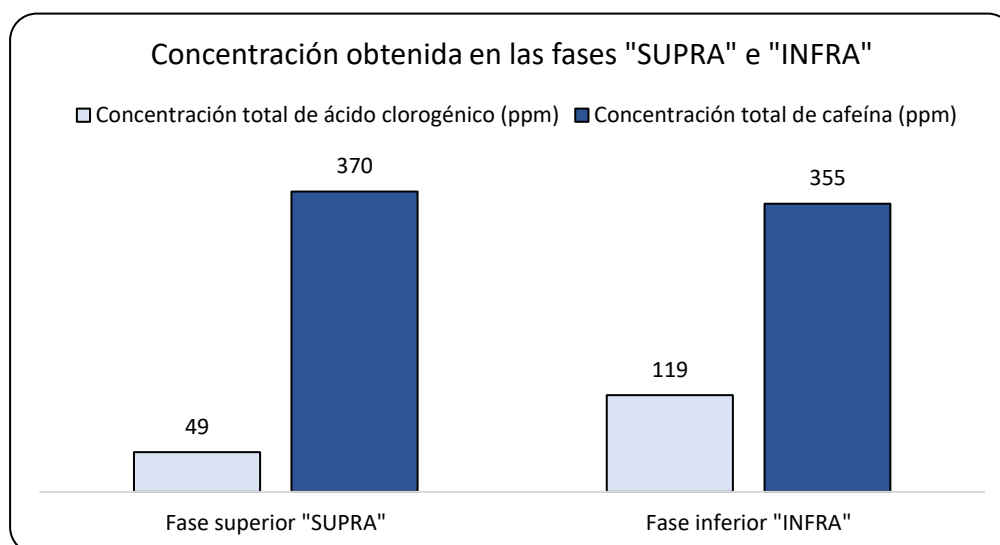
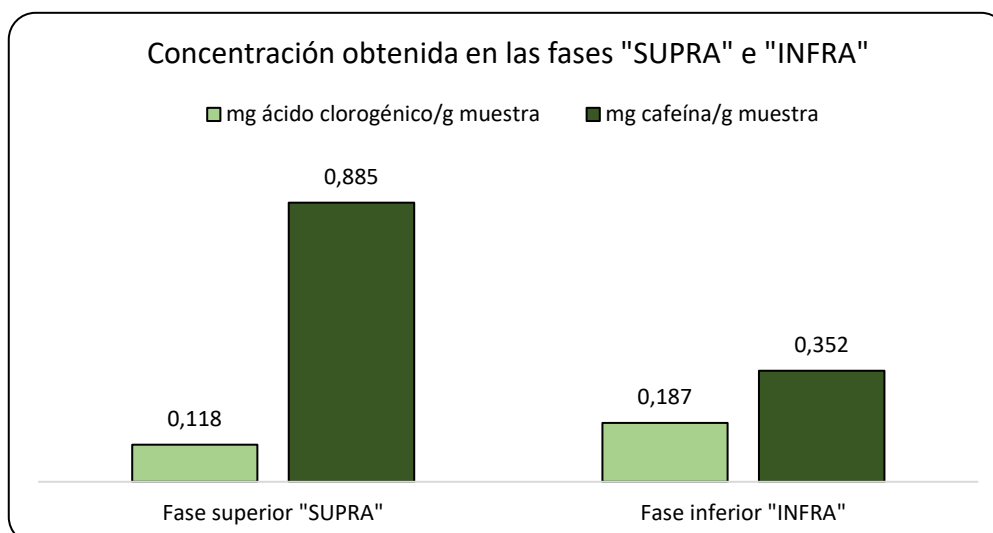


Ilustración 46 - Concentración de las extracciones del ácido clorogénico y de la cafeína en las fases inferior y superior.



Il·lustraci3n 47 - Masa extra3da en las extracciones del 3cido clorog3nico y de la cafe3na en las fases inferior y superior.

