

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN CON
SOLUCIONES DE ETANOL, DE UN SUBPRODUCTO DEL
PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE CAFÉ, PARA OBTENER UN
EXTRACTO DE ANTOCIANINAS Y ÁCIDO CLOROGÉNICO**

Elaborado por:
Stephany Gutiérrez Matamoros
Carné A82915

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica
2020

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Elaborado por:

Stephany Gutiérrez Matamoros

Aprobado por:

Ph.D. Jessie Usaga Barrientos

Presidente del Tribunal

Ing. Eduardo Thompson Vicente

Director del Proyecto

Licda. Ana María Quirós Blanco

Asesora del Proyecto

Lic. Johan Jiménez Arias

Asesor del Proyecto

M.Sc. Carolina Cortés Herrera

Profesor Designado

Índice General

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
Índice de Cuadros	v
Índice de Figuras.....	vii
Nomenclatura.....	ix
Resumen.....	x
1. Justificación.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. Marco teórico.....	5
3.1. Generalidades del café	5
3.2. Procesamiento del café.....	5
3.3. Subproductos del procesamiento del café	7
3.4. Compuestos funcionales presentes en la pulpa de café.....	9
3.4.1. Polifenoles	9
3.5. Extracción sólido-líquido de compuestos funcionales.....	14
3.6. Variables del proceso de extracción.....	16
3.6.1. Relación disolvente-sólido.....	16
3.6.2. Temperatura	16
3.6.3. Tiempo	17
3.6.4. Tamaño de partícula.....	17
3.6.5. Valor de potencial de hidrógeno (pH)	18
3.6.6. Agitación del medio.....	18
3.6.7. Naturaleza del solvente.....	18
3.7. Extracción asistida por ultrasonido	20

3.8.	Métodos de análisis estadístico de las condiciones de extracción sólido líquido ..	23
4.	Materiales y métodos.....	25
4.1.	Localización del proyecto	25
4.2.	Materia prima	25
4.3.	Equipo de extracción.....	26
4.4.	Procedimiento de extracción	27
4.5.	Prueba de discriminación Plackett-Burman	28
4.6.	Evaluación de las variables de extracción mediante un diseño central compuesto rotatable (DCCR)	31
4.7.	Modelado de las cinéticas de extracción	35
4.8.	Métodos de análisis	37
4.8.1.	Determinación de humedad	37
4.8.2.	Determinación de pH	37
4.8.3.	Determinación de sólidos solubles (°Brix)	37
4.8.4.	Determinación de azúcares solubles	37
4.8.5.	Determinación de cenizas totales.....	37
4.8.6.	Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)	38
4.8.7.	Determinación de cafeína	38
4.8.8.	Determinación del contenido de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)	38
4.8.9.	Determinación del contenido de cianidina-3-rutinósido (C3R).....	39
5.	Discusión de resultados	40
5.1.	Prueba de discriminación de variables con el diseño de Plackett-Burman (PB) ...	40
5.2.	Evaluación del diseño central compuesto rotatable (DCCR).....	46
5.2.1.	Modelo para el ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA).....	48
5.2.2.	Modelo para la cianidina 3-rutinósido (C3R)	51
5.2.3.	Zona máxima de extracción y función de deseabilidad	54
5.2.4.	Caracterización del extracto obtenido durante la validación de los modelos .	56
5.3.	Modelos de las cinéticas de extracción	59

6.	Conclusiones.....	64
7.	Recomendaciones	65
8.	Referencias	66
9.	Anexos.....	78

Índice de Cuadros

Cuadro I. Composición general de la pulpa de café	8
Cuadro II. Variables independientes y los niveles que se evaluaron con el método Plackett-Burman.....	30
Cuadro III. Descripción de las condiciones que serán aplicadas en cada corrida estándar, y su orden aleatorio.....	30
Cuadro IV. Variables independientes con los valores codificados y sus valores reales utilizadas para el diseño de optimización.	32
Cuadro V. Diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de ácido clorogénico y la cianidina-3-rutinósido del subproducto del café.	33
Cuadro VI. Gradiente de fase móvil empleado para el análisis de los compuestos de interés	39
Cuadro VII. Parámetros de bondad de ajuste, efectos y probabilidades obtenidos al aplicar la prueba estadística al modelo Plackett-Burman para cada variable respuesta.	40
Cuadro VIII. Parámetros de bondad y ajuste para cada variable respuesta del diseño central compuesto rotatable (20 corridas) y excluyendo el punto de mayor influencia de acuerdo con el criterio de Cook.....	46
Cuadro IX. Probabilidades resultantes para las variables independientes y sus interacciones.	48
Cuadro X. Validación del modelo matemático descriptor de la extracción de los compuestos 5-CQA y C3R presentes en la pulpa de café, US: 59 %, T: 58 °C y EtOH: 48 %	56
Cuadro XI. Características fisicoquímicas de los extractos etanólicos provenientes de la prueba de verificación del modelo de superficie de respuesta.....	57
Cuadro XII. Rango del contenido de compuestos de interés presentes en los extractos del residuo y en el jugo del prensado de la pulpa del café.	59

Cuadro XIII. Parámetros estadísticos del modelo de Peleg y Patricelli aplicado a cada variable respuesta (n=3).....	60
Cuadro XIV. Valores obtenidos de ácido 5-cafeoilquínico y cianidina 3-rutinósido, a partir de las combinaciones de factores para la prueba de discriminación Plackett-Burman.	78
Cuadro XV. Efecto estimado para cada variable independiente para el modelo del 5-CQA.	79
Cuadro XVI. Análisis de varianza del modelo diseñado con Plackett-Burman para el 5-CQA.	80
Cuadro XVII. Efecto estimado para cada variable independiente para el modelo del C3R.	81
Cuadro XVIII. Análisis de varianza del modelo diseñado con Plackett-Burman para el C3R.	81
Cuadro XIX. Resultados obtenidos de cada variable respuesta para las diferentes condiciones de ultrasonido, temperatura y concentración de etanol utilizadas en la optimización de la extracción en estudio.	83
Cuadro XX. Análisis de varianza y de la falta de ajuste para el C5Q.	84
Cuadro XXI. Análisis de varianza y de la falta de ajuste para el C3R.	84
Cuadro XXII. Resultados del análisis de regresión no lineal de los modelos utilizados para la extracción de cada variable respuesta.	86

Índice de Figuras

Figura 1. Descripción del fruto del café	6
Figura 2. Distribución de compuestos fenólicos.....	10
Figura 3. Estructura química del ácido 5-cafeoilquínico	11
Figura 4. Estructura química del flavilio o base de aglicona (antocianidina).....	13
Figura 5. Estructura química de la cianidina 3-rutinósido.....	14
Figura 6. Gráfico con la curva típica para una extracción en lote o “batch” de compuestos activos en plantas	15
Figura 7. Diagramas de los distintos tipos de sistemas de ultrasonido	21
Figura 8. Imágenes por microscopía electrónica de la extracción de aceite de semillas de alcaravea o comino de prado	22
Figura 9. Diagrama de bloques de preparación de la materia prima	26
Figura 10. Esquema del equipo de extracción empleado.....	27
Figura 11. Diagrama del proceso de extracción y toma de muestra de los compuestos fenólicos a partir de la pulpa de café	28
Figura 12. Diagramas de Pareto de los efectos de cada una de las variables independientes sobre la extracción del a) ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) y b) cianidina 3-rutinósido (C3R).	43
Figura 13. Superficies de respuesta del efecto de los factores analizados en la concentración de 5-CQA en los extractos obtenidos	49
Figura 14. Gráficas de superficie de respuesta del efecto de los factores analizados sobre la concentración de C3R en los extractos obtenidos.	52
Figura 15. Diagrama con los distintos gráficos de la función de deseabilidad de extracción de los compuestos 5-CQA y C3R.	55

Figura 16. Curvas de las cinéticas de Patricelli a) 5-CQA y b) C3R, utilizando las condiciones 59 °C, 58 % US, 48% etanol (n=3).....	62
Figura 17. Gráficos de valores predichos vs observados para el modelo del rendimiento de ácido 5-cafeoilquínico generado del diseño Plackett-Burman.	80
Figura 18. Gráficos de valores predichos vs observados para el modelo del rendimiento de cianidina 3-rutinósido generado del diseño Plackett-Burman.	82
Figura 19. Gráficos de dispersión de los valores observados contra los predichos de los modelos generados por superficies de respuesta de a) 5-CQA y b) C3R.	85

Nomenclatura

5-CQA Ácido 5-cafeoilquínico

C3R Cianidina 3-rutinósido

CITA Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

DCCR Diseño Central Compuesto Rotable

EtOH Concentración en masa de etanol en el disolvente

HPLC-DAD Cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de diodos

MET Masa total extracto

MP Masa inicial de pulpa de café

ORAC

PB Plackett-Burman

p_{fa} Probabilidad de falta de ajuste

p_{mod} Probabilidad del modelo

R^2 Coeficiente de determinación

R^2_{-adj} Coeficiente de determinación ajustado

S:L Relación sólido-líquido

T Temperatura

US Amplitud de ultrasonido

V_{ag} Velocidad de agitación

ρ Densidad del extracto

Resumen

Gutiérrez Matamoros, Stephany

Evaluación del proceso de extracción con soluciones de etanol, de un subproducto del procesamiento industrial de café, para obtener un extracto de antocianinas y ácido clorogénico.

Tesis de Licenciatura de Ingeniería de Alimentos – San José, Costa Rica.

Gutiérrez, S. 2020.

97 pp: 19 il. - 91 ref.

En el presente estudio se evaluó un proceso de extracción con soluciones de etanol en pulpa de café arábico, triturada y prensada, subproducto del beneficiado, para obtener un extracto rico en dos polifenoles ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico, 5-CQA) y cianidina 3-rutinósido (antocianina, C3R).

En la primera parte, mediante una prueba de discriminación Plackett-Burman con ocho factores, se realizó la evaluación de los factores más importantes en el proceso de extracción de los polifenoles mencionados. Se seleccionaron los factores amplitud de ultrasonido, la concentración de etanol y la temperatura como los más influyentes sobre el rendimiento de extracción de las variables respuesta.

Posteriormente, mediante un diseño central compuesto rotatable (DCCR) de tres factores (amplitud de ultrasonido, temperatura y concentración de etanol), se evaluó su efecto en el comportamiento de las extracciones y se seleccionaron los rangos donde se obtuvieron los mayores rendimientos de los compuestos de interés. La extracción de 5-CQA y del C3R se maximiza utilizando una concentración de etanol de 48%, una temperatura de 59°C y una amplitud de ultrasonido de 58 %, con lo cual se obtuvo una deseabilidad del 96%, y unas concentraciones de 50 ± 1 mg de 5-CQA y $3,0 \pm 0,2$ mg de C3R por cada 100 g pulpa fresca.

Por último, se corrieron las cinéticas de extracción que se evaluaron por medio de regresiones no lineales de dos modelos matemáticos: no exponencial (Peleg) y de dos velocidades (Patricelli). El modelo que mejor describe el comportamiento de extracción de las dos variables respuesta fue el de Patricelli, con mejor ajuste para el C3R. Se determinó que una extracción a los 60 minutos, permite obtener el 85% de extracción total del 5-CQA y 98% de C3R. Por otro lado, en 25 minutos, se extrae es aproximadamente el 92 % de 5-CQA y el 80 % de C3R del total extraído en 60 minutos.

Los resultados obtenidos en esta investigación señalan la determinación de condiciones preliminares para obtener rendimientos máximos en la extracción asistida por ultrasonido de 5-CQA y C3R. De acuerdo con las características fisicoquímicas del extracto etanólico (ORAC= $13\,723 \pm 1425$ $\mu\text{mol Trolox equiv/L}$, 338 ± 31 mg cafeína /L, $0,189 \pm 0,005$ g cenizas /100 g, $1,49 \pm 0,12$ g azúcares simples), este proceso significa una alternativa para valorizar la pulpa del café como subproducto del procesamiento.

Palabras clave: Ácido 5-cafeoilquínico, cianidina 3-rutinósido, extracción, pulpa de café

Lic. Eduardo Thompson Vicente

Escuela de Tecnología de Alimentos

1. Justificación

Alrededor del mundo, aproximadamente el 75% de las bebidas consumidas regularmente contienen alguna base de café, y su consumo está fuertemente asociado a los hábitos sociales y culturales de cada lugar (Vignoli *et al.*, 2016).

El café como fruto se cultiva en más de 70 países. En Costa Rica, es de los principales productos tropicales de exportación, donde en la cosecha 2018-2019 se produjeron alrededor de 76 544 toneladas de café oro para exportación y para consumo nacional (ICAFE, 2019). Tomando en cuenta esta producción, y que las etapas de beneficiado necesarias para obtener el café verde (oro) originan una serie de residuos con una alta carga contaminante, se considera importante generar líneas de producción más limpias, con un aprovechamiento integral de los residuos generados.

Se ha estimado que en el planeta se generan entre 0,2 y 0,5 toneladas de pulpa y cáscaras por tonelada de café fresco (Janissen y Huynh, 2018). La pulpa del café constituye al menos un 55,4 % de estos residuos, debido a su contenido de materia orgánica puede llegar a ser un sustrato para la obtención de productos con alto valor agregado y beneficiosos para la salud humana, y de esta manera incrementar la sostenibilidad de la cadena de producción (Murthy *et al.*, 2012).

La composición de la pulpa de café varía ampliamente; sin embargo, se conoce que es rica en carbohidratos, proteínas, minerales y en compuestos bioactivos importantes como antocianinas, ácidos hidroxicinámicos y cafeína. Algunas sustancias en este subproducto son factores antifisiológicos y antinutricionales, de manera que el uso de este residuo no es del todo aprovechable como alimento para animales. No obstante, es fuente de fitoquímicos bioactivos como los compuestos fenólicos, que pueden tener funciones tecnológicas en las industrias farmacéutica y alimentaria (Esquivel y Jiménez, 2012; Janissen y Huynh, 2018).

Los compuestos fenólicos se conocen por sus propiedades antioxidantes que retrasan el envejecimiento de las células y previenen enfermedades asociadas (Mojzer *et al.*, 2016). En la pulpa de café se encuentran cuatro clases mayoritarias de polifenoles: ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles, flavonoles y antocianidinas. La mayor parte se compone de

ácidos clorogénicos, de la familia de los ácidos hidroxicinámicos, pero también se encuentran antocianinas en forma de cianidina-3-rutinósido y cianidina 3-glucósido (Esquivel y Jiménez, 2012; Franca y Oliveira, 2016).

Para la recuperación de los compuestos fenólicos del residuo de café se puede utilizar la operación de extracción sólido líquido, en la cual el residuo se coloca en contacto con una mezcla solvente líquida para que los compuestos de interés se transfieran por lixiviación del residuo al líquido. En la extracción convencional sólido líquido generalmente se utilizan distintos solventes que, aunque son exitosos para la separación de compuestos específicos, crean preocupación por los residuos que puedan permanecer, especialmente si el fin del extracto obtenido es el consumo humano (Mojzer *et al.*, 2016). La combinación de agua y etanol, usualmente es la más adecuada para la extracción, debido a su aceptabilidad para el consumo humano (Ferreira, 2017).

Los métodos convencionales de extracción utilizan grandes cantidades de disolventes, alto consumo energético y largos períodos de extracción, por lo que se buscan alternativas verdes para disminuir el impacto ambiental y aumentar la eficiencia de los procesos. Dentro de estas tecnologías se utilizan microondas, ultrasonido, fluidos supercríticos y subcríticos, pulsos eléctricos y altas presiones (Tiwari, 2015; Belščak-Cvitanović y Komes, 2017).

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) requiere una baja inversión en comparación con las otras técnicas limpias, puede ser completada en pocos minutos con alta reproducibilidad, reduce el consumo de solventes, se obtiene una mayor pureza del producto final, y además disminuye el postratamiento del agua residual (Tiwari, 2015). La extracción asistida por ultrasonido está influida por diferentes parámetros como la potencia y amplitud del ultrasonido, el uso de pulsos intermitentes, la temperatura y el pH del medio, la concentración del solvente, la relación solvente sustrato, la agitación del medio, entre otros (Roselló-Soto *et al.*, 2015, Chemat *et al.*, 2017).

En el mercado se hallan extractos de polifenoles o de ácido clorogénico purificado en polvo provenientes principalmente de los granos del café verde, y a nivel industrial existen patentes en las que se describen los procesos de obtención de distintos polifenoles a partir de subproductos del café (Belščak-Cvitanović y Komes, 2017). La producción de extractos de compuestos fenólicos tiene gran potencial comercial, según estudios del mercado de polifenoles a nivel mundial, del 2012 al 2018 hubo una tasa de crecimiento del 6,1% de la demanda anual, para el 2018 se valuó el mercado en 1,28 billones de dólares y se espera un crecimiento de 7,2% entre 2019 y el 2025 (Transparency Market Research, 2016; Global Polyphenols Industry, 2019).

Frente a toda la problemática ambiental proveniente de la industria cafetalera, surgen alternativas para la valorización de la pulpa de café como subproducto y el uso potencialmente provechoso de los polifenoles en la industria alimentaria. En este estudio se establecieron los parámetros de extracción con soluciones de etanol asistida por un equipo ultrasónico para obtener un extracto con compuestos fenólicos valiosos, específicamente ácido clorogénico y antocianinas, a partir de un subproducto del procesamiento industrial del café, con potenciales usos como producto nutracéutico o ingrediente alimentario.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el proceso de extracción con soluciones de etanol de un subproducto del procesamiento industrial de café, para obtener un extracto rico en polifenoles (ácido clorogénico y cianidina-3-rutinósido).

2.2 Objetivos específicos

Establecer las variables de mayor efecto en la extracción de ácido clorogénico y antocianinas del subproducto de café mediante un diseño experimental de discriminación Plackett-Burman.

Evaluar las condiciones de proceso para la optimización de la extracción de compuestos fenólicos del subproducto de café, mediante un diseño central compuesto.

Modelar las cinéticas de extracción de ácido clorogénico y antocianina en el subproducto de café, utilizando las condiciones óptimas determinadas.

3. Marco teórico

3.1. Generalidades del café

El café pertenece a la familia *Rubiaceae* y al género *Coffea*. De aproximadamente 100 especies del género *Coffea*, solamente *Coffea arabica* L. (café arábigo) y *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (café robusta) son los de mayor importancia económica alrededor del mundo, y representan cerca del 99 % de la producción global de los granos de café (Lashermes, 2018).

La planta del café es originaria de las selvas tropicales de Etiopía y Sudán, llegó a Centroamérica con la colonización europea, y se convirtió en uno de los productos de exportación tradicionales de la región. Varias de las plantas de café de mayor calidad se cultivan en altitudes medias, entre Perú y México. Los países con mayor producción de café en el mundo son Brasil, Vietnam, Colombia, Etiopía e India. En Costa Rica la producción es menor por su reducido territorio sin embargo tiene gran importancia económica (Canet y Soto, 2016).