En cuanto a la concentraci3n de la cafe3na, tanto la fase superior ("SUPRA") como la fase inferior ("INFRA"), presentan pr3cticamente los mismos resultados, alrededor de 370 ppm (ver **Il·lustraci3n 46**). Respecto a la cantidad de la masa de cafe3na extra3da (**Il·lustraci3n 47**), la fase superior ("SUPRA") obtuvo 2,5 veces m3s cafe3na que la fase inferior ("INFRA").

En consideraci3n a las extracciones de 3cido clorog3nico, la fase inferior ("INFRA") alcanz3 los mejores resultados tanto en funci3n de la concentraci3n como en funci3n de la masa obtenida. Esto representa 2,4 veces m3s de 3cido clorog3nico con relaci3n a la concentraci3n (ver **Il·lustraci3n 46**) y 1,58 veces con relaci3n a la masa de este (ver **Il·lustraci3n 47**).

6. Conclusiones

En primer lugar, cabe destacar que se realizó una extensa búsqueda bibliográfica de los métodos de extracción descritos para obtener ácido clorogénico y cafeína a partir del poso de café. Analizando aproximadamente unos 12 artículos publicados en revistas internacionales, se puede concluir que:

- Se han aplicado distintos métodos de extracción en ellos, unos más convencionales que otros, llegando a extraer cantidades muy diferentes de ácido clorogénico y de cafeína (entre 0,93 y 214 mg/g de ácidos clorogénicos y 6,94 mg/g de cafeína);
- Los tiempos de extracción van desde los 20 min a las 6 h;
- Los disolventes más frecuentes son las mezclas de etanol-agua en distintas proporciones.

De acuerdo con los resultados alcanzados en la parte experimental del presente proyecto, se ha podido verificar que la extracción con ultrasonido y agua a temperatura ambiente resultó el mejor método de obtención de ácidos clorogénicos y cafeína en un poso de café.

La masa de cafeína extraída con ultrasonido fue de 0,972 mg/g de poso café mientras que, con los solventes SUPRAS, el valor obtenido fue de 0,764 mg/g de poso café. Esto representa casi un 27% más de extracción con el ultrasonido.

Respecto a la masa de ácido clorogénico obtenida del poso de café, en la extracción con ultrasonido se ha conseguido obtener 1,15 mg/g de poso café, lo que representa casi 10 veces más que lo que se obtuvo con los solventes SUPRAS (0,119 mg/g muestra).

En cuanto a concentraciones, la tecnología de los solventes SUPRAS (novedosa, de fácil aplicación y muy versátil), consigue un extracto con 333 ppm de cafeína extraída del poso de café, en comparación a los 282 ppm obtenidos con la técnica de ultrasonido a temperatura ambiente.

Tanto la cafeína como el ácido clorogénico presentan momentos dipolares en su estructura química y debido a esta característica los mayores valores de extracción de ambos productos fueron obtenidos utilizando el agua como disolvente principal, en ambas extracciones (vórtex y ultrasonido a distintas temperaturas).

En el caso de la cafeína, la presencia de grupos carbonilo y de nitrógenos en su molécula hacen que la misma presente cierta polaridad y afinidad por ciertos disolventes polares, como, por ejemplo, el agua. El ácido clorogénico posee en su estructura molecular enlaces de hidrógeno (átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo electronegativo), cosa que asigna a este tipo de analito mucha afinidad por disolventes polares.

Aunque los resultados obtenidos con relación a la masa de los productos extraídos sean bajos (alrededor de 1 mg de producto/gramo de muestra), debido a la facilidad de aplicar las técnicas de extracción anteriormente citadas y de la posibilidad de aumentar la eficiencia de extracción, el poso de café puede ser una materia prima de gran interés futuro, ya que se generan muchas toneladas de este material que todavía sigue siendo tratado como desecho.

Las principales recomendaciones para futuros trabajos son las siguientes:

- Ensayar nuevas mezclas de solventes en las extracciones “SUPRAS”, para ver si se consigue mejorar los resultados;
- Aumentar el tiempo de extracción con el vórtex;
- Identificar los disolventes más afines a la cafeína y al ácido clorogénico y ensayar estos nuevos disolventes en extracciones asistidas por ultrasonido;
- Para cada uno de los casos anteriores deberán ajustarse nuevamente las condiciones de cuantificación mediante HPLC para una correcta separación de los picos.

7. Agradecimientos

En primer lugar, a mis tutoras, la Dra. Rita Puig Vida y la Dra. María Rosa Cantero Gómez por las incontables horas de trabajo en laboratorio y por todo el esfuerzo y paciencia en el desarrollo de este trabajo.

En segundo lugar, a mi familia y a mis amigos, por todos los momentos de ayuda a lo largo de los años del grado universitario.

También, expresar mi más sentido agradecimiento a la Dra. María Reyes por todo su apoyo en la etapa experimental, a la Doctoranda Ibtissam Bouzham por las horas dedicadas en laboratorio, a mi compañera de piso Isabella Nieto y al equipo de investigación de la Cátedra A3.

8. Bibliografía

- [1] Asociación Española del Café (AECafé), “Cafeto, fruto y grano - AECafé.” <https://www.asociacioncafe.com/cafeto-fruto-y-grano/> (accessed Mar. 04, 2021).
- [2] O. Organización Internacional del Café, “Datos de la producción mundial del café,” 2020.
- [3] K. M. Andrade Gómez, “Evaluación de los parámetros tiempo, temperatura y variedad de café arábica coffea arábica castillo y típica en el proceso de tostado,” Universidad Técnica Del Norte, 2018.
- [4] M. R. Gewandsznajder and P. F. B. Pires, “IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE OPORTUNIDADES PARA A VALORIZAÇÃO DA BORRA DO CAFÉ NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO,” Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.
- [5] “Fruta del café conoce la anatomía de la fruta y la semilla del café.” <https://sehablacafe.com/hablemos/anatomia-de-la-fruta-y-semilla-del-cafe/> (accessed Jul. 04, 2021).
- [6] L. Blinová, M. Sirotiak, A. Bartošová, and M. Soldán, “Review : Utilization of Waste From Coffee Production,” *Res. Pap.*, vol. 25, no. 40, pp. 91–102, 2017.
- [7] S. Perta-Crisan, C. Ursachi, and F.-D. Munteanu, “Trends in Valorisation of Spent Coffee Grounds: a Review,” *Scien. Tech. Bull-Chem. Food Sci. Eng*, vol. 16, no. Xvii, pp. 29–40, 2019, [Online]. Available: <https://www.statista.com/chart/8602/top->.
- [8] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principios de Bioquímica*, Terceira. Sao Paulo, 2002.
- [9] L. F. Ballesteros, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, “Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 7, no. 12, pp. 3493–3503, 2014, doi: 10.1007/s11947-014-1349-z.
- [10] S. Rivas, “Valorización de hemicelulosas de biomasa vegetal internacional doctoral thesis biomass hemicellulose valorization,” p. 363, 2014, [Online]. Available: [http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/141/Valorización de hemicelulosas de biomasa vegetal.pdf?sequence=1](http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/141/Valorización%20de%20hemicelulosas%20de%20biomasa%20vegetal.pdf?sequence=1).
- [11] F. J. Cerino-Córdova, N. E. Dávila-Guzmán, A. M. García León, J. J. Salazar-Rabago, and E. Soto-Regalado, “Revalorization of Coffee Waste,” *Coffee - Prod. Res.*, pp. 1–26, 2020, doi: 10.5772/intechopen.92303.