La totalidad del café de Costa Rica es del tipo arábico, de las variedades Caturra y Catuaí, que poseen gran adaptabilidad a las condiciones de clima y suelo, por lo que son manejables y de alta capacidad de producción. Se cultiva en 8 zonas productoras: Brunca, Turrialba, Tres Ríos, Orosi, Tarrazú, Valle Central, Valle Occidental y Guanacaste (ICAFFE, 2015). Existen 278 plantas beneficiadoras para el procesamiento del fruto, que para la cosecha 2018-2019 beneficiaron aproximadamente 1 717 659 fanegas de café fruta y se produjeron 76 mil toneladas de café oro para exportación y consumo nacional (ICAFFE, 2019).

3.2. Procesamiento del café

El fruto del café usualmente es cosechado cuando su superficie es roja, que ocurre aproximadamente 5 años después de haber sido plantado el arbusto. Se compone de dos cotiledones cubiertos por una delgada capa del pergamino, luego está el tegumento rodeado

por el mucílago, la pulpa y la cáscara, así como se muestra en la Figura 1 (Mussatto y Texeira, 2013).



Figura 1. Descripción del fruto del café. Fuente: Castillo et al., 2017

El procesamiento del café inicia con la remoción de las capas externas del fruto, para lo que se pueden utilizar dos metodologías: el beneficiado seco o el beneficiado húmedo. El primero se realiza inmediatamente después de cosechar el fruto, se exponen las bayas al sol, hasta alcanzar la humedad entre 10% y 12%, suficiente para que se puedan separar la pulpa y el pergamino. El beneficiado húmedo, involucra operaciones mecánicas y biológicas, para separar el grano del resto del fruto, donde se separan la pulpa y el mucílago, para finalmente eliminar el pergamino después del secado (Contreras-Angulo *et al.*, 2018).

El sector costarricense utiliza el beneficiado por vía húmeda, donde la remoción de la pulpa se realiza el mismo día de la cosecha del grano, por medio de un proceso mecánico llamado chancado (despulpado). Posteriormente se realiza el secado al sol, para los mercados de mayor exigencia, con una duración de 7 días; o el secado mecánico con aire caliente que reduce el tiempo de secado a 24 horas, y corresponde al empleado para la mayor porción de la producción (ICAFE, 2015).

Con el objetivo de reducir el impacto ambiental del procesamiento del café costarricense se ha realizado una transformación industrial del beneficiado húmedo.

Actualmente, se utiliza la recirculación del agua en aquellas operaciones en las que es empleada, el despulpado y el transporte de la pulpa se efectúan sin agua, y de los residuos producidos, la pulpa se utiliza como abono orgánico y el pergamino es quemado para generar la energía requerida durante el secado. No obstante, para producir 45 kg de café oro, es necesario procesar entre 5 y 6 veces ese peso de café en fruta, por lo que los residuos producidos diariamente son muy grandes y se hacen necesarias alternativas de uso de los subproductos o residuos obtenidos (ICAFE, 2015).

3.3. Subproductos del procesamiento del café

Durante el procesamiento del café se generan varios residuos como: la cáscara, la pulpa, el mucílago y el pergamino, residuos que al acumularse pueden ser altamente contaminantes. Para aumentar la sustentabilidad de los procesos se han realizado esfuerzos para valorizar los subproductos obtenidos en: la producción de hongos comestibles, compost y alimentos animales, pero también en investigaciones como nutraceuticos o aditivos alimentarios ya que pueden contener compuestos químicos de alto valor económico para diversos sectores como farmacéutico, alimentario y cosmético (Alves *et al.*, 2017).

La cáscara representa 12% del fruto y se puede utilizar para cultivar hongos comestibles, como sustrato para fermentaciones para producir compuestos aromáticos, enzimas y biocombustibles, o también se puede utilizar para elaborar madera prensada e incluso puede sustituir hasta 50% de las partículas de madera para elaborar este material. El pergamino que es el endocarpio fibroso que cubre las semillas, debido a su alto contenido de celulosa y hemicelulosa puede utilizarse como parte de la mezcla para producir madera prensada, y como precursor de la producción de carbón activado. El tegumento que cubre los granos de café, también llamada piel plateada (silverskin), es separado una parte durante el beneficiado y el resto durante el tostado, tiene un alto porcentaje de fibra dietética y, debido a los compuestos formados durante este proceso, también tiene alta capacidad antioxidante (Mussatto y Teixeira, 2013).

El mucílago que representa entre 15% y 20% del fruto, está compuesto por agua, azúcares reductores y no reductores, celulosa, pequeñas cantidades de proteína y algunos

minerales. Tiene aplicación en dietas animales, como nutriente de plantas, como fuente de pectinas, y por su contenido de azúcar puede ser usado en la producción de etanol y gas metano (Contreras-Angulo *et al.*, 2018).

La pulpa es el subproducto mayoritario del procesamiento del café, representa un 40% de la fruta del café. Es esencialmente rica en azúcares, proteínas, minerales, y también contiene taninos, polifenoles y cafeína, así como se describe en el Cuadro I. Se ha utilizado para el cultivo de hongos comestibles, producción de abono y como alimento animal. Sin embargo, no se utiliza mucha cantidad para estas actividades y todavía queda un remanente muy grande generando problemas ambientales (Rodríguez-Durán *et al.*, 2018).

Cuadro I. Composición general de la pulpa de café

Componente	Contenido (%m/m base seca)
Composición proximal	
Grasa	1,3-3,8
Proteína	8,0-15,0
Carbohidratos*	66,5-84,4
Fibra	16,2-35,2
Extracto libre de nitrógeno	42,7-63,5
Ceniza	5,0-9,5
Componentes de pared celular	
Celulosa	10,5-28,6
Hemicelulosa	1,0-15,5
Lignina	12,2-22,8
Otros componentes orgánicos	
Taninos	0,7-8,6
Cafeína	0,7-1,8

*Carbohidratos = Fibra + Extracto libre de nitrógeno. Fuente: Rodríguez-Durán *et al.* (2018)

Gran parte de los subproductos son utilizados para generar productos no comestibles o para fermentaciones; sin embargo, es posible aprovechar varias de sus características en la industria de alimentos. Según un estudio de Yoo *et al.* (2011), citado por Contreras-Angulo *et al.* (2018), al añadir diferentes subproductos del café al chocolate, se obtuvo mayor capacidad antioxidante y cantidad de flavonoides que el chocolate simple sin implicar un efecto negativo en la aceptabilidad sensorial.

A partir de la pulpa del café costarricense, se han realizado distintas investigaciones para su valorización, como la obtención de extractos en polvo ricos en antocianinas por medio de tecnologías de membranas y secado por atomización (Zúñiga, 2017), y se ha estudiado el uso de extractos en polvo de antocianinas como colorantes en alimentos (Villalta, 2016). Jiménez (2016) evaluó las condiciones para la obtención y cuantificación de un extracto de ácidos hidroxicinámicos a partir de la pulpa de café.

3.4. Compuestos funcionales presentes en la pulpa de café

La pulpa del café constituye una matriz compleja de sustancias, que interactúan con el cuerpo humano, y que no solo estimulan el sistema neural, sino también generan beneficios en la salud. La mayoría de estos compuestos corresponden al grupo de polifenoles, y se encuentran de manera natural (ácidos clorogénicos) o son generadas durante el proceso de tostado (melanoidinas) (Chaves-Ulate y Esquivel-Rodríguez, 2019).

3.4.1. Polifenoles

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas y constituyen la mayor clase de antioxidantes presentes en los vegetales. Estructuralmente contienen uno o más anillos aromáticos con grupos hidroxilo originando desde estructuras simples hasta complejos altamente polimerizados. Se dividen en dos grandes grupos: los flavonoides que incluyen flavanoles, flavonoles, isoflavonas, flavonas, flavanos, flavanonas, protoantocianidinas y antocianinas y los no flavonoides que comprenden tocoferoles, ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos), taninos, estilbenos, cumarinas y ligninas (Figura 2) (Ferreira, 2017).

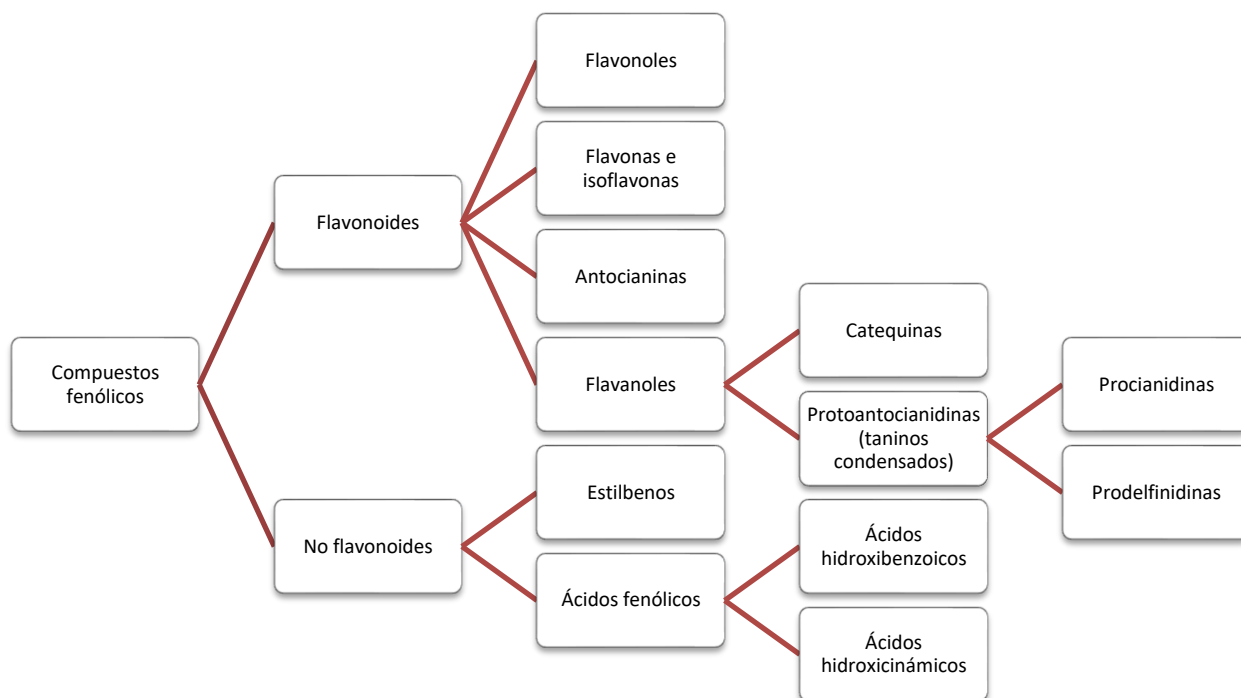


Figura 2. Distribución de compuestos fenólicos. Fuente: Ferreira, 2017

La obtención de compuestos fenólicos despierta interés por el potencial beneficio en las actividades fisiológicas del organismo. Estas sustancias son capaces de neutralizar los radicales libres y los radicales hidroxilos disminuyendo el estrés oxidativo. El estrés oxidativo daña todo tipo de moléculas celulares incluyendo lípidos y proteínas, tornando en condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y envejecimiento general. (Kesharwani *et al.*, 2017).

En el café arábico se identifican cuatro clases importantes de compuestos fenólicos: los flavan-3-oles, los ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y antocianinas. La cantidad y la distribución de cada uno de estos compuestos puede cambiar de un estudio a otro; esta variabilidad puede darse debido al origen de las muestras (cultivar, zona de origen, condiciones de cultivo, estado de maduración, entre otros), el manejo poscosecha (método de despulpado, secado, tipo de almacenamiento, entre otros), e inclusive por los métodos de análisis utilizados (Rodríguez-Durán *et al.*, 2018).

3.4.1.1. Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos que poseen un esqueleto químico simple que consiste en una estructura fenilpropanoide del tipo C6-C3. En las plantas se encuentran comúnmente siete tipos: p-cumárico, o-cumárico, m-cumárico, cafeico, ferúlico, y sinápico. Son el mayor subgrupo de ácidos fenólicos con amplia presencia en el reino vegetal, y son abundantes en hojas de té, café, vino rojo, frutos rojos, vegetales y granos enteros. Se encuentran en cualquier parte del fruto, pero su concentración es mayor en las partes externas del fruto maduro (Texeira *et al.*, 2013).

Los ácidos clorogénicos son derivados de la esterificación de ácidos transcinámicos como el ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico con el ácido (-)-quínicico. Están representados en su mayoría por las subclases de ácidos cafeoilquínicos (que representan el 80% del total de ácidos clorogénicos), los ácidos dicafeoilquínicos y ácidos feruloilquínicos (Kesharwani *et al.*, 2017).

La pulpa fresca del café contiene mayoritariamente el ácido 5-cafeoilquínico (Figura 3) que usualmente se le conoce como ácido clorogénico, constituye 42% del total de los compuestos fenólicos identificados en este sustrato; también se reportan ácido 5-ferulilquínico, taninos condensados (protoantocianidinas) y diferentes tipos de antocianinas (Chaves-Ulate y Esquivel-Rodríguez, 2019).

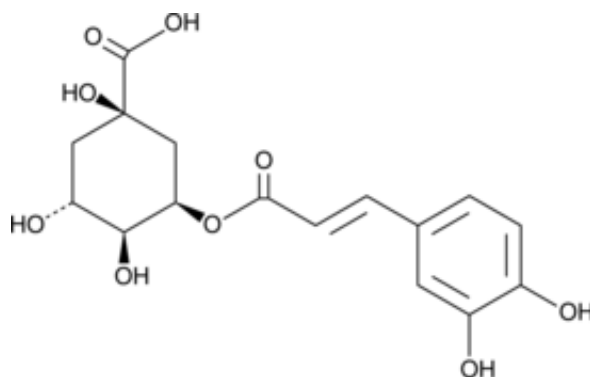


Figura 3. Estructura química del ácido 5-cafeoilquínico

Los ácidos clorogénicos son antioxidantes altamente valiosos en la industria médica por su aporte contra las enfermedades asociadas con el estrés oxidativo como el cáncer, problemas cardiovasculares, enfermedades degenerativas y el envejecimiento del organismo (Kesharwami *et al.*, 2017).

Alrededor de dos terceras partes del ácido clorogénico ingerido llega hasta el colon, y es biotransformado por la microflora. El ácido clorogénico es hidrolizado en ácido cafeico y ácido quínico, la presencia de estos compuestos en la orina sugiere que son absorbidos en el colon (Herrera *et al.*, 2011). Los efectos producidos por estos compuestos no son necesariamente atribuibles a su capacidad antioxidante, si no a los metabolitos generados que van al sistema circulatorio para llevar a cabo acciones que se convierten en los beneficios asociados al consumo del café (Chaves-Ulate y Esquivel-Rodríguez, 2019).

Estos compuestos también son relevantes para la industria alimentaria: se ha reportado que el ácido cafeico se puede utilizar como antioxidante natural para inhibir la oxidación de lípidos presentes en el músculo de pescado, así como el uso de extractos etanólicos y acuosos de residuos de café para prevenir la oxidación de los lípidos en carne cruda. Además, compuestos presentes en la pulpa del café como ácido quínico, málico, ácidos clorogénicos y cafeína pueden tener actividad antimicrobiana especialmente sobre bacterias gram positivas (Chaves-Ulate y Esquivel-Rodríguez, 2019).

3.4.1.2. Antocianinas

Las antocianinas constituyen uno de los mayores grupos de los flavonoides, son responsables de los colores ciánicos en la mayoría de las flores, frutos y hojas de angiospermas, pero también se encuentran en otros tejidos como raíces, bulbos, tubérculos y tallos, y en algunos gimnospermas, helechos y briofitas. En la actualidad, más de 700 moléculas de antocianinas estructuralmente distintas han sido identificadas, sin embargo, solamente seis moléculas representan el 90% presente en la naturaleza: cianidinas, delphininas, malvidinas, pelargonidinas, peonidinas y petunidinas. Como parte de los flavonoides, son reconocidas por modular la actividad de un amplio rango de enzimas y receptores celulares, con evidencias de quimiopreención del cáncer (Andersen y Jordheim, 2014).

Las antocianinas presentan los esqueletos de carbono C6-C3-C6 típicos de los flavonoides, están compuestos en general por dos o tres unidades químicas principales: el anillo de flavilio o base de aglicona (antocianidina) como se observa en la Figura 4. Las sustituciones de azúcares o grupos acilados, y como tercera unidad se pueden unir ácidos alifáticos o aromáticos a los azúcares (Jing y Giusti, 2014). Usualmente se encuentran en las paredes celulares dentro de vacuolas e inmersas en el material nuclear (Caballero-Valdés *et al.*, 2016).

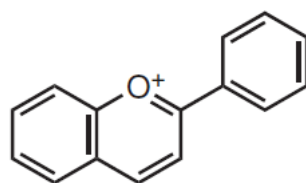


Figura 4. Estructura química del flavilio o base de aglicona (antocianidina).

Las antocianinas son moderadamente polares por lo que para extracciones se utilizan solventes relativamente polares como agua, metanol, etanol o acetona, o mezclas de agua con metanol o acetona. Son relativamente lábiles por lo que se debe moderar la temperatura, por eso se recomienda mantenerlas a bajas temperaturas para contribuir en la disminución de su deterioro por reacciones químicas y enzimáticas (Jing y Giusti, 2014). Además, las antocianinas son degradadas rápidamente por acción de las enzimas liberadas durante el procesamiento.

En la caracterización de las antocianinas presentes en la pulpa de café, se ha determinado la cianidina 3-rutinósido (C3R, Figura 5) como la mayoritaria seguida de la cianidina 3-glicósido (Murthy y Naidu., 2012).

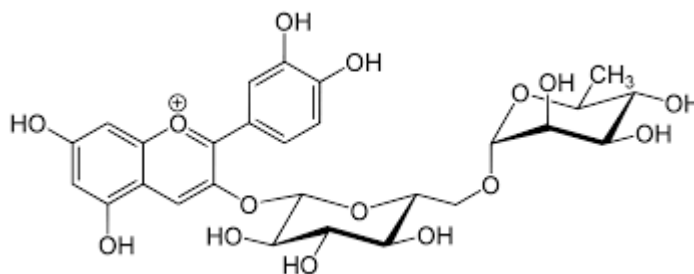


Figura 5. Estructura química de la cianidina 3-rutinósido

Las antocianinas provenientes del café muestran efectos biológicos inhibiendo la actividad de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa, responsables de la hidrólisis de carbohidratos y del aumento de glucosa en la sangre. Además, tienen gran potencial como colorantes naturales en alimentos. En algunas investigaciones se ha logrado recuperar, con condiciones diferentes, desde 1 mg hasta 24 mg de cianidina 3-glucósido por cada 100 g de pulpa fresca de café, y se ha reportado que se extraen muy bien con soluciones de etanol (Belščak-Cvitanović y Komes, 2017).

Por ser la predominante en la pulpa de café y por tener potencial actividad beneficiosa sobre el organismo humano y efecto antioxidante en alimentos, se seleccionó el rendimiento de extracción de la C3R como variable respuesta en las distintas pruebas realizadas en esta investigación.