- [12] E. Marcelo, E. Y. Aplicaciones, M. D. E. Despolimerización, and P. La, *Lignina, estructura y aplicaciones - métodos de polimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial*, vol. 4, no. 4. 2013.
- [13] R. W. Jenkins, N. E. Stageman, C. M. Fortune, and C. J. Chuck, "Effect of the type of bean, processing, and geographical location on the biodiesel produced from waste coffee grounds," *Energy and Fuels*, vol. 28, no. 2, pp. 1166–1174, 2014, doi: 10.1021/ef4022976.
- [14] R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H. A. Vergara-Castañeda, and B. Dave Oomah, "Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 1, pp. 24–36, 2015, doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.012.
- [15] I. Martínez-Valverde, M. J. Periago, and G. Ros, "Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta," *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 50, no. 1, pp. 5–18, 2000, Accessed: Mar. 21, 2021. [Online]. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000100001.
- [16] D. A. Martín Gordo, "Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica," *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.*, vol. 9, no. 1, pp. 81–104, 2018, doi: 10.22490/21456453.1968.
- [17] A. R. Rodríguez, "Efecto de los frutos de Acacia farnesiana en la dieta caprina : presencia de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de la leche," no. November, p. 142, 2017.
- [18] J. H. Low, W. A. W. A. Rahman, and J. Jamaluddin, "Structural elucidation of tannins of spent coffee grounds by CP-MAS 13C NMR and MALDI-TOF MS," *Ind. Crops Prod.*, vol. 69, no. July 2015, pp. 456–461, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.001.
- [19] A. Kovalcik, S. Obruca, and I. Marova, "Valorization of spent coffee grounds: A review," *Food Bioprod. Process.*, vol. 110, pp. 104–119, 2018, doi: 10.1016/j.fbp.2018.05.002.
- [20] J. G. Collado, "Identificación De Polifenoles En Frutas Rojas."
- [21] A. Farah and C. M. Donangelo, "Phenolic compounds in coffee 1," 2006.
- [22] M. Gotteland and S. De Pablo V., "Algunas verdades sobre el café," *Revista Chilena de Nutricion*, vol. 34, no. 2. Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología, pp. 105–115, Jun. 2007, doi: 10.4067/s0717-75182007000200002.
- [23] "Síntesis de materiales mesoporosos ordenados silíceos con cafeína micelada encapsulada."
- [24] R. Moratalla, "Neurobiología de las metilxantinas," Ediciones Doyma, S.L., Jul. 2008. doi: 10.1016/S1575-0973(08)76368-2.

- [25] C. Márquez, C. Otero, B. Rojano, and J. Osorio, "Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* s.) en poscosecha," *Temas Agrar.*, vol. 19, no. 2, pp. 173–184, 2014, doi: 10.21897/rta.v19i2.732.
- [26] M. Coronado H., S. Vega Y León, R. Gutiérrez T., V. F. Marcela, and C. Radilla V., "Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 42, no. 2, pp. 206–212, 2015, doi: 10.4067/S0717-75182015000200014.
- [27] E. Carolina Chaves-Ulate and P. Esquivel-Rodríguez, "Chlorogenic acids present in coffee: Antioxidant and antimicrobial capacity," *Agron. Mesoamerican*, vol. 30, no. 1, pp. 299–311, 2019, doi: 10.15517/am.v30i1.32974.
- [28] S. M. V. Cruz, "Evaluación de la actividad antioxidante y detección de marcadores químicos en extractos de hojas y granos de siete variedades de café comercializadas en Guatemala," 2018.
- [29] L. F. Ballesteros, M. J. Ramirez, C. E. Orrego, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, "Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds," *J. Food Eng.*, vol. 199, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.11.014.
- [30] F. Acevedo *et al.*, "Spent coffee grounds as a renewable source of bioactive compounds," *J. Biobased Mater. Bioenergy*, vol. 7, no. 3, pp. 420–428, 2013, doi: 10.1166/jbmb.2013.1369.
- [31] A. Zorro and R. Lavecchia, "Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy," *J. Clean. Prod.*, vol. 34, pp. 49–56, 2012, doi: 10.1016/j.jclepro.2011.12.003.
- [32] A. Panusa, A. Zorro, R. Lavecchia, G. Marrosu, and R. Petrucci, "Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 17, pp. 4162–4168, 2013, doi: 10.1021/jf4005719.
- [33] S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins, and J. A. Teixeira, "Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 83, no. 1, pp. 173–179, 2011, doi: 10.1016/j.seppur.2011.09.036.
- [34] K. S. Andrade, "Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica* L.)," 2011.
- [35] H. Xu, W. Wang, X. Liu, F. Yuan, and Y. Gao, "Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction," *Ind. Crops Prod.*, vol. 76, pp. 946–954, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.054.
- [36] Y. F. Shang, J. L. Xu, W. J. Lee, and B. H. Um, "Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction," *South African J. Bot.*, vol. 109, pp. 75–80, 2017,