3.5. Extracción sólido-líquido de compuestos funcionales

La extracción sólido-líquido es una operación de separación donde las sustancias de interés son disueltas y extraídas de una matriz sólida por un disolvente líquido, formando una disolución llamada extracto. Cuando el soluto está ampliamente distribuido en la matriz, el material más cercano a la superficie será el primero en disolverse, y conforme se aleja de la superficie el solvente debe penetrar más, por lo que progresivamente la tasa de extracción tiende a disminuir después de un período (Chanioti *et al.*, 2014).

Los compuestos funcionales son extraídos en tres pasos generales: 1. Etapa de lavado, donde se produce una desorción de la superficie de la matriz o liberación desde estructuras internas, 2. Etapa de difusión, donde se da un flujo de partículas a lo largo de la capa de

disolvente y 3. Solubilización en el disolvente (Chemat *et al.*, 2008). El primer paso se considera instantáneo por lo que no afecta la tasa de transferencia, pero el segundo usualmente es el más lento de manera que controla el proceso de extracción y el tiempo para llegar al equilibrio, en tanto que el tercero se considera en la mayoría de los casos como implícito en la difusión. Se deben determinar las variables más adecuadas para aumentar la rapidez en el segundo paso (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2002). En la Figura 6, se describen de manera general la curva típica de una extracción de compuestos bioactivos de plantas.

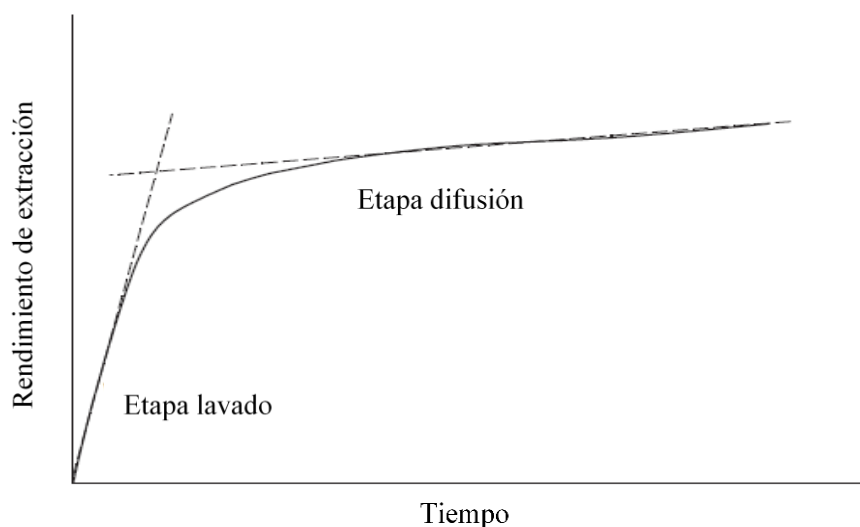


Figura 6. Gráfico con la curva típica para una extracción en lote o “batch” de compuestos activos en plantas. Fuente: Chan *et al.*, 2014.

Las moléculas o compuestos bioactivos pueden estar ligados a macromoléculas como carbohidratos o proteínas, o embebidos en una matriz compleja por lo que lograr un proceso de extracción específico es complicado (Tiwari, 2015). Por lo tanto, para la extracción de los distintos compuestos se emplean métodos que consideran distintos factores tales como su naturaleza, las posibles interferencias y los parámetros que pueden facilitar su separación de la matriz (Chemat *et al.*, 2017).

3.6. Variables del proceso de extracción

Los compuestos fenólicos están presentes en las plantas de forma libre o ligada, por lo que los diferentes métodos de extracción deben incluir condiciones que favorezcan la degradación de la pared celular y la efectiva entrada del solvente. A continuación, se describen algunas de las condiciones de operación que pueden influenciar sobre los resultados esperados.

3.6.1. Relación disolvente-sólido

La relación disolvente-sólido es la proporción de disolvente o mezcla de solventes utilizada para extraer compuestos importantes de una cantidad específica de matriz sólida. La cantidad de solvente utilizado durante la extracción de materiales de origen vegetal influye altamente la concentración y composición de los extractos obtenidos. Los compuestos de interés pueden interactuar con otros componentes vegetales, incluyendo carbohidratos y proteínas, llegando a formar complejos insolubles; así que se debe estudiar la cantidad de solvente necesaria para evitar estos complejos, para facilitar la solubilización del soluto y también evitar la saturación del disolvente (Caballero-Valdés *et al.*, 2016).

Es importante tomar en cuenta que, aunque los altos gradientes de disolvente pueden proveer una tasa de extracción más rápida, también implican una mayor dilución de los compuestos lo que requiere procesos más largos de separación y purificación, así como más pasos de concentración por evaporación del solvente (Gertenbach *et al.*, 2016). Por otra parte, relaciones muy bajas pueden causar problemas de saturación, por lo que la mayoría de trabajos considera una cantidad de solvente de 10 a 30 veces la del soluto (Galili y Hovav, 2014).

3.6.2. Temperatura

La temperatura es un factor muy importante durante un proceso extracción ya que incrementa el movimiento de los solutos en los sitios activos de la matriz celular, reduce la fuerza de los enlaces hidrógeno y decrece la energía requerida para romper las interacciones matriz-soluto (Caballero-Valdés *et al.*, 2016).

La solubilidad de los materiales extraídos es proporcional al aumento de temperatura; no obstante, en algunas matrices las altas temperaturas pueden generar reacciones indeseables resultando en reacciones de degradación o transformación de compuestos importantes, sin dejar de mencionar los compuestos que son termosensibles. La temperatura está limitada por el balance entre el punto de ebullición del solvente y la estabilidad de los compuestos, debe ser lo suficientemente alta para proveer una tasa de extracción rápida sin destruir las sustancias de interés (Chanioti *et al.*, 2014, Gertenbach *et al.*, 2016).

Según Zorić *et al.* (2014), las antocianinas resultan ser más susceptibles a degradaciones térmicas que otros polifenoles. Aun así, en una pasta de cereza Marasca, la cianidina 3-rutinósido obtuvo una vida media de 45,69 min a 80°C y el ácido clorogénico 66,99 min.

3.6.3. Tiempo

El tiempo de extracción está definido como el tiempo que el solvente está en contacto con la matriz bajo las condiciones específicas seleccionadas (temperatura, agitación, presión, entre otras). Es un parámetro muy importante ya que una vez alcanzado el equilibrio es probable que no aumente la eficiencia de la extracción, al contrario, períodos excesivamente largos pueden causar la extracción de compuestos no deseados, la degradación de analitos y pérdidas por altos costos de energía (Domínguez y González, 2017).

3.6.4. Tamaño de partícula

La estructura celular las materias alimentarias debe ser considerada, puesto que en algunos casos el soluto puede estar en la superficie, mientras que en otros puede estar almacenado en espacios intracelulares, capilares o en diferentes compartimentos celulares. Para incrementar el área de contacto entre el solvente de extracción y la matriz sólida se hacen necesarias operaciones previas como la molienda. Cuando se disminuye el tamaño de partícula se aumenta la tasa de transferencia del soluto, no obstante, en algunos casos partículas muy pequeñas pueden causar problemas de circulación y drenaje del líquido (Chanioti *et al.*, 2014).

3.6.5. Valor de potencial de hidrógeno (pH)

La estabilidad de la membrana celular es fuertemente afectada por el pH, permitiendo la interacción entre el solvente y los compuestos fenólicos. Las condiciones ácidas suelen mejorar la solubilidad de los compuestos fenólicos y modifican su estructura, en algunos casos incrementan la actividad antioxidante de los extractos e incluso aumentan su estabilidad química. También puede afectar la estructura química de las moléculas o partes de la célula vegetal donde se encuentran enlazados los compuestos bioactivos, como las proteínas, de manera que un cambio en el pH del medio puede incrementar o reducir la difusión de estas sustancias en el disolvente o mezcla de solventes (Caballero-Valdés *et al.*, 2016).

3.6.6. Agitación del medio

La agitación del fluido incrementa la difusión turbulenta, homogeniza el disolvente y aumenta las tasas de transferencia de material desde la superficie de las partículas hasta la masa de solución (Chanioti *et al.*, 2014)

3.6.7. Naturaleza del solvente

Dependiendo de la muestra, distintos disolventes tienen la capacidad de pasar la barrera de energía conocida como energía de activación de la extracción, que es la requerida para penetrar al interior de las células vegetales, por ello la escogencia del disolvente puede significar grandes diferencias en la cantidad del compuesto a extraer (Chan *et al.*, 2014). Existen varios criterios que deben ser considerados en el momento de seleccionar un disolvente y se describen a continuación:

- Solubilidad específica de las sustancias y compatibilidad: debe ser capaz de extraer la mayor cantidad del soluto con la menor cantidad de impurezas o sustancias no requeridas; además, el soluto y el disolvente no deben reaccionar.
- Tensión interfacial y viscosidad bajas: Una baja tensión interfacial hace que el solvente sea capaz de humedecer el sólido y penetrar en los poros y capilares de la matriz, mientras que una baja viscosidad ayuda en las tasas de difusión del soluto.

- Recuperación: Debe existir la posibilidad de una alta recuperación del solvente para que sea utilizado en otras extracciones, y además para la separación del compuesto de interés se efectúe con la menor cantidad de pérdidas.
- Peligros y costos: El disolvente no debe ser tóxico, peligroso, reactivo, inflamable, dañino para el ambiente, y debe ser de bajo costo (Chanioti *et al.*, 2014).

La solubilidad de los compuestos fenólicos varía de acuerdo con la polaridad del disolvente, el grado de polimerización de los fenoles y su interacción con los otros constituyentes de las células vegetales. Los solventes más utilizados para la extracción de estos compuestos son metanol, etanol, acetona, agua, acetato de etilo, propanol, dimetilformaldehído y combinaciones de estos solventes en proporciones variables (Ferreira, 2017).

Al utilizar el etanol se obtienen varias ventajas: es potable, relativamente barato, reciclable y de grado alimentario; tiene la capacidad de penetrar en los tejidos y disociar moléculas unidas o en complejos, generando una subsecuente precipitación de las macromoléculas insolubles en alcohol y la solubilización de las micromoléculas en el extracto etanólico (Belščak-Cvitanović y Komes, 2017).

Las mezclas usualmente utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos son entre 50% y 85% de metanol o etanol. No obstante, se ha encontrado que el uso de mezclas de etanol-agua con concentraciones de etanol menores al 70% resulta más efectivo que al utilizar etanol cercano al 100 %. Las antocianinas son solubles en agua, pero son más solubles en etanol en mezclas con agua; los ácidos hidroxicinámicos son más afines a mezclas de metanol con agua, pero también solubles en menor medida soluciones de etanol-agua (Caballero-Valdés *et al.*, 2016).

3.7. Extracción asistida por ultrasonido

En la industria alimentaria la extracción asistida por ultrasonido (EAU) ha sido objeto de investigación y desarrollo por ser considerada una tecnología verde, que reduce el tiempo de proceso y el consumo de energía. Es una técnica que incrementa la transferencia de masa al crear efectos térmicos y de agitación, así como efectos estructurales sobre la muestra sólida (Chan *et al.*, 2014).

El sistema consiste en una fuente de poder o generador y una serie de transductores que envían las ondas ultrasónicas al medio. En algunos casos, es posible seleccionar los parámetros de trabajo como potencias, frecuencia y amplitud del ultrasonido. Por lo general, existen dos tipos de sistemas o efectos: uno directo que utiliza una sonda en contacto con la muestra o medio, y uno indirecto que utiliza un baño de agua donde se transmiten las ondas ultrasónicas hasta el recipiente de extracción (Figura 7). El directo es más favorecedor que el indirecto, debido a que las ondas se transmiten solamente a la sonda dentro del medio, el problema de este efecto es que puede incrementar la temperatura de la muestra y, en algunos casos después de mucho uso puede contaminar la muestra con materiales de la sonda por corrosión. La ventaja del indirecto es que los transductores no están en contacto con la muestra, es de fácil operación y relativamente económico, pero tiene la desventaja que pueden ocurrir grandes pérdidas de energía acústica hacia el recipiente y las superficies del baño (Wen *et al.*, 2018).

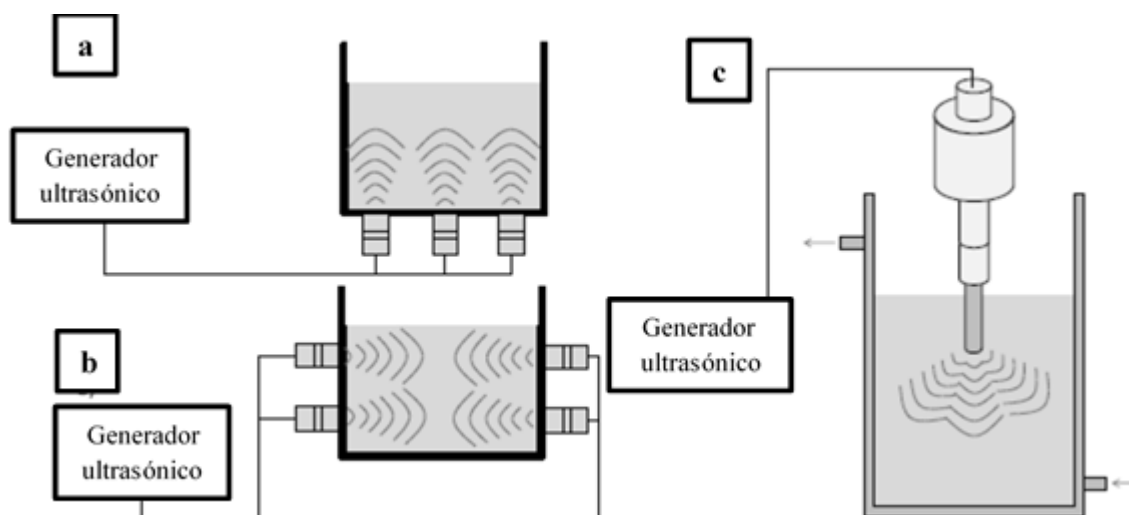


Figura 7. Diagramas de los distintos tipos de sistemas de ultrasonido. a) y b) Baños ultrasónicos, c) sonda ultrasónica de tipo bocina. Fuente: Tiwari (2015)

Al emplear el ultrasonido (US) en un proceso, se utiliza un mecanismo con frecuencias y longitudes de onda específicas que forman regiones alternadas de ondas de compresión y expansión en las moléculas del medio, terminando en un fenómeno de cavitación sónica. Durante la aplicación del ultrasonido en un medio de extracción se produce la formación, crecimiento y colapso de burbujas que producen una presión negativa y altas temperaturas en microsegundos; cuando estas burbujas colapsan cerca de las paredes celulares estas grandes presiones y temperaturas crean microjets y ondas que chocan directamente sobre la superficie sólida. Estos cambios promueven la disrupción de la membrana y como resultado de este fenómeno se mejora la penetración del solvente por los microcanales en las células e intensifica la transferencia de masa (Chanioti *et al.*, 2014).

En la Figura 8, se muestran imágenes ejemplificando el funcionamiento de las ondas ultrasónicas a nivel celular en la extracción de metabolitos secundarios de plantas.

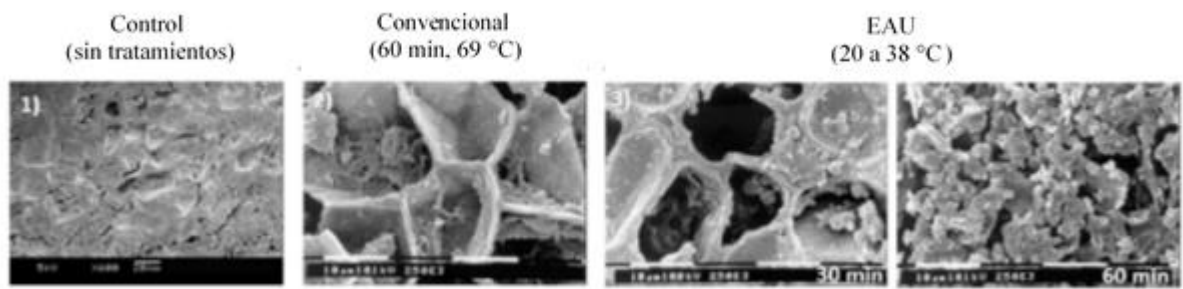


Figura 8. Imágenes por microscopía electrónica de la extracción de aceite de semillas de alcaravea o comino de prado: 1. Control, 2. Extracción convencional, 3. Ultrasonido directo de 20 kHz después de 30 min, 4. Ultrasonido después de 60 min. EAU: Extracción asistida por ultrasonido. Fuente: Chemat *et al.* (2017)

La aplicación de ultrasonido en procesos de extracción se puede realizar de dos formas: continua, ya sea suministrar la energía sónica durante todo el tiempo de extracción, o en forma de pulsos, donde se aplica el ultrasonido por un periodo, seguido de un período sin ultrasonido. Un pulso de US 15/15, significa que se aplica el US por 15 segundos, seguido por un tiempo sin US de 15 segundos para un tiempo de ciclo total de 30 segundos (Pan *et al.*, 2011).

Para que una EAU sea viable y mejor que una extracción convencional es necesario realizar pruebas con la matriz seleccionada, además del disolvente, ya que no todos logran la cavitación; por otro lado, una mayor amplitud ultrasónica no implica mayor eficiencia de cavitación, sino que puede tener un efecto contrario. En algunos casos, la oxidación y la degradación se puede dar bajo períodos amplios de sonicación, debido a la interacción entre radicales hidroxilos. Por otro lado, el ultrasonido tiende a tener efectos insignificantes en tamaños de partícula muy pequeños (Chan *et al.*, 2014).

Virost *et al.* (2010), realizaron una comparación entre la extracción convencional y la asistida por ultrasonido en residuos de pulpa de manzana, donde al utilizar ultrasonido se obtuvo una extracción de polifenoles 20 % mayor que cuando se empleó la extracción convencional, donde también se presentaron ventajas en términos de ahorro de tiempo y energía y aumento de rendimiento. Asimismo, Kamran *et al.* (2010) al evaluar la extracción de naringina y hesperidina a partir de cáscaras de naranja obtuvieron mejores resultados al

utilizar ultrasonido. Quirós (2016) realizó una comparación entre dos tipos de extracción de polifenoles en semillas de mora enteras: extracción convencional y extracción con US de forma indirecta, y no encontró diferencias significativas entre la cantidad de polifenoles extraídos. Los resultados distintos en estos estudios crean la necesidad de comprobar la efectividad de las condiciones de ultrasonido utilizadas para facilitar los procesos de extracción de sustratos específicos.

3.8. Métodos de análisis estadístico de las condiciones de extracción sólido líquido

Para establecer las variables que tienen la mayor influencia en la extracción se pueden aplicar diseños estadísticos de discriminación como el de Plackett-Burman, que considera que cada factor es independiente e interpreta su efecto en un modelo lineal. Este diseño ayuda a definir las variables independientes que afectan en mayor medida la extracción de los compuestos de interés en cada experimento con un número pequeño de observaciones; y han sido utilizados para determinar la influencia de un gran número de factores en la extracción de compuestos fenólicos e incrementar la eficiencia de las investigaciones (Anastácio y Carvalho, 2012).