- doi: 10.1016/j.sajb.2016.12.011.
- [37] A. S. Caballero-Galván, D. L. Restrepo-Serna, M. Ortiz-Sánchez, and C. A. Cardona-Alzate, "Analysis of Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (*Coffea arabica*)," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 9, no. 12, pp. 2381–2389, 2018, doi: 10.1007/s12649-018-0332-8.
- [38] N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, and P. Maran Jeganathan, "Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 206–213, 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.05.005.
- [39] M. D. Pavlović, A. V. Buntić, S. S. Šiler-Marinković, and S. I. Dimitrijević-Branković, "Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 118, pp. 503–510, 2013, doi: 10.1016/j.seppur.2013.07.035.
- [40] T. Conde and S. I. Mussatto, "Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 46, no. 4, pp. 406–409, 2016, doi: 10.1080/10826068.2015.1084514.
- [41] J. C. Manrique, Palacios and R. Sanchez Vilca, "Diseño, construcción y evaluación de parámetros de operación de un equipo de extracción sólido-líquido para el laboratorio de procesos unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del centro del Perú," *Univ. Nac. Del Cent. Del Cent. Posgrado*, pp. 10–11, 2008, [Online]. Available: http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/217/T-08_13.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- [42] N. C. Medina Torres, "Efecto del Ultrasonido en la Extracción y Nanoencapsulación de Polifenoles de Limón Persa (*Citrus Latifolia*)," *Cent. Investig. y Asist. en Tecnol. y Diseño del estado Jalisco, A. C.*, pp. 1–131, 2017.
- [43] T. S. Awad, H. A. Moharram, O. E. Shaltout, D. Asker, and M. M. Youssef, "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review," *Food Res. Int.*, vol. 48, no. 2, pp. 410–427, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2012.05.004.
- [44] E. G. Romera, A. G. Ballesteros, and S. Rubio, "62 - Biodisolvantes supramoleculares de ramnolípidos - síntesis y caracterización.pdf."
- [45] D. A. V. Medina, L. F. R. Cabal, D. M. Sartore, A. M. Lima, and Á. J. dos Santos, "Solventes supramoleculares: Uma alternativa na microextração em fase líquida para análises

- cromatogràficas," *Sci. Chromatogr.*, vol. 9, no. 2, pp. 83–100, 2017, doi: 10.4322/sc.2017.008.
- [46] L. VILLAMIZAR R and F. MARTÍNEZ R, "Determination of the Basic Conditions for Microencapsulation of an Entomopathogenic Baculovirus By Means of Coacervation Using Eudragit S100®," *Vitae*, vol. 15, no. 1, pp. 123–131, 2008.
- [47] C. P. Pássaro *et al.*, "GUÍA SOBRE PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA Y SUS APLICACIONES," Rionegro, 2016. Accessed: Jul. 26, 2021. [Online]. Available: [moz-extension://15b89a27-5389-4d1f-bb7a-e89f8beb3ad9/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2F repositorio.sena.edu.co%2Fbitstream%2Fhandle%2F11404%2F4694%2Fguia_cromatograf%25EDa.pdf%3Bjsessionid%3DAF23BA7AF2C1C739B00E8BDCFFC73E4F%3Fsequence%3D1](https://15b89a27-5389-4d1f-bb7a-e89f8beb3ad9/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2F repositorio.sena.edu.co%2Fbitstream%2Fhandle%2F11404%2F4694%2Fguia_cromatograf%25EDa.pdf%3Bjsessionid%3DAF23BA7AF2C1C739B00E8BDCFFC73E4F%3Fsequence%3D1).
- [48] D. Suarez Ospina and Y. Morales Hernández, "PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS BASIC PRINCIPLES OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION AND ANALYSIS OF MIXTURES," *América Rev. Semilleros Form. Investig.*, vol. 4, 2018.
- [49] L. S. Torres-Valenzuela, A. Ballesteros-Gómez, A. Sanin, and S. Rubio, "Valorization of spent coffee grounds by supramolecular solvent extraction," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 228, no. June, p. 115759, 2019, doi: 10.1016/j.seppur.2019.115759.