Una vez identificadas las variables de mayor peso, se pueden utilizar diseños estadísticos multivariados como el diseño central compuesto o de superficie de respuesta, que permiten evaluar varios niveles de distintos parámetros al mismo tiempo, y dan información de las interacciones entre las variables dependientes e independientes (Papoutsis *et al.*, 2018). Con el uso de estos diseños se pueden generar modelos que relacionan los parámetros evaluados con las variables respuesta medidas y permiten establecer las condiciones que optimizan estas variables. La estrategia experimental de discriminación, optimización y su validación ha sido empleada exitosamente en investigaciones recientes de procesos de extracción de compuestos valiosos de matrices vegetales (Celli *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Por otro lado, también es relevante utilizar modelos matemáticos para describir las cinéticas de extracción, lo cual brinda información de la forma en que los compuestos de interés son transferidos del sustrato al medio. La modelización es una buena herramienta en la ingeniería y procesamiento de alimentos, ya que provee de información rápida del efecto de los diferentes parámetros en un sistema y facilita el entendimiento de los mecanismos de transferencia de masa para el diseño, escalamiento y control de los procesos (Bucic-Kujic *et al.*, 2013; Hadrich *et al.*, 2016).

4. Materiales y métodos

4.1. Localización del proyecto

Este proyecto se desarrolló en las instalaciones de la planta piloto y en los laboratorios del Centro Nacional de Ciencia Tecnología de Alimentos (CITA) y de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio, Montes de Oca, San José.

4.2. Materia prima

Se utilizó el residuo de la operación de despulpado (chancado) del fruto del café, que se obtuvo del beneficio San Diego ubicado en San Rafael Arriba de Desamparados en San José, en enero del 2019. El subproducto se recolectó en la salida de las tuberías de descarga del residuo del despulpado y se almacenó en refrigeración hasta el día siguiente para el proceso de preparación o estabilización.

La pulpa de café obtenida se trituró en una picadora modelo SMWZ 1275 (Krämer Grebe, Alemania), para luego mezclar el producto molido con 0,5 % de metabisulfito de sodio, que es un agente efectivo para evitar la oxidación enzimática. El subproducto se prensó en una prensa hidráulica a 10 000 kPa, el residuo sólido resultante se utilizó como sustrato para la extracción y el líquido del prensado se utilizó para analizar el contenido de (ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) y cianidina 3-rutinósido (C3R). Finalmente, se empacó al vacío en bolsas de alta densidad de 2 kg y se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su uso. Se utilizó un solo lote para todas las pruebas. El diagrama del proceso de preparación del subproducto de café se muestra en la Figura 9.

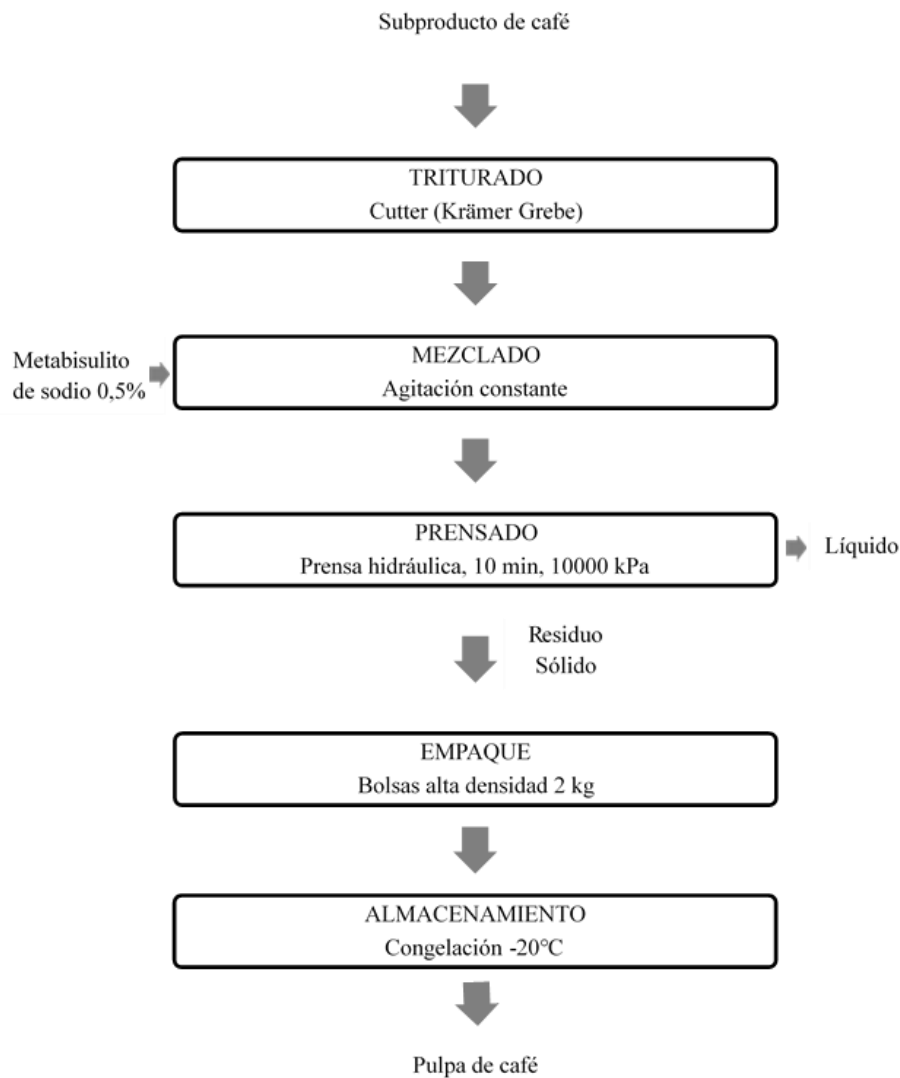


Figura 9. Diagrama de bloques de preparación de la materia prima

4.3. Equipo de extracción

Consiste en un frasco de vidrio tipo beaker de 2 L, un agitador EURO-ST 60 (Ika, Alemania), un procesador ultrasónico de 750W de frecuencia 20 Hz (Cole-Parmer, EUA), con una sonda sólida de alta ganancia con punta de 2,54 cm de diámetro. El recipiente de extracción se colocó en un baño de agua para controlar la temperatura con un termómetro como se muestra en la Figura 10. La sonda se sumerge en la solución de extracción para que quede una distancia de 3 cm medidos desde la punta de la sonda hasta el fondo del recipiente.

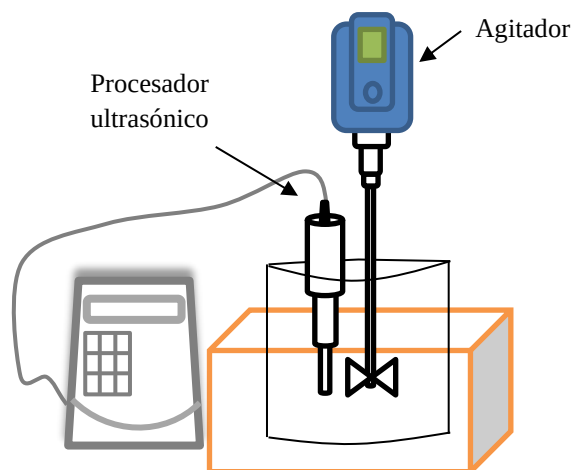


Figura 10. Esquema del equipo de extracción empleado

4.4. Procedimiento de extracción

Se descongeló el residuo de pulpa a temperatura ambiente por 24 horas previo al desarrollo de la prueba. La masa total (sustrato sólido + solvente) utilizada en las corridas de extracción fue siempre de 600 g. Las condiciones de relación disolvente/sustrato (R_{ds}), temperatura de extracción y concentración etanol en el disolvente variaron entre corridas.

El equipo de ultrasonido (US) permite ajustar la amplitud de vibración de la sonda en una escala entre 0 y 100 %; y además, se puede programar el tiempo de los ciclos de actuación y reposo de aplicación de la energía de US. El agitador cuenta con un sistema de control de la velocidad de rotación (rpm) que se muestra en una pantalla. La temperatura de extracción se controló al sumergir el recipiente de vidrio en un baño de agua, y se verificó con un termómetro dentro del sistema de extracción. El pH inicial del sustrato de extracción se ajustó con soluciones de HCl o NaOH 1M.

Al cumplirse el tiempo de extracción establecido, se colocó todo el extracto en frascos para centrífuga y se centrifugaron por 5 minutos a 3200 G, se decantó el líquido en un vial de 25 mL cubierto con papel aluminio. Los viales se colocaron en bolsas metalizadas y se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. El proceso descrito se muestra en el diagrama de la Figura 11.

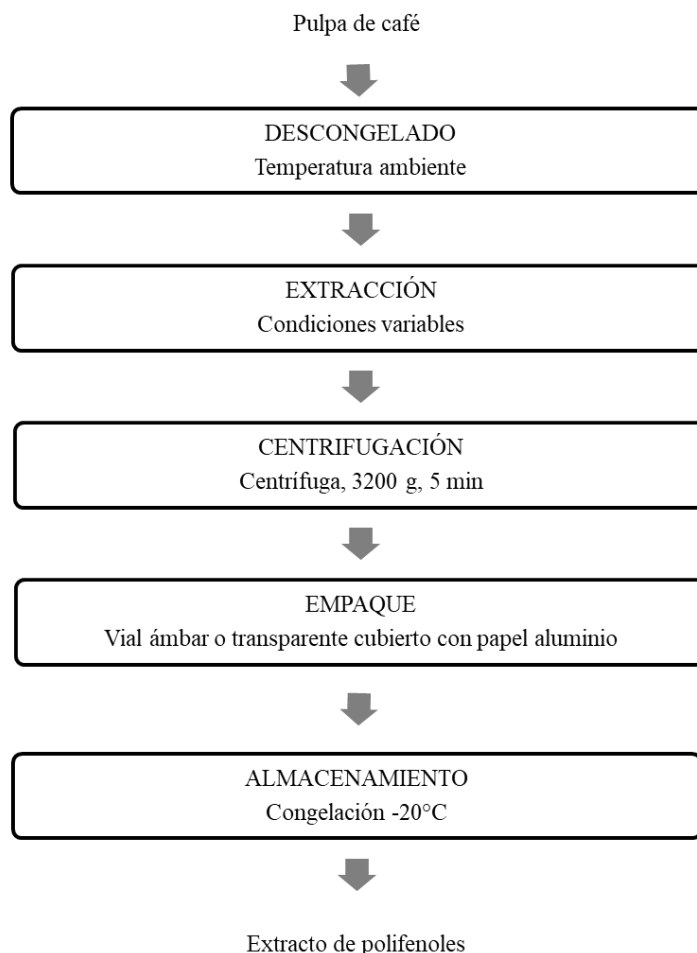


Figura 11. Diagrama del proceso de extracción y toma de muestra de los compuestos fenólicos a partir de la pulpa de café

4.5. Prueba de discriminación Plackett-Burman

4.5.1. Procedimiento

Se evaluó el efecto de ocho factores de extracción sobre el rendimiento de extracción del ácido clorogénico y de las antocianinas. Los factores son los siguientes: temperatura, tiempo, pH, relación sustrato/disolvente, concentración de etanol, uso de ultrasonido, uso de pulsos intermitentes y velocidad de agitación. Como variables respuesta se utilizarán los rendimientos de extracción de ácido clorogénico expresado como ácido 5-cafeoilquínico

(5-CQA) y de las antocianinas expresadas como equivalentes de la cianidina-3-rutinósido (C3R) (Ecuación 1).

$$\text{Rendimiento extracción} = \frac{C_n \cdot \text{MET}}{\text{MP} \cdot \rho} \quad (1)$$

Donde,

C_n: Concentración inicial del compuesto (g/L)

ρ: Densidad del extracto (g/L)

MET: Masa total del extracto (g)

MP: Masa inicial de pulpa de café (g)

4.5.2. Diseño experimental

Se utilizó un diseño de discriminación Plackett-Burman para establecer las variables que afectan en mayor medida la extracción de cianidina-3-rutinósido y ácido 5-cafeoilquínico. Este diseño asume que cada factor evaluado es independiente y que la variable respuesta se describe por el modelo de primer orden descrito por la Ecuación 2.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (2)$$

Donde,

β₀: Intercepto

β_i: Coeficiente de regresión parámetro i

X_i: Parámetro independiente o factor i

Y: Variable respuesta

De acuerdo con lo establecido por diseño experimental, se evaluaron combinaciones de los ocho factores en dos niveles, alto (+) y bajo (-), en un arreglo de doce corridas distintas aleatorizadas, donde se incluyen tres factores ficticios (*dummies*) que ayudan a definir el nivel de error y aumentar la significancia de los factores reales (Vanaja y Rani, 2007; AMC, 2013). En el Cuadro II, se describen las variables independientes junto con los niveles codificados (+, -) y naturales que se utilizaron en la extracción. Los valores de estas variables fueron seleccionados de acuerdo con la experiencia y conocimientos obtenidos en trabajos

de investigación previos sobre el tema de extracción de polifenoles (Conejo, 2016; Jiménez, 2016; Quirós, 2016; Rangel, 2018).

Cuadro II. Variables independientes y los niveles que se evaluaron con el método Plackett-Burman.

Identificación	Variables independientes	Niveles	
		-	+
A	Temperatura (°C)	25	50
B	Tiempo (min)	10	40
C	pH	3,5	5,0
D	Relación sustrato/disolvente (m/m)	1/10	1/5
E	Concentración de etanol (% m/m)	0	30
F	Amplitud de ultrasonido (%)	0	40
G	Forma de aplicación del ultrasonido	15/15	Continuo
H	Velocidad de agitación (rpm)	0	250

La combinación de factores del diseño experimental y el orden aleatorio de las corridas se generó mediante el software Statistica 7.0 (Statsoft, USA) y se muestra en el Cuadro III, donde se describen las condiciones en código utilizadas en cada corrida.

Cuadro III. Descripción de las condiciones que serán aplicadas en cada corrida estándar, y su orden aleatorio.

Número de corrida estándar	Orden aleatorio	Factores reales								Factores ficticios		
		A	B	C	D	E	F	G	H	i	j	k
1	4	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	5	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	9	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	2	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	12	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	7	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	8	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	1	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

12	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
----	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

* El número de corrida es un identificador de las condiciones utilizadas cada vez, el orden aleatorio indica el orden en que se realizaron las extracciones.

4.5.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Con los resultados experimentales, se efectuó la regresión del modelo propuesto (ecuación 2) y un análisis de varianza para establecer el nivel de significancia de los factores de los coeficientes del modelo. Se determinó el valor del coeficiente de regresión (R^2), coeficiente de regresión ajustado (R^2_{adj}), la probabilidad de cada factor (p_f), y un análisis de aleatoriedad por medio de un gráfico de residuos (Vanaja y Rani, 2007). Asimismo, los resultados obtenidos se visualizaron en un diagrama de Pareto estandarizado para separar los factores que presentan un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre las variables analizadas (Torres-León *et al.*, 2017)

A partir de los resultados estadísticos se seleccionaron las tres variables independientes con mayor grado de significancia en ambas variables respuesta, para luego evaluarlas y optimizarlas mediante el diseño central compuesto detallado en el siguiente capítulo.

4.6. Evaluación de las variables de extracción mediante un diseño central compuesto rotatable (DCCR)

4.6.1. Procedimiento

4.6.2. Las corridas de extracción se llevaron a cabo con el mismo equipo y procedimiento descritos en los apartados 4.3 y 4.4, con un tiempo de extracción de 25 minutos. Para optimizar las condiciones de extracción de polifenoles se realizaron las extracciones con la combinación de los factores de mayor significancia obtenidos como resultado del experimento de discriminación realizado en el primer objetivo, y de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 4.5. Con los resultados obtenidos en el DCCR se realizaron corridas de extracción para la validación del modelo obtenido, utilizando los valores de los parámetros seleccionados por medio de la función de deseabilidad. **Diseño experimental**

Se empleó un diseño central compuesto rotatable (DCCR) de tres factores, que corresponden a los factores porcentaje de ultrasonido (US), temperatura (T), concentración de etanol (EtOH), escogidos en el primer apartado a partir de los resultados del experimento de discriminación. Esta metodología se utilizó para evaluar el efecto de los factores sobre el rendimiento de extracción de los compuestos 5-CQA y C3R y determinar las mejores condiciones de extracción. El número de puntos experimentales del diseño utilizado se obtuvo mediante el programa JMP® Pro 9.0.2 (SAS Institute, USA), que se calcula con la Ecuación 3. Los experimentos se realizaron de manera aleatoria para disminuir el efecto de variables no controlables.

$$N = 2^k \text{ (Puntos factoriales)} + 2k \text{ (Puntos axiales)} + n_0 \text{ (Puntos centrales)} \quad (3)$$

Donde,

N: número de puntos experimentales

k: número de factores independientes del diseño experimental

n_0 : número de puntos centrales del diseño experimental

Para el presente caso $k=3$ y $n_0=6$, por lo que se evaluaron 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 6 puntos centrales, por lo que el diseño contó con 20 corridas experimentales.

En el Cuadro IV, se presentan los valores codificados y reales para cada una de las variables independientes seleccionadas.

Cuadro IV. Variables independientes con los valores codificados y sus valores reales utilizadas para el diseño de optimización.

Variable independiente	Valores codificados				
	-1,682	-1	0	1	1,682
	Valores reales				
Ultrasonido (%)	20	32,1	50	67,8	80
Temperatura (°C)	20	28,1	40	51,9	60
Cn EtOH (%)	0	12,2	30	47,8	60

En el Cuadro V, se presenta el orden de las 20 corridas para el diseño compuesto rotatable, junto con la distribución de los parámetros en sus valores codificados.

Cuadro V. Diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de ácido clorogénico y la cianidina-3-rutinósido del subproducto del café.

Ensayo		Parámetros		
Número de corrida estándar*	Orden aleatorio*	US	T	EtOH
1	9	-1,0	-1,0	-1,0
2	3	-1,0	-1,0	+1,0
3	11	-1,0	+1,0	-1,0
4	10	-1,0	+1,0	+1,0
5	1	+1,0	-1,0	-1,0
6	12	+1,0	-1,0	+1,0
7	17	+1,0	+1,0	-1,0
8	16	+1,0	+1,0	+1,0
9	14	-1,682	0,0	0,0
10	13	+1,682	0,0	0,0
11	8	0,0	-1,682	0,0
12	19	0,0	+1,682	0,0
13	6	0,0	0,0	-1,682
14	2	0,0	0,0	+1,682
15	7	0,0	0,0	0,0
16	20	0,0	0,0	0,0
17	15	0,0	0,0	0,0
18	4	0,0	0,0	0,0
19	5	0,0	0,0	0,0
20	18	0,0	0,0	0,0

* El número de corrida es un identificador de las condiciones utilizadas cada vez, el orden aleatorio indica el orden en que se realizarán las extracciones.

4.6.3. Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se corrió el DCCR en el programa estadístico JMP® Pro 9.0.2 (SAS Institute, USA), y se elaboraron los modelos de regresión de segundo orden que describen las variables respuesta en función de los parámetros evaluados junto con sus representaciones en superficies de respuesta. Para estimar que los modelos generados

presentan un buen ajuste y son significativos, se calcularon los coeficientes de determinación (R^2) y de determinación ajustado (R^2_{adj}), la probabilidad del modelo (p_{mod}), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y la distribución de los residuos. La ecuación del modelo cuadrático se reprodujo solamente con los coeficientes que resultaron significativos en el análisis de varianza ($p < 0,05$).

4.6.4. Función de deseabilidad

Se aplicó la función de deseabilidad con el programa estadístico, que permite analizar y calcular la combinación de factores que maximizan el rendimiento de las variables respuesta. El valor de deseabilidad varía entre 0 y 1, donde una respuesta igual o cercana a 1 indica que se alcanza el valor óptimo o ideal. En el presente caso se buscó el valor de deseabilidad más alto, para generar la combinación de factores independientes que producen el mayor contenido de 5-CQA y de C3R en el extracto.

4.6.5. Validación del modelo

Se realizó un ensayo adicional, por triplicado, para verificar que los modelos matemáticos obtenidos del DCCR predicen de forma correcta las variables respuesta. Los resultados experimentales obtenidos se compararon con los resultados predichos por los modelos. Para cada variable respuesta se analizó el traslape de los intervalos de confianza predichos con los experimentales con un nivel de confianza del 95 %, para así validar que el modelo del diseño es adecuado.

El extracto obtenido en las corridas de validación se utilizó además para su caracterización química mediante el análisis de los siguientes parámetros: contenido de humedad, azúcares solubles por HPLC, contenido de cenizas, concentración de cafeína, sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$), pH y capacidad antioxidante como ORAC. Se utilizan estos extractos debido a que los ensayos de verificación se seleccionan en la zona óptima de extracción obtenida en los puntos anteriores.

4.7. Modelado de las cinéticas de extracción

4.7.1. Procedimiento

Para analizar el comportamiento del contenido de los compuestos de interés durante la extracción, se realizaron las cinéticas de extracción del 5-CQA y de la C3R por triplicado. Las condiciones de extracción utilizadas correspondieron a los valores de los factores independientes establecidos como los óptimos en el apartado 4.6. El tiempo de extracción utilizado fue de 70 min y se tomaron muestras de 15-20 g del extracto en los siguientes tiempos: 2, 5, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 45, 60 y 70 minutos. Para cada tiempo se determinó el contenido de C3R y 5-CQA, con los cuales se construyeron las gráficas de concentración en función del tiempo denominadas cinéticas de extracción.

4.7.2. Evaluación de los modelos

Mediante el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software[®], USA) se analizó el ajuste de los resultados experimentales a dos modelos cinéticos que han sido utilizados con éxito en investigaciones similares: el modelo de Peleg (ecuación 4) que propone un ajuste empírico no exponencial de la adsorción de los solutos en el solvente (Chan *et al.*, 2014; Galván *et al.*, 2014; Mustapa *et al.*, 2015) y el modelo de dos velocidades de Patricelli (ecuación 5) el cual considera que el proceso de extracción está controlado por dos fases: una etapa de lavado y otra etapa de difusión (Chan *et al.*, 2014; Mustapa *et al.*, 2015; Rangel, 2018).

$$C_{i_t} = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (4)$$

Donde:

C_{i_t} : Concentración del compuesto de interés en el tiempo t (mg compuesto i/mL extracto)

C_0 : Concentración inicial del compuesto de interés (mg compuesto i/ mL)

K_1 : Constante de velocidad (mL extracto-min/mg compuesto i)

K_2 : Constante de capacidad (mL extracto/mg compuesto i)

t : tiempo de extracción (min)

$$C_{it} = C_1(1 - e^{-k_1 t}) + C_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad (5)$$

Donde,

C_{it} : Concentración del compuesto de interés en el tiempo t (mg compuesto i/mL)

C_1 : Cantidad soluto extraído en el solvente durante la fase de lavado (mg compuesto i/mL)

C_2 : Cantidad soluto extraído en el solvente durante la fase de difusión (mg compuesto i/mL)

k_1 : Coeficiente de extracción durante la fase de lavado (min^{-1})

k_2 : Coeficiente de extracción durante la fase de difusión (min^{-1})

t : tiempo de extracción (min)

En el modelo de Peleg, la C_0 es la concentración inicial al tiempo $t = 0$ y se considera como cero por ser un caso experimental; además, la constante k_1 está relacionada con la tasa de extracción al inicio ($t = t_0$), en tanto que la constante k_2 está relacionada con la extensión de la extracción al equilibrio ($t = \infty$) y es la que se utiliza para conocer la concentración máxima que se debería alcanzar con condiciones específicas (Kumari *et al.*, 2017).

El modelo empírico propuesto por Patricelli involucra dos procesos simultáneos: el estado de lavado y el estado de difusión, en el resultado de la primera derivada se indica que la concentración en el equilibrio es la suma de la C_1 (lavado) y la C_2 (difusión) (Carciochi *et al.*, 2018).

4.7.3. Análisis estadístico

Se evaluó el ajuste a los modelos de las cinéticas de extracción de los compuestos de interés (variables respuesta), por medio de una regresión no lineal con el programa estadístico SigmaPlot 12.0 (Systat Software®, EUA). La bondad de ajuste se analizó por medio del coeficiente de determinación (R^2), del coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) y la probabilidad del modelo (p_{mod}), para un 95% de confianza.

4.8. Métodos de análisis

4.8.1. Determinación de humedad

Se determinó con el método del laboratorio de química del CITA, basado en el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005). Se colocan las cápsulas vacías a 100 °C por 1 h y se registra su peso. Se pesan 10 g de muestra en las cápsulas, se realiza un secado previo de al menos 12 h a 60 °C en estufa de convección, luego se colocan a 69-70 °C en estufa al vacío por 4 h mínimo hasta obtener masa constante.

4.8.2. Determinación de pH

Se utilizó el método del laboratorio de química del CITA, basado en el método AOAC 981.12 (AOAC, 2005) para medición de pH en muestras líquidas.

4.8.3. Determinación de sólidos solubles (°Brix)

Se utilizó el método general de la AOAC 932.12 (AOAC, 2005).

4.8.4. Determinación de azúcares solubles

Se utilizó el método utilizado en el laboratorio de química del CITA, basado en lo desarrollado por IDF (1998), Sullivan y Carpenter (1993) y Pirisino (1983), con el que cuantifican los diferentes azúcares presentes en la muestra por medio de HPLC.

4.8.5. Determinación de cenizas totales

Se utilizó el método del laboratorio de química del CITA, basado en el método AOAC 940.26 (AOAC, 2005) para frutas y productos derivados.

4.8.6. Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)

Se utilizó el método utilizado en el laboratorio de química del CITA, basado en descrito por Wu *et al.* (2004), Prior *et al.* (2005), Huang *et al.* (2002) y Fox y Whitesell (2000). Se midió la capacidad antioxidante siguiendo la cinética de reacción por medio de espectrofotometría de fluorescencia, el área bajo la curva de la caída de fluorescencia es proporcional a la concentración de la sustancia antioxidante. Se interpolaron los resultados en una curva elaborada con el patrón Trolox, y se reportan como μmol de Trolox por cada litro de extracto etanólico.

4.8.7. Determinación de cafeína

Se determinó la cafeína con el método utilizado en el laboratorio de química del CITA, basada en la norma INTE/ISO 20481:2011 para café y productos de café.

4.8.8. Determinación del contenido de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)

Se analizó con el método desarrollado por Jiménez (2016). Se homogeniza la muestra o extracto. Se centrifuga la muestra a 3200 G por 10 min, se decanta el sobrenadante en una jeringa y se filtra a través de microporo de 0,20 μm , por último, se inyecta la muestra en el equipo de HPLC-DAD y se cuantifica empleando las siguientes condiciones cromatográficas de medición:

- Columna: Uptisphere C18-ODB 5 μm (250 x 4,6) mm.
- Temperatura del horno: 30 °C.
- Flujo: 1 mL/min.
- Volumen de inyección: 10 μL .
- Longitud de onda: 327 nm para la detección de los ácidos hidroxycinámicos y clorogénicos.
- Fase móvil: Modo de gradiente (Cuadro VI).
- Límite de detección de 2 ppm y un límite de cuantificación de 6 ppm, para concentraciones entre 2 ppm y 500 ppm.

Cuadro VI. Gradiente de fase móvil empleado para el análisis de los compuestos de interés

Fase móvil	Tiempo (min)					
	0	35	40	45	50	55
Metanol	5	75	100	100	5	5
H ₃ PO ₄ (4 mM)	95	25	0	0	95	95

4.8.9. Determinación del contenido de cianidina-3-rutinósido (C3R).

Se realizó una prueba para analizar la cianidina-3-rutinósido con las mismas condiciones de análisis del 5-CQA, y así facilitar la determinación de ambos compuestos. Los resultados indicaron un coeficiente de variación menor al 5 %, por lo que se utilizaron las mismas condiciones del apartado 4.8.8, pero analizando las áreas a una longitud de onda de 512 nm.

5. Discusión de resultados

5.1. Prueba de discriminación de variables con el diseño de Plackett-Burman (PB)

A partir de los resultados de las corridas de extracción (Cuadro XIV del Anexo) se aplicó la prueba de discriminación de Plackett-Burman, como herramienta para determinar las variables que influyen en mayor medida la extracción de la cianidina 3-rutinósido (C3R) y del ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA). En el Cuadro VII se presenta el análisis estadístico con los coeficientes de determinación de los modelos, los efectos de las variables y sus probabilidades.

Cuadro VII. Parámetros de bondad de ajuste, efectos y probabilidades obtenidos al aplicar la prueba estadística al modelo Plackett-Burman para cada variable respuesta.

Parámetros	Variable respuesta			
	5-CQA		C3R	
R^2	0,9776		0,9483	
R^2_{aj}	0,9180		0,8105	
Error estándar	0,0172		0,0015	
Variable independiente	Efecto	Valor p	Efecto	Valor p
Temperatura T (°C)	8,2841	0,0171 ⁺	0,4318	0,0597 ⁺⁺
Tiempo t (min)	4,1062	0,0970 ⁺⁺	0,4641	0,0501 ⁺⁺
pH	6,2606	0,0357 ⁺	0,3612	0,0898 ⁺⁺
Relación sólido/solvente S/D (m/m)	-1,9057	0,3487	0,2590	0,1742
Concentración etanol EtOH (%)	11,9802	0,0061 ⁺	-0,2456	0,1911
Amplitud de ultrasonido US (%)	10,2929	0,0093 ⁺	0,5633	0,0308 ⁺
Forma de aplicación de ultrasonido FUS	0,4583	0,8072	0,0153	0,9230
Velocidad agitación AG (rpm)	-3,1480	0,1646	-0,4428	0,0562 ⁺⁺

⁺ Variables de extracción significativas con $p \leq 0,05$.

⁺⁺ Variables de extracción significativas con $p \leq 0,10$.

Los coeficientes de determinación simple y ajustado para las dos variables respuesta son mayores a 0,80. Un coeficiente R^2 con un valor cercano a 1 indica que un modelo puede ser utilizado para predecir las variables respuesta, el R^2 ajustado representa un parámetro más estricto para la evaluación del modelo, ya que no se altera por el número de variables,

entonces si este es bueno ($> 0,80$) la selección de las variables a partir de este modelo se puede realizar con alta confianza (Rodríguez y Lemma, 2015).

Para abarcar una mayor cantidad de variables y seleccionar las más adecuadas en este estudio se utilizó un nivel de significancia del 10 %. En casos donde se utiliza el diseño PB para la selección de variables y cuando el proceso es complejo, se recomienda utilizar un nivel de significancia del 10 % en lugar del 5 %, como estrategia para minimizar el riesgo de excluir variables que pueden ser relevantes en el proceso (Rodríguez y Lemma, 2015).

Para el 5-CQA se obtiene que hay cinco factores que resultan significativos, la temperatura, el tiempo, el pH, la concentración de etanol y la amplitud del ultrasonido. De ellos todos tienen una $p < 0,05$ con excepción de la variable tiempo ($p = 0,097$) que es significativa para una significancia del 10 %. Todos estos factores tienen un efecto positivo, es decir que un aumento en su valor incrementa la concentración del 5-CQA extraído.

Para las variables concentración etanol, amplitud de ultrasonido y velocidad de agitación se plantearon los niveles extremos como presencia (+1) o ausencia (-1), para determinar si al utilizarlos se produce algún efecto sobre las cantidades extraídas de los compuestos de interés. En el caso del 5-CQA, se obtuvo que la concentración de etanol y la amplitud del ultrasonido tienen efecto significativo y positivo, indicando que se deben aplicar en algún nivel para obtener una mejora del proceso de extracción.

Debido a la polaridad de la mayoría de los polifenoles se utilizan solventes polares para su extracción; sin embargo, se ha reportado que el uso de mezclas de solventes polares y poco polares contribuyen a la extracción y selección de compuestos fenólicos con polaridad alta y moderada. En la mezcla, el agua mantiene baja la viscosidad del solvente y contribuye como un agente de hinchamiento del material vegetal, mientras que el etanol actúa como disruptor de los enlaces entre los solutos y la matriz vegetal (Ilbay *et al.*, 2015).

Se espera que el ultrasonido presente algún efecto positivo sobre la extracción, ya que ha resultado efectivo para extracciones en varias matrices vegetales. Por ejemplo, Guglielmetti *et al.* (2017) al trabajar con residuos de “silverskin” de café arábica obtuvieron

mejores resultados al extraer ácidos clorogénicos con la asistencia del ultrasonido en comparación con el método convencional e incluso con el uso de microondas. Los efectos mecánicos de las ondas ultrasónicas facilitan la transferencia de las partículas entre las fases por medio de una super agitación con bajas frecuencias, por aperturas en las paredes y membranas celulares reversibles o irreversibles (sonoporación) y por efecto de la capilaridad ultrasónica (Chemat *et al.*, 2017)

En el Cuadro VIII, se muestra que también para la extracción del C3R se presentan cinco efectos significativos: la temperatura, el tiempo, el pH, la amplitud del ultrasonido y la velocidad de agitación; entre ellos la amplitud del ultrasonido tiene la mayor significancia debido a que tiene el valor más bajo de probabilidad ($p < 0,05$). Todos presentan un efecto positivo, con excepción de la velocidad de agitación que indica que si se utiliza puede perjudicar la extracción de este compuesto. Para el C3R, la concentración del etanol no es una variable que influya de manera significativa en su extracción, que puede darse al tener las antocianinas una mayor afinidad con el agua.

Los efectos de todos los factores analizados se pueden visualizar mejor en los diagramas de Pareto de la Figura 12, donde los factores significativos son los que rebasan el lado derecho de la línea punteada vertical. Se observa que las variables amplitud de ultrasonido, temperatura, tiempo y pH presentan un efecto significativo para ambas variables respuesta. La amplitud del ultrasonido tiene un efecto alto en los dos diagramas, por lo que se seleccionó como la primera variable independiente a optimizar.

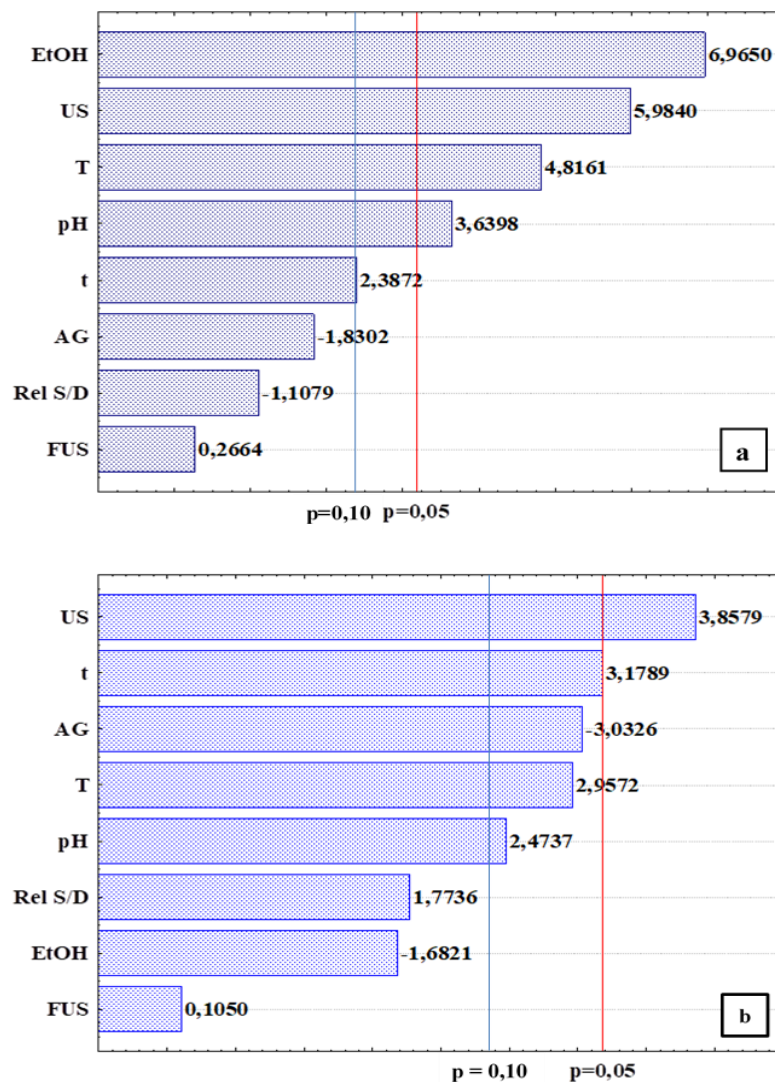


Figura 12. Diagramas de Pareto de los efectos de cada una de las variables independientes sobre la extracción del a) ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) y b) cianidina 3-rutinósido (C3R).

La temperatura se definió como la segunda variable independiente, dado que un aumento de la temperatura de extracción provoca un incremento en la concentración de los compuestos de interés en el extracto. Es necesario definir un valor óptimo ya que puede ser el factor que altere en mayor medida la estabilidad de los compuestos fenólicos. Según el estudio de Sui *et al.* (2014) al evaluar la degradación de la cianidina 3-rutinósido obtenida del arroz negro, un aumento en la temperatura causa mayor degradación que aumentar los

valores de pH; en conclusión, indican que en alimentos con pH mayor a 6 la prioridad sería disminuir el daño térmico durante el procesamiento y luego acidificar. Para el 5-CQA, según De María *et al.* (1999) la degradación es dependiente del tiempo que se mantenga bajo condiciones de temperatura alta, por ejemplo, para distintos vegetales el tratamiento a 100 °C después de 5 min la pérdida fue de 6 %, y 24 % después de una hora.

El pH resultó ser una variable significativa con efecto positivo, es decir se favorece la extracción al no acidificar el solvente, por esta razón se dejó el pH natural de la muestra (~5,0). Usualmente, las antocianinas se mantienen estables bajo condiciones ácidas, no obstante, es posible que en condiciones acidificadas se puedan romper los enlaces de las estructuras base, dejando los arreglos de compuestos sensibles y expuestos a reacciones de degradación o de transformación en polímeros (Andersen y Jordheim, 2010). Para el compuesto 5-CQA los pH ácidos contribuyen a la formación de compuestos derivados del 5-CQA, pero las condiciones no ácidas favorecen la destrucción de los isómeros formados (Dawidowicz y Typek, 2011).

El tiempo, aunque resulta significativo para la extracción de ambos compuestos ($p \leq 0,10$) no se tomó en cuenta como variable para el diseño central compuesto, dado que su efecto en la concentración del 5-CQA y del C3R obtenidos se puede evaluar con detalle con el comportamiento de las cinéticas de extracción, lo cual se discute en el apartado 5.3. Para las corridas del DCCR se escogió un tiempo de 25 minutos, valor intermedio entre los extremos analizados en el diseño PB.

Ahora bien, según lo obtenido por Jiménez (2016) y otras investigaciones el 5-CQA es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad entre los compuestos fenólicos de la pulpa del café y también en comparación con la cianidina, así que se toma como prioritario; de manera que la tercera variable independiente se eligió a partir de sus resultados, en este caso la concentración de etanol presenta el mayor efecto positivo. Como esta variable no es significativa para el C3R, debido a su alta afinidad con el agua por el rutinósido en su estructura química, no se espera un efecto muy grande sobre su extracción en las pruebas subsiguientes.

A pesar de que la velocidad de agitación presenta un efecto negativo significativo para el C3R, se escogió dejarla como parte de las condiciones fijas de extracción como un medio para homogenizar el extracto y para evitar zonas de ondas sónicas estáticas o libres de sólidos (Wang y Weller, 2006). Para las extracciones de los siguientes diseños experimentales se escogió un valor intermedio de velocidad entre los valores extremos, que correspondió a 110 rpm.

La relación entre sólido-disolvente no provocó algún efecto relevante, por lo que se definió como el valor máximo, cinco partes de disolvente por cada parte de sustrato (1/5). Usualmente se utilizan mayores proporciones de solvente; sin embargo, en este caso por no ser significativo se eligió la proporción menor que permite la transferencia de masa, se obtiene una mayor concentración de los compuestos en los extractos, evita un efecto de dilución y facilita una posterior concentración. En el trabajo de Rangel (2018), las diferencias de las relaciones solvente-sustrato no resultaron significativas en la extracción de polifenoles en un subproducto de guayaba, lo que decantó en seleccionar la opción que provocaba la mayor concentración en los extractos.

La forma de aplicación del ultrasonido resultó ser una variable no significativa, de manera que se seleccionó la opción que significa un gasto energético menor, por lo que se utilizó el modo de pulsos ultrasónicos cada 15 s (15 s encendido, 15 s en pausa). Similar a esta investigación, para la extracción de polifenoles de la cáscara de granada se determinó que el empleo de ultrasonido mejora la eficiencia de extracción, y no se presentó diferencia entre el uso continuo del ultrasonido o el de pulsos en intervalos, por lo que recomendaron el uso de los pulsos para ahorrar aproximadamente el 50% de la energía, con una buena tasa de extracción y manteniendo la actividad antioxidante; además, se consideró esa opción como la mejor debido a que el control de temperatura por medio de los pulsos es más sencillo por la poca generación y acumulación de calor en el medio (Pan *et al.*, 2011).

La amplia variabilidad de los resultados en las extracciones, vista en el Cuadro VII, es evidencia del efecto que puede tener cada variable independiente sobre la extracción de los compuestos C3R y 5-CQA.

5.2. Evaluación del diseño central compuesto rotatable (DCCR)

A partir de las variables seleccionadas en el apartado anterior (temperatura, concentración de etanol y amplitud de US), se realizaron pruebas de un diseño experimental central compuesto para obtener las condiciones óptimas que aseguran máximo rendimiento de extracción de los compuestos ácido 5-cafeoilquínico y cianidina 3-rutinósido presentes en la pulpa del café.

Para cada variable respuesta, se realizó un análisis de regresión múltiple para obtener los modelos cuadráticos y de varianza, y así conocer la fiabilidad de los modelos obtenidos. Los parámetros de bondad de ajuste obtenidos para los modelos obtenidos se muestran en el Cuadro VIII.

Cuadro VIII. Parámetros de bondad y ajuste para cada variable respuesta del diseño central compuesto rotatable (20 corridas) y excluyendo el punto de mayor influencia de acuerdo con el criterio de Cook.

Variable	5-CQA		C3R	
	20 corridas	19 corridas	20 corridas	19 corridas
Parámetros				
Probabilidad del modelo (p_{mod})	0,0025*	0,0012*	0,0009*	0,0007*
Coeficiente determinación (R^2)	0,8657	0,9059	0,8920	0,9178
Coeficiente determinación ajustado (R^2_{adj})	0,7449	0,8118	0,7947	0,8356
Probabilidad falta de ajuste(p_{fa})	0,6422	0,9252	0,9747	0,9744
Gráfica de residuos**	Aleatorio		Aleatorio	

*Significativo para probabilidad menor a $\alpha=0,05$

** Gráficas se muestran en la Figura 19 en el Anexo.

La probabilidad para ambos modelos fue significativa, en tanto que los coeficientes de determinación múltiple (R^2 y R^2_{adj}) resultaron mayores a 0,80 para ambas variables respuesta, lo que indica una buena predictibilidad de la respuesta ajustada al modelo. La probabilidad de falta de ajuste de los modelos no fue significativa; este parámetro sirve para comprobar que el modelo elegido es el más adecuado para describir los datos observados; si fuera significativa ($p < 0,05$) el modelo debería ser modificado (Chen y Chen, 2008). Tomando como referencia los datos del Cuadro VIII, se puede expresar que los modelos obtenidos para las dos variables respuesta cumplen con los requisitos mencionados y que pueden predecir de manera confiable el comportamiento de las variables respuesta.

Los coeficientes de regresión para el modelo obtenido a partir de las corridas del DCCR de la extracción variando los factores de ultrasonido, temperatura y concentración de etanol se muestran el Cuadro XX. El coeficiente de variación de los puntos centrales para las dos respuestas es menor al 5%, lo que indica una buena repetibilidad del proceso (Rodríguez y Lemma, 2015).

Se utilizó la influencia del valor de Cook para encontrar los valores atípicos en las extracciones, estos son los datos que afectan negativamente los parámetros estadísticos pero que si son eliminados no perturban en gran medida la regresión. Los valores de Cook mayores a 0,5 son suficientes para ser removidos del análisis principal tomando en cuenta que generen un resultado efectivo (Ott y Longnecker, 2010; Pardoe, 2012). El punto con el valor más alto fue el número 3 (U:32%, T: 52°C, EtOH: 12%) con un valor de 0,65, que sugiere que el análisis en general no es del todo influenciado por la presencia de este punto, incluso se observa en el Cuadro VIII que al excluir estos datos del análisis de regresión se observa una mejora notoria en los coeficientes de determinación. Por esta razón los análisis siguientes se realizaron excluyendo este punto, y utilizando solamente 19 corridas.

Las ecuaciones cuadráticas y las superficies respuesta asociadas al diseño central compuesto rotatable se obtuvieron utilizando los parámetros significativos para cada variable, y se describen en la siguiente sección. Los efectos y probabilidades de los factores seleccionados y sus interacciones se presentan en el Cuadro IX, seis parámetros resultaron significativos para el 5-CQA y tres parámetros para el C3R.

Cuadro IX. Probabilidades resultantes para las variables independientes y sus interacciones.

Parámetro	5-CQA		C3R	
	Efecto estimado	Probabilidad>t	Efecto estimado	Probabilidad>t
Intercepto	42,32	<0,001*	3,363	<0,001*
Ultrasonido (US)	0,837	0,1310	0,031	0,2115
Temperatura (T)	2,852	0,0003*	0,190	<0,001*
Etanol (EtOH)	1,650	0,0096*	0,039	0,1250
US * T	-2,103	0,0148*	-0,047	0,1742
US * EtOH	1,900	0,0237*	0,079	0,0339*
T * EtOH	1,232	0,1118	0,061	0,0887
US * US	0,006	0,9898	-0,006	0,7591
T * T	0,298	0,5252	0,0360	0,1127
EtOH * EtOH	-1,102	0,0369*	-0,003	0,8892

*Valores significativos $p \leq 0,05$

5.2.1. Modelo para el ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)

El modelo de regresión para las variables normalizadas se muestra en la Ecuación 6, y está elaborado con los coeficientes de los parámetros significativos ($p < 0,05$).

$$5\text{-CQA} = 42,32 + 2,85T + 1,65E - 2,10U*T + 1,90U*E - 1,10E^2 \quad (6)$$

El modelo generado es de segundo orden, posee significancia en el efecto lineal positivo de la temperatura y de la concentración de etanol, en la interacción negativa del ultrasonido con la temperatura, en la interacción positiva del ultrasonido con la concentración de etanol y además en el efecto cuadrático negativo del etanol. El efecto negativo indica que una combinación de estos factores (sobre todo si se utilizan valores altos de cualquiera de los factores) pueden causar una disminución de la cantidad de 5-CQA extraída. El efecto simple

del ultrasonido no se presenta, pero sí es importante en combinación con los otros dos factores (T y EtOH).

En la Figura 13 se presenta el comportamiento de la extracción del 5-CQA en función a las variables independientes por medio de las superficies de respuesta. El gradiente de color indica la cantidad del compuesto de interés en el extracto, las zonas verdes indican el menor valor y las zonas rojas el mayor valor.

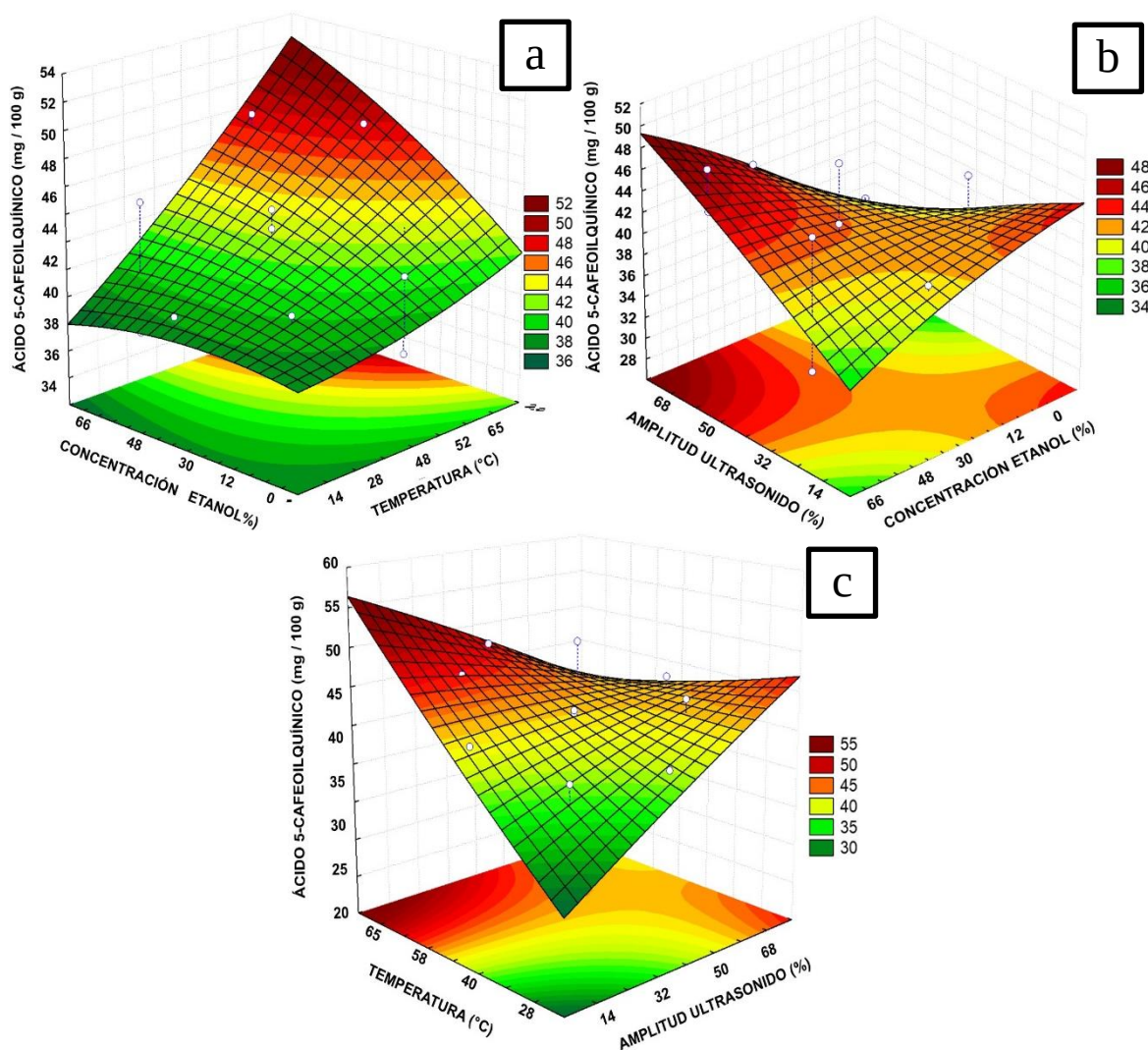


Figura 13. Superficies de respuesta del efecto de los factores analizados en la concentración de 5-CQA en los extractos obtenidos. a) T vs EtOH, b) EtOH vs US, c) US vs T.

En las Figuras 13a y 13c, se observa más claro lo que se indica en la Ecuación 6. El factor que sobresale en la extracción del 5-CQA es la temperatura, y que en un rango de 45 °C a 65° genera buenos resultados de extracción. El aumento de temperatura genera un aumento en la presión de vapor, decrece la viscosidad y la tensión superficial de la mezcla etanol-agua, esto facilita la entrada del disolvente en el sólido (Chanioti *et al*, 2014). Se observa en la Figura 13a, que se obtiene una concentración de 5-CQA máxima cuando se trabaja con los mayores valores de T y EtOH. El efecto de T es más pronunciado para concentraciones altas de EtOH que para concentraciones bajas.

También, la interacción más importante es la dada en la Figura 13c, que presenta una forma de “silla de montar” que señala que, para obtener valores altos de concentración de 5-CQA se debe tener una combinación de alta temperatura con baja amplitud de ultrasonido o viceversa. Si ambos parámetros son bajos o altos, la extracción de 5-CQA es muy pequeña. Se ha visto que, al emplearse el ultrasonido, se debe mantener un control de la temperatura utilizada, por debajo del punto de ebullición del disolvente; ya que el aumento de la presión de vapor reduce la diferencia de presión interna y externa de las burbujas al permitir la entrada de vapor del solvente, de manera que colapsan menos violentamente y reducen los efectos de la sonicación (Chemat *et al.*, 2017).

Por otro lado, la Figura 13b, presenta una forma de “silla de montar” contraria a la Figura 13c. Para valores bajos de ETOH, un aumento de US disminuye la concentración de 5-CQA, pero para valores altos de EtOH un aumento de US provoca un aumento de 5-CQA. Con valores altos de US, la concentración de 5-CQA aumenta con el incremento de EtOH.

El efecto de la concentración de etanol en el aumento de extracción de 5-CQA es más pronunciado a altas temperaturas y a altos valores de US, como se describe en las zonas rojas más altas de las Figuras 13a y 13b.

La concentración de etanol tiene un efecto parabólico negativo (Figuras 13a y 13b) en la extracción del 5-CQA. Inicialmente, la extracción aumenta con el porcentaje etanólico, pero se llega a un punto límite donde comienza a disminuir la tasa de extracción; este comportamiento se expone al fijar algún valor de ultrasonido y al aumentar el porcentaje de

etanol. Las distintas proporciones de etanol modifican la polaridad del medio alterando la solubilidad de los compuestos presentes en la matriz y consecuentemente seleccionando cuáles son extraídos. Este mismo comportamiento obtuvieron Costa *et al.* (2014) al optimizar la extracción de varios compuestos antioxidantes en residuos de piel plateada o “silverskin” del café.

5.2.2. Modelo para la cianidina 3-rutinósido (C3R)

El modelo generado es de primer orden y se presenta en la Ecuación 7, elaborada con los coeficientes de los parámetros significativos ($p < 0,05$) para la superficie respuesta del C3R. Las probabilidades de cada variable independiente y de sus interacciones se encuentran en el Cuadro IX.

$$C3R = 3,36 + 0,19T + 0,079U * E \quad (7)$$

Al igual que con la concentración del 5-CQA, la extracción de concentraciones altas de C3R depende principalmente de la temperatura y de la interacción positiva entre la amplitud del ultrasonido y la concentración de etanol, que son los únicos parámetros significativos en el modelo. El ultrasonido y el etanol no tienen efecto de extracción por sí solos, pero el efecto es relevante por la interacción de ambas variables en conjunto. En la Figura 14 se presentan las superficies de respuesta que describen el comportamiento de la extracción del C3R con respecto a las variables independientes. El gradiente de color indica la cantidad del compuesto en el extracto, las zonas verdes indican el menor valor y las zonas rojas el mayor valor.

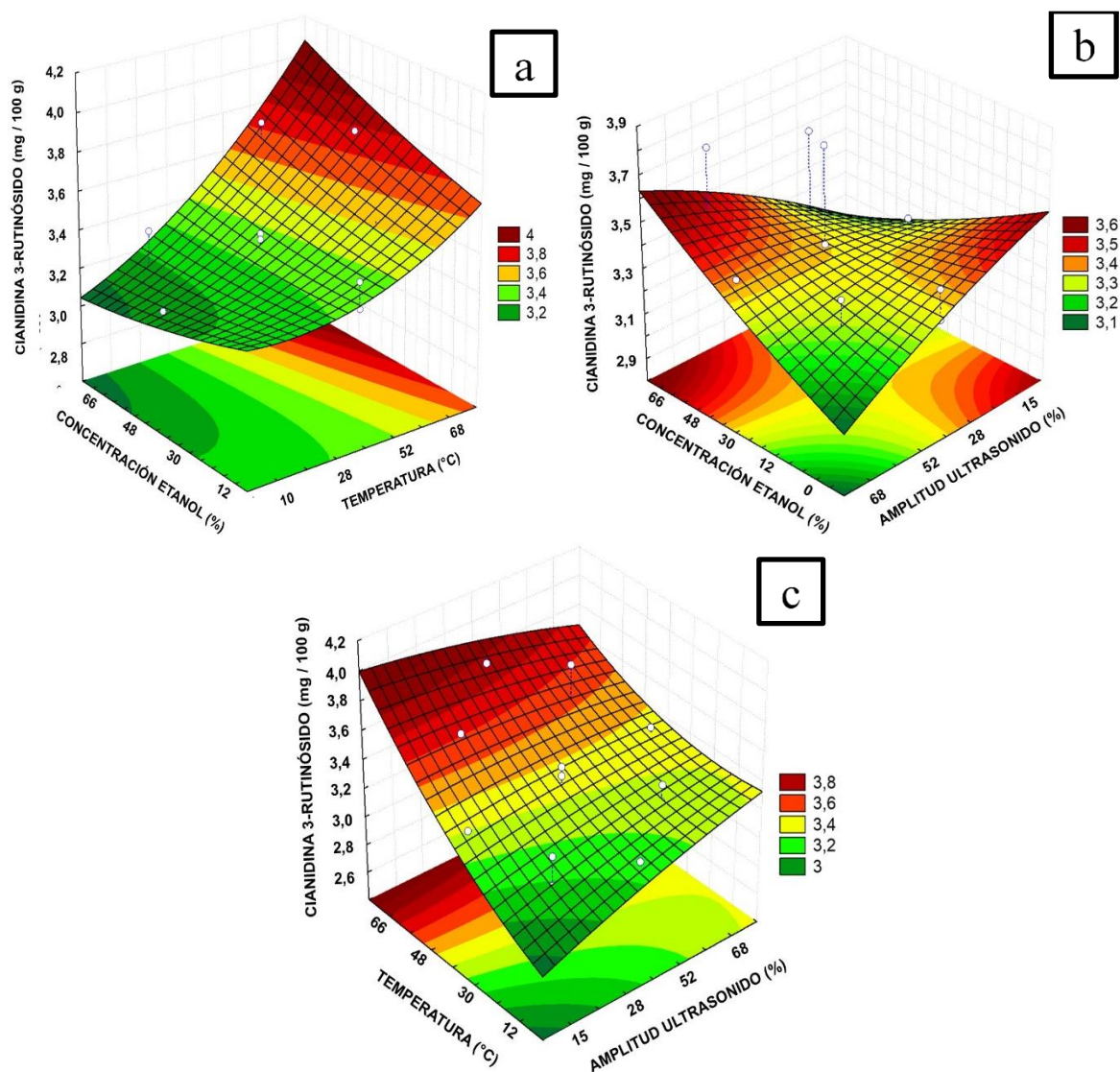


Figura 14. Gráficas de superficie de respuesta del efecto de los factores analizados sobre la concentración de C3R en los extractos obtenidos. a) T vs EtOH, b) US vs EtOH, c) US vs T.

En la Figura 14a, se observa que la cantidad de C3R aumenta hasta alcanzarse la temperatura máxima, casi sin importar la concentración de etanol que se utilice en la extracción. Se maneja una temperatura menor al punto de ebullición del disolvente o a la temperatura de degradación de los compuestos fenólicos, tomando en cuenta que el mismo efecto del ultrasonido puede producir calor y un ligero aumento de temperatura por el movimiento de las partículas y su fricción, además de que la combinación de ambos factores

podría iniciar reacciones de oxidación y degradación de los compuestos de interés (Chemat *et al.*, 2008).

La Figura 14b, tiene una forma de silla de montar, al igual que en el 5-CQA debe haber una combinación de valores bajos o elevados de US y EtOH para lograr altos rendimientos del C3R. Los mejores efectos se dan cuando ambos valores son mayores al 50 %. Se presenta una extracción intermedia cuando no hay US y cuando EtOH es muy baja o si solo se utiliza agua. Por otro lado, en la Figura 14c, el comportamiento de extracción es similar al del C5Q. A T bajas la extracción aumenta con mayores amplitudes de US, y a amplitudes de US bajas la extracción aumenta al incrementar la T. Hay un valor mínimo para valores bajos simultáneos de T y US. La máxima extracción se da a temperatura altas y amplitud de ultrasonido bajo.

Al mismo tiempo, se puede observar que la concentración de etanol es el factor con menor impacto entre las tres variables independientes analizadas (Figura 14a y 14b), por sí solo no resulta sustancial para la extracción del C3R, para este sustrato la efectividad del solvente con algún grado de etanol es dependiente del efecto ultrasónico y de la temperatura para tener mayor profundidad de acceso en la matriz. El etanol no tiene acción en el acarreamiento del C3R a través de la fase sólida si no hay efecto mecánico de la cavitación, en conclusión, en el caso que no se utilice ultrasonido para la extracción, resultaría más efectivo utilizar solamente agua como solvente con mayor afinidad al C3R.

Es preciso considerar que en los tres gráficos la diferencia entre los valores mínimos y máximos de C3R es muy pequeña, reflejo del rendimiento obtenido en las extracciones y del contenido antes de la extracción de $4,1 \pm 0,5$ mg de C3R por cada 100 g de pulpa fresca, esto debido, en gran parte, por la concentración de C3R que queda acarreada en el líquido del prensado durante la preparación de la pulpa (ver Cuadro XII). Además, en estudios de pulpa de dos variedades de café arábica se determinaron cantidades de entre 3,64 mg y 4,09 mg de antocianinas totales por cada 100 g de pulpa fresca, una cantidad no tan diferente a lo obtenido (Rosales *et al.*, 2019). De tal modo que, para valorar la selección de los rangos óptimos no sería necesario tomar los valores extremos de cada variable, sino que se pueden

utilizar los estimados para el 5-CQA tomando en cuenta que se pueda llegar a la zona media ($\sim 3,4$ mg/100 g) de los gráficos de la Figura 14. Por ejemplo, una concentración de etanol mayor al 20%, una temperatura mayor a 50°C , y una amplitud de ultrasonido mayor al 40%.

5.2.3. Zona máxima de extracción y función de deseabilidad

El comportamiento de las superficies de respuesta de ambos modelos resulta en un “*saddle*” o también llamado punto minimax, es decir, no existe un punto definido donde se obtenga ni un mínimo ni un máximo, por lo que no se pueden encontrar unas condiciones óptimas, sino que se deben buscar los rangos en donde se produce el mayor rendimiento de extracción de cada compuesto (Malekjani y Jafari, 2020).

Por medio del programa estadístico JMP[®] Pro 9.0.2 (SAS Institute, USA), se corrió la función de deseabilidad mediante la cual se examinan las respuestas de las concentraciones de 5-CQA y de la C3R simultáneamente para seleccionar las condiciones donde se puede obtener la mayor concentración de ambos compuestos en el extracto. Este valor varía entre 0 y 1, donde 0 representa un valor completamente indeseable y el 1 es el valor considerado como completamente deseable o ideal (Malekjani y Jafari, 2020).

La mejor zona de extracción se encuentra al utilizar condiciones de temperatura entre 58°C y 60°C , amplitud de ultrasonido entre 41 % y 59 % y concentración de etanol entre 40 % y 48 %. Al correr el análisis se obtuvo un valor de deseabilidad de 0,96, como se muestra en la Figura 15. Las condiciones para esta deseabilidad corresponden a una amplitud de ultrasonido de 59 %, temperatura de 58°C , y una concentración de etanol de 48% (m/m), con los que se obtienen rendimientos de 50 ± 4 mg de 5-CQA por cada 100 g de pulpa fresca y de $3,9 \pm 0,2$ mg de C3R por cada 100 g de pulpa fresca.

Se puede notar que en los gráficos ambas variables respuesta tienen un comportamiento bastante similar (Figura 15). Un aumento en la temperatura y la concentración de etanol mejoran la extracción, por esta razón se seleccionaron las condiciones donde los valores de la curva de deseabilidad comienzan a ser constantes. En el gráfico del ultrasonido se muestra que el efecto es casi el mismo con amplitudes bajas o altas, por lo que se utilizó la zona donde la deseabilidad fue mayor. Hay que considerar que las

amplitudes altas son recomendadas para solventes viscosos, y que con solventes poco viscosos suelen impulsar la agitación del medio y reducir los niveles de cavitación (Tiwari, 2015).

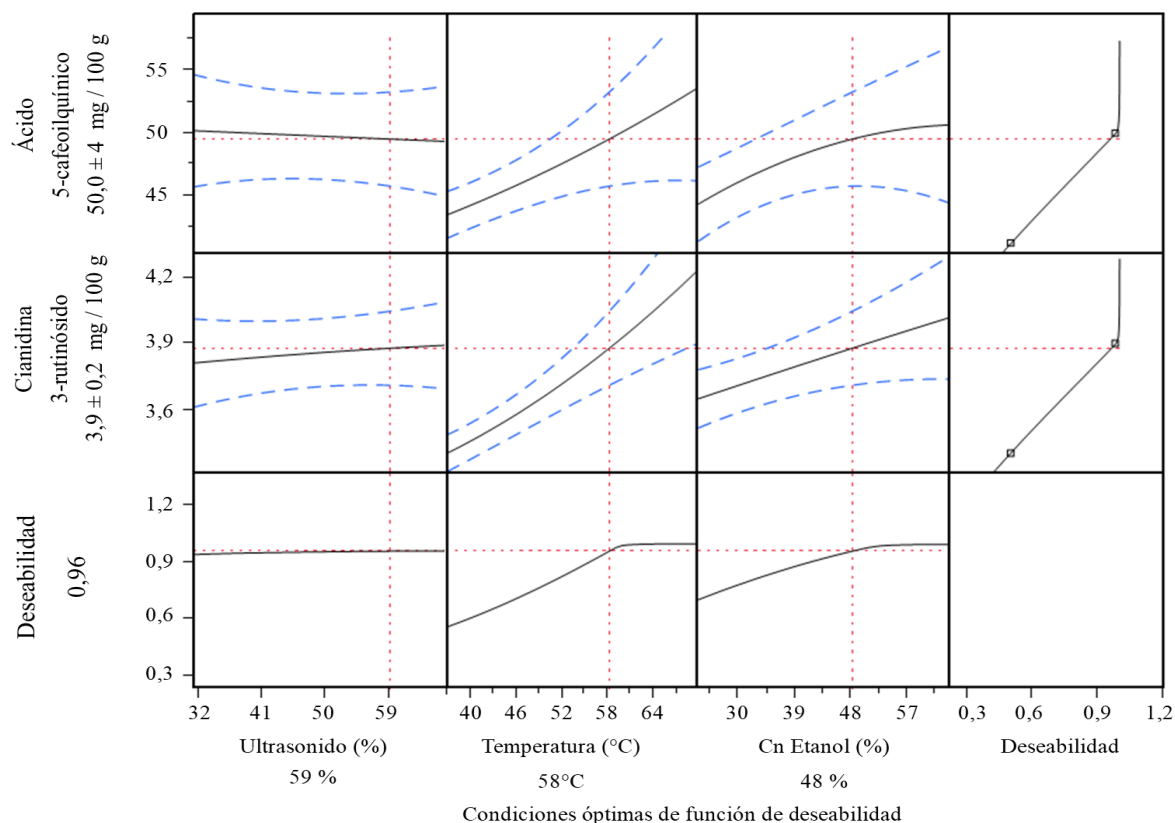


Figura 15. Diagrama con los distintos gráficos de la función de deseabilidad de extracción de los compuestos 5-CQA y C3R.

Con las condiciones seleccionadas que brindan la máxima extracción (US 59 %, T 58 °C, y EtOH 48% (m/m), se realizó una prueba de validación del modelo matemático. Los resultados se muestran en el Cuadro X como promedios y sus intervalos de confianza al 95%. Si los rangos de concentración observados se traslapan con los rangos calculados indican que el modelo es adecuado para describir el comportamiento de la extracción.

Cuadro X. Validación del modelo matemático descriptor de la extracción de los compuestos 5-CQA y C3R presentes en la pulpa de café, US: 59 %, T: 58 °C y EtOH: 48 %

Variable	Promedio predicho	Intervalo confianza predicho	Promedio obtenido	Intervalo confianza Obtenido
5-CQA (mg / 100 g)	46,54	39,05-54,04 ¹	50,31	49,08-52,09 ²
C3R (mg / 100 g)	3,69	3,50-3,88 ¹	2,96	2,79-3,14 ²

¹ Resultados obtenidos con un 95% de confianza (n=3).

² Resultados de los límites inferior y superior de los parámetros de la ecuación al 95% de confianza

Como producto de este análisis se deduce que el modelo del 5-CQA logra predecir el comportamiento de extracción, dado que ambos rangos se traslapan; al mismo tiempo alcanza una concentración promedio mayor al promedio predicho.

Por otra parte, a pesar de que todos los valores estadísticos predictores fueron correctos para el C3R, la prueba de verificación indica que el modelo no predice el comportamiento real de la extracción. Este error de predicción es atribuible, principalmente a la simplicidad del modelo estadístico que solamente produjo dos términos significativos por la diferencia de rendimiento tan pequeña entre las distintas condiciones paramétricas (Rodrigues y Lemma, 2015). Además, las concentraciones obtenidas son bastante bajas por lo que existe la probabilidad de que se presente un error o una variabilidad alta en la medición, lo cual evita la concordancia entre los valores predichos y los obtenidos.

5.2.4. Caracterización del extracto obtenido durante la validación de los modelos

Los extractos de materiales vegetales son una mezcla de diversos compuestos solubles fenólicos y no fenólicos. Un extracto con menor cantidad de impurezas o residuos y mayor contenido de compuestos de interés, facilita los procesos de concentración y purificación posteriores a su obtención, incluyendo ahorro de tiempo, dinero y reactivos.

Para tener una mejor información de la composición química se analizaron los extractos obtenidos con las condiciones óptimas de extracción. Los resultados de los análisis fisicoquímicos se presentan a continuación en el Cuadro XI.

Cuadro XI. Características fisicoquímicas de los extractos etanólicos provenientes de la prueba de verificación del modelo de superficie de respuesta.

Parámetro	Resultado*
Humedad (g agua/100 g)	98 ± 14
Cenizas (g/100 g)	0,189 ± 0,005
Sacarosa (g/100 g)	No detectable (<0,004)
Glucosa (g/100 g)	0,67 ± 0,09
Fructosa (g/100 g)	0,82 ± 0,12
Cafeína (mg/L)	338 ± 31
**ORAC hidrofílico (μmol/L)	13 723 ± 1 425
pH	5,35 ± 0,01
Sólidos solubles (° Brix)	17,3 ± 0,1
Ácido 5-cafeoilquínico (mg/100 g pulpa fresca)	50 ± 1
Cianidina 3-rutinósido (mg/100 g pulpa fresca)	3,0 ± 0,2

*Se reportan en base húmeda como el promedio ± el intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %.

**Siglas en inglés para la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Cuando se busca optimizar un método de extracción, lo primordial es obtener un alto rendimiento de extracción con la mínima contaminación del extracto, y evitando la degradación de los compuestos útiles (Tanase *et al.*, 2018). Para concentrar los compuestos fenólicos presentes, o especialmente cuando se desea un producto en polvo, normalmente obtenido mediante secado por atomización, se requiere que el extracto inicial tenga una cantidad muy baja o cero de azúcares para reducir inconvenientes por caramelización. El extracto obtenido tiene buenas características pues no tiene sacarosa, tiene pocos sólidos solubles, y posee cantidades de glucosa y fructosa bajas; además su contenido de cenizas, que se pueden considerar como una impureza, es también bastante bajo.

No se encontraron datos comparables con los resultados del ORAC del extracto analizado; sin embargo, es de esperar que sean menores a los reportados por Yashin *et al.* (2013) del extracto etanólico del fruto completo ($6\,097 \pm 225$ mmol/ g base seca), esta diferencia dada principalmente por la gran cantidad de compuestos antioxidante presentes en la semilla. No obstante, es posible inferir que la actividad antioxidante de la pulpa de café fresca es menor a la aportada por el extracto etanólico obtenido, ya que el etanol aumenta la capacidad reductora de los compuestos fenólicos.

La cafeína no fue uno de los compuestos de interés; sin embargo, por sus características positivas sobre la fisiología humana representa un beneficio sumado a las antocianinas y los ácidos clorogénicos del extracto obtenido. La cantidad es similar a la presente en varias marcas comerciales españolas de bebidas energéticas (314 mg/L), y mayor que infusiones de té negro (89 mg/L), té verde (130 mg/L) y café instantáneo (70 mg/L) (Rostagno *et al.*, 2011).

Para cada variable respuesta se buscó la mayor concentración en los extractos líquidos, puesto que son los compuestos de mayor interés para este estudio. Las cantidades extraídas de 5-CQA (50 mg / 100 g pulpa) fueron bastante bajas comparadas a otros estudios en subproductos de café en base húmeda: 64-96 mg 5-CQA/ 100 g de cáscara, 170 mg 5-CQA/100 g cáscara, 246 mg 5-CQA/100 g silverskin (Costa *et al.*, 2017; Puga *et al.*, 2017; Iriondo-DeHond *et al.*, 2019). También, la cantidad de C3R recuperada es mucho menor en comparación con lo reportado por Prata y Oliveira (2007) 19,2 mg por cada 100 g de cáscara de café fresca, utilizaron agua como solvente que resulta mejor para extraer antocianinas y adicionalmente el método de medición fue espectrofotométrico lo que podría estar contabilizando otras antocianinas presentes en el café como la cianidina 3-glucósido.

Las cantidades obtenidas de los compuestos extraídos (variables respuesta) en este estudio provienen de las estructuras que se encuentran libres en el interior de las células vegetales de la superficie y el interior de la matriz. Una fracción de los compuestos fenólicos que se encuentran ligados covalentemente a polímeros de las paredes celulares, solo pueden ser obtenidos mediante hidrólisis y puede llegar a ser 83,7% del total presente en la pulpa de

café (Rodríguez-Durán *et al.*, 2018). Además de la porción ligada a las paredes celulares de la pulpa de café, se debe tomar en cuenta el contenido relevante de 5-CQA y C3R presente en la fracción líquida obtenida durante el prensado de la pulpa triturada (Figura 11), como se muestra en el Cuadro XII es un aspecto que reduce los compuestos extraíbles. Asimismo, la humedad restante en el sustrato luego del prensado (60% humedad) puede competir con la disolución del soluto en el disolvente afectando la transferencia de masa y con esto el rendimiento de extracción (Chanioti *et al.*, 2014).

Cuadro XII. Rango del contenido de compuestos de interés presentes en los extractos del residuo y en el jugo del prensado de la pulpa del café.

Muestra	Compuesto	
	5-CQA (mg/L)	C3R (mg/L)
Extracto etanólico del residuo	15,10 - 52,55	2,32 - 10,24
Jugo del prensado	143,15 - 269,25	15,45 - 37,51

Otro aspecto en consideración es el metabisulfito que se agregó al residuo, lo que genera una posibilidad de reacción entre la cianidina-3-rutinósido y el sulfito dada principalmente por la existencia de cationes y formas de antocianidinas, creando la formación reversible 1:1 de un complejo antocianina-bisulfito y reduciendo cantidad de C3R obtenida en el análisis (Adams y Woodman, 1973).

5.3. Modelos de las cinéticas de extracción

Las curvas de las cinéticas de extracción de las variables respuesta obtenidas de los resultados experimentales fueron ajustadas a dos ecuaciones para determinar el modelo más apropiado por medio de una regresión no lineal.

Se utilizó el modelo de Peleg (ecuación 4) que contiene una ecuación no exponencial de dos parámetros, y también el modelo propuesto por Patricelli (Ecuación 5) que contiene una ecuación exponencial de cuatro parámetros. Los resultados de los parámetros estadísticos de probabilidad del modelo (p_{mod}), coeficiente de determinación simple (R^2) y ajustado (R^2_{adj})

se presentan en el Cuadro XIII, junto con las constantes de rapidez k_1 y k_2 , las concentraciones obtenidas y calculadas a los 60 minutos y en el equilibrio.

Las concentraciones teóricas se obtuvieron mediante las ecuaciones obtenidas a partir de las cinéticas de extracción, utilizando como tiempo en común los 60 minutos. La concentración en equilibrio se refiere a la mayor cantidad de compuesto que se puede llegar a tener en el tiempo según la estimación de las cinéticas, bajo condiciones específicas.

Cuadro XIII. Parámetros estadísticos del modelo de Peleg y Patricelli aplicado a cada variable respuesta (n=3)

Parámetro	Peleg		Patricelli	
	5-CQA	C3R	5-CQA	C3R
Probabilidad del modelo (p_{mod})	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Coeficiente determinación (R^2)	0,8075	0,9440	0,8705	0,9867
Coeficiente determinación ajustado (R^2_{adj})	0,8011	0,9422	0,8566	0,9852
Constante de rapidez k_1^*	0,0317	0,2718	0,7483	1,0880
Constante de rapidez k_2^{**}	0,0093	0,1386	0,0227	0,0492
Concentración observada, t= 60 min (mg / L extracto)	110,34	7,44	110,34	7,44
Concentración teórica, t= 60 min (mg / L extracto)	101,75	6,99	111,25	7,39
Concentración equilibrio (mg / L extracto)	107,53	7,22	128,53	7,55

* k_1 Peleg: mL extracto-min/mg compuesto // Patricelli: mg compuesto/mL

** k_2 Peleg: mL extracto/mg compuesto // Patricelli: mg compuesto/mL

Según lo mostrado en el Cuadro XIII, el modelo de Peleg no describe de la mejor manera el perfil cinético de la extracción del 5-CQA, los valores predichos no se ajustan muy bien a los observados, incluso la concentración en el equilibrio es menor que la obtenida a los 60 min de extracción. La cinética de extracción del C3R es descrita de mejor forma como se evidencia en los coeficientes de determinación. Este modelo ha sido utilizado para

describir extracciones debido a la similitud entre las curvas de las cinéticas de sorción y de extracción; no obstante, originalmente se desarrolló para medir cinéticas de hidratación o deshidratación por esta razón es posible que algunas veces no funcione bien en las extracciones (Bucić-Kojić *et al.*, 2007).

Para cada variable el modelo de Patricelli describe mejor el comportamiento experimental, especialmente para el C3R que obtuvo el coeficiente R^2_{adj} mayor a 0,95. Por lo que se toma como el modelo descriptivo de las cinéticas en este estudio. Al ser el coeficiente k_1 mayor que el k_2 , indica que la etapa de lavado es mucho más rápida que la etapa de difusión, aplicable a la disolución de los compuestos de interés localizados en la superficie y en las células rotas de la matriz, como se ha mencionado se logran extraer los compuestos que se encuentran en su forma libre. La etapa de difusión es lenta dado principalmente por limitaciones de transferencia de masa, del movimiento de los compuestos remanentes hacia el disolvente a través de células intactas (Carciochi *et al.*, 2018).

Los coeficientes de determinación de ambos modelos para la cinética de extracción del C3R, son mayores que los obtenidos para el 5-CQA, lo que quiere decir que la variación entre las concentraciones obtenidas a lo largo de la extracción es mucho más alta en 5-CQA afectando la precisión en las predicciones del comportamiento de los datos.

Dos de las corridas del 5-CQA tienen un comportamiento similar; la desviación se da específicamente en una de las repeticiones que presenta valores muy bajos, causando el mal ajuste en el modelado de la cinética. Por otra parte, la baja concentración de C3R, hace que los valores cambien en proporciones muy pequeñas como para afectar negativamente los coeficientes R^2 y R^2_{adj} , así como se observa en la Figura 16b.

En las gráficas de la Figura 16, se muestra el comportamiento de la extracción de los compuestos C3R y 5-CQA en el tiempo. Se nota una tasa alta de extracción en los primeros 15 min, seguida una tasa menos pronunciada el resto del tiempo. En los resultados experimentales para el 5-CQA se presenta una gran variación (Figura 16a), las líneas de predicción (rojas) no están muy ajustadas a las líneas de confianza (azules), lo cual explica los valores bajos de los coeficientes de determinación.

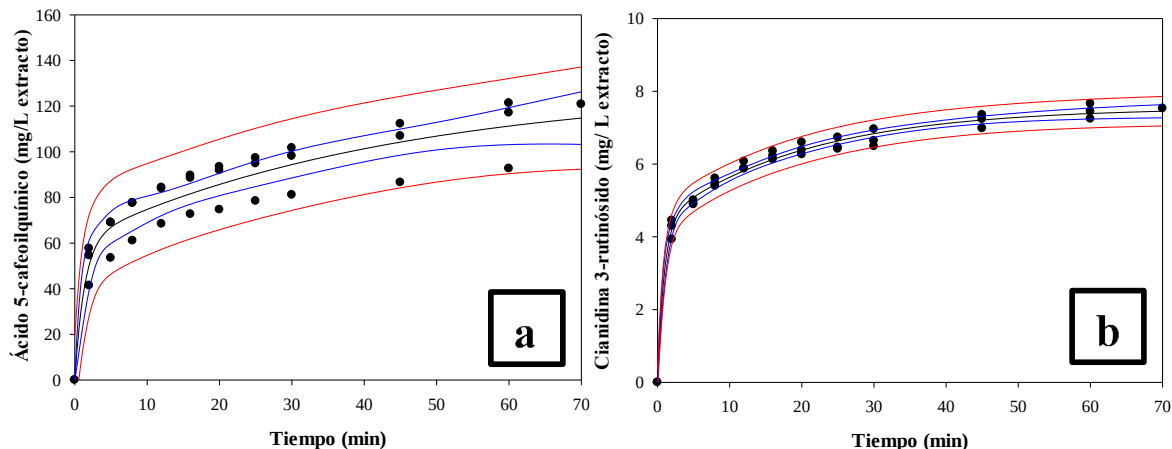


Figura 16. Curvas de las cinéticas de Patricelli a) 5-CQA y b) C3R, utilizando las condiciones 59 °C, 58 % US, 48% etanol (n=3). Líneas rojas: Intervalos de predicción. Líneas azules: Intervalos de confianza

En ambos casos, se observa una fase de lavado muy corta, lo que podría ser por la temperatura que aumenta el poder de solvatación del disolvente. También, se ha determinado que el ultrasonido tiene un efecto sobre esta fase y no sobre la etapa de difusión, haciéndola más corta, por esta razón reduce los tiempos de extracción en comparación con los métodos tradicionales (Chan *et al.*, 2014).

Asimismo, se observa que la fase de difusión disminuye progresivamente conforme aumenta el tiempo de extracción, debido a la reducción del gradiente de concentración y que el rendimiento de extracción se acerca al valor en el equilibrio; además de que existen estructuras más afines a la matriz vegetal y colocadas en regiones más lejanas a la superficie, lo que hace más difícil el proceso de difusión (Hadrach *et al.*, 2016).

Para efectos prácticos se eligió terminar la extracción a los 60 minutos, ya que se tiene más de 85% de extracción total del 5-CQA y 98% de C3R y, además entendiéndolo como una operación real, el utilizar períodos demasiado largos para obtener una concentración un poco mayor implica pérdidas de eficiencia del sistema.

Al aumentar el tiempo de extracción se obtiene un mayor rendimiento de los compuestos fenólicos, sin embargo, se puede decir que las condiciones elegidas en las pruebas anteriores son bastante efectivas, teniendo presente que la cantidad extraída en 25 minutos, 101,4 mg 5-CQA por litro de extracto y 5,97 mg C3R por litro de extracto, es aproximadamente 92% para el 5-CQA y 80% para el C3R del total extraído en 60 minutos. Se obtiene 79 % del total de 5-CQA y de C3R que podrían ser extraídos durante este tiempo relativamente corto, lo que indica buenas condiciones para la valorización de la pulpa antes que lleve algún otro proceso final.

6. Conclusiones

- Con los resultados del diseño de Plackett-Burman se establece que la extracción del 5-CQA a partir de pulpa de café fresca es afectada por cinco factores principales, de mayor a menor efecto: concentración de etanol, la amplitud del ultrasonido y la temperatura, pH y tiempo de extracción.
- Con los resultados del diseño de Plackett-Burman se establece que la extracción del C3R a partir de pulpa de café fresca es afectada por cinco factores principales, de mayor a menor efecto: amplitud de ultrasonido, tiempo de extracción, velocidad de agitación, temperatura y pH.
- El modelo cuadrático de extracción de 5-CQA establece que su concentración es función lineal positiva de la temperatura y concentración de etanol, que el etanol ejerce un efecto cuadrático negativo y que es afectada por las interacciones temperatura-ultrasonido y ultrasonido-concentración de etanol
- El modelo cuadrático de extracción de C3R depende principalmente de la temperatura y de la interacción positiva ultrasonido-etanol, que son los únicos parámetros significativos. El ultrasonido y el etanol no tienen efecto de extracción por sí solos, pero el efecto es relevante cuando se utilizan ambas variables en conjunto.
- La extracción de 5-CQA y del C3R se maximiza utilizando una concentración de etanol 48%, una temperatura de 59°C y una amplitud de ultrasonido de 58 %, con lo cual se obtiene una deseabilidad del 96% y unas concentraciones de 50 ± 1 mg de 5-CQA y $3,0 \pm 0,2$ mg de C3R por cada 100 g pulpa fresca.
- Los modelos generados a partir del diseño central compuesto predicen correctamente el comportamiento de extracción del 5-CQA, pero no del C3R.
- El contenido de cenizas (0,189 g/100 g) y de azúcares simples (1,49 g/100 g) del extracto obtenido es bajo representando una ventaja para tratamientos posteriores de secado o purificación.

- El modelo de Patricelli, que describe dos etapas de extracción, es más adecuado para describir las cinéticas de extracción del 5-CQA y del C3R que el modelo de Peleg.
- En 60 minutos de extracción bajo las condiciones establecidas en el estudio de superficie de respuesta se obtiene 98% de la concentración total extraíble de C3R y 85% del total extraíble de 5-CQA.
- El tiempo de extracción de 25 minutos, es suficiente para extraer el 92% de 5-CQA y 80% de C3R obtenidos en una extracción de 60 minutos.

7. Recomendaciones

- Utilizar un sistema de extracción cerrado para evitar la pérdida de disolvente por evaporación.
- Determinar el contenido de polifenoles totales y antocianinas totales, y de taninos en la muestra inicial y en el extracto, lo que puede aportar mayor información sobre otros compuestos benéficos presentes en el extracto que pueden aportar actividad antioxidante.
- Comparar el rendimiento y el poder antioxidante obtenidos con la extracción convencional y con la asistida por ultrasonido.
- Realizar pruebas de extracciones en dos o tres etapas, para ensayar mejoras en los rendimientos de extracción.
- Analizar la posibilidad de utilizar técnicas de concentración y secado por aspersión para obtener un producto con potencial uso nutracéutico o como aditivo alimentario.

8. Referencias

- ADAMS, J. y WOODMAN, J. 1973. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. II. The anaerobic degradation of cyanidin-3-rutinoside at 100 °C and pH 3.0 in the presence of sodium sulphite. *Journal of the Science of Food*
- ALVES, R.; RODRIGUEZ, F.; NUNES, M.; VINHA, A. y OLIVEIRA, B. 2017. State of art in coffee processing by-products. En Galanakis, M. (ed): Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications. Academic Press. Londres, Reino Unido.
- AMC (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE). 2013. Experimental design and optimization: Plackett-Burman designs. *RSC Publishing*, 55, 1-3.
- ANASTÁCIO, A. y CARVALHO, I. 2012. Phenolics extraction from sweet potato peels: Key factors screening through a Plackett-Burman design. *Industrial Crops and Products*, 43, 99-105.
- ANDERSEN, O. y JORDHEIM, M. 2014. Basic anthocyanin chemistry and dietary sources. En Giusti y Wallace (eds): Anthocyanins in Health Disease. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis 18a ed. Methods 920.151, 981.12, 942.15, 932.12 y 940.26. Association of Official Analytical Chemists, Maryland
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. y KOMES, D. 2017. Extraction and Formulation of Bioactive Compounds. En Galanakis, M.(ed): Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications. Academic Press. Londres, Reino Unido.
- BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIĆ, M. y VELIĆ, D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*. 81:236-242.

- BUCIĆ-KOJIĆ, A., SOVOVÁ, H., PLANINIC, M. y TOMAS, S. 2013. Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, 136, 1136-1140.
- CABALLERO-VALDÉS, E.; OLIVARES-MIRALLES, A.; SOTO-MALDONADO, C. y ZÚÑIGA-HANSEN, M. 2016. Solid-Liquid Extraction of Polyphenols at Low Pressure. En Valenzuela *et al.* (eds): *Advances in Technologies for Producing Food-Relevant Polyphenols*. CRC Press. Boca Raton, Estados Unidos.
- CANET, G.; SOTO, C.; OCAMPO, P.; RIVERA, J.; NAVARRO, A.; GUATEMALA, G. y VILLANUEVA, S. 2016. La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. IICA. San José, Costa Rica.
- CARCIOCHI, R.; SOLOGUBIK, C.; FERNÁNDEZ, M.; MANRIQUE, G. y D’ALESSANDRO, L. 2018. Extraction of antioxidant phenolic compounds from brewer’s spent grain: Optimization and kinetics modeling. *Antioxidants*. 7(4):45
- CASTILLO, M.; IRIONDO-DEHOND, A.; MARTINEZZ-SAENZ, N.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; IRIONDO-DEHOND, M. y ZHOU, J. 2017. Applications of recovered compounds in Food Products. En Galanakis, C. (ed) *Handbook of Coffee Processing By-Products*. Academic Press. Londres, Reino Unido
- CELLI, G., GHANEM, A. y BROOKS, M. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 449-455.
- CHAN, C.; YUSSOFF, R. y NGOH, G. 2014. Modelling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*. 92: 1169-1186.
- CHANIOTI, S., LIADAKIS, G. y TZIA, C. 2014. Solid-Liquid Extraction. En Varzakas, T. y Tzia, C. (eds): *Food Engineering Handbook*. CRC Press. Boca Raton, Estados Unidos.

- CHAVES-ULATE, C. y ESQUIVEL-RODRÍGUEZ, P. 2019. Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía Mesoamericana*. 30:299-311.
- CHEMAT, F.; TOMAO, V. y VIROT, M. 2008. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. En Ötles, S. (ed) Handbook of Food Analysis Instruments. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A. y ABERT-VIAN, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- CHEN, K. y CHEN, M. 2008. Statistical Optimization: Response Surface Methodology. En Erdoğan, F. (ed): Optimization in Food Engineering. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- CONEJO, V. 2016. Extracción de aceite de semilla de mora (*Rubus adenotrichos*), utilizando isopropanol como disolvente y evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, de calidad y estabilidad oxidativa. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- CONTRERAS-ANGULO, L.; RUIZ-CANIZALES, J.; EMUS-MEDINA, A. y HEREDIA, J. 2018 By-Products from Coffee Processing. Plant Food By-Products: Industrial Relevance for Food Additives and Nutraceuticals. New York: Apple Academic Press.
- COSTA, A.; ALVES, R.; VINHA, A.; BARREIRA, S.; NUNES, M.; CUNHA, L. y OLIVEIRA, M. 2014. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*. 53: 350-357.

- COSTA, A.; ALVES, R.; VINHA, A.; COSTA, E.; COSTA, C.; NUNES, M.; ALMEIDA, A.; SANTOS-SILVA, A. y OLIVEIRA, M. 2017. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chemistry*. 267:28-35.
- DAWIDOWICZ, A. y TYPEK, R. 2011. The influence of pH on the thermal stability of 5-O-caffeoylquinic acids in aqueous solutions. *European Food Research and Technology*. 233:223-232.
- DE MARÍA, C.; TRUGO, L.; DE MARIZ E MIRANDA, L. y SALVADOR, E. 1999. Stability of 5-caffeoylquinic acid under different conditions of heating. *Food Research International*. 31(6-7):475-477.
- DOMINGUEZ, H. y GONZÁLEZ, M. 2017. Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development. Elsevier Inc. Amsterdam, Holanda.
- ESQUIVEL, P. y JIMÉNEZ, V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46, 488-495.
- FERREIRA, R. 2017. Bioactive phenolic compounds: Extraction procedures and methods of analysis. En Garde-Cerdán *et al.* (eds): Phenolic Compounds. Nova Science Publishers, Inc. Estados Unidos.
- FOX, M. y WHITESELL, J. 2000. Química orgánica. 2 ed. Addison Wesley Longman. México.
- FRANCA, A. y OLIVEIRA, L. 2016. Coffee and its by-products as sources of bioactive compounds. Coffee: Production, Consumption and Health Benefits. Nova Science Publishers, Inc, USA.
- GALILI, S. y HOVAV, R. 2014. Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds. En Ross (ed): Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Academic Press. Londres, Reino Unido.

- GALVÁN, L., DIMITROV, K., VAUCHEL, P. y NIKOV, I. 2014. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*. 92, 1818-1826.
- GERTENBACH, D. 2016. Solid-Liquid Extraction Technologies for Manufacturing Nutraceuticals. En Shi, J. *et al.* (eds): Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. Boca Raton, Estados Unidos.
- GLOBAL POLYPHENOLS INDUSTRY. 2019. Polyphenols Market Size, Share y Trends Analysis Report by Product (Grape Seed, Green Tea, Cocoa), By Application (Beverages, Food, Feed, Dietary Supplements, Cosmetics), And Segment Forecasts, 2019-2025. Recuperado 18/03/2020 de <https://www.researchandmarkets.com/reports/4761235/polyphenols-market-size-share-and-trends>
- GUGLIELMETTI, A.; D'IGNOTI, V.; GHIRARDELLO, D.; BELVISO, S. y ZEPPA, G. 2017. Optimization of ultrasound and microwave-assisted extraction of caffeoylquinic acids and caffeine from coffee silverskin using response surface methodology. *Italian Journal Food Science*. 29: 409-423.
- HADRICH, B., DIMITROV, K. y KRIAA, K. 2016. Modelling investigation and parameters study of polyphenols extraction from carob (*Ceratonia siliqua* K.) using experimental factorial design. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), 1-10.
- HERRERA, J.; CORTINA, H.; ANTHONY, F.; SURYA, N.; LASHERMES, P.; GAITÁN, M.; CRISTANCHO, M.; ACUÑA, M. y LIMA, D. 2011. Coffee (*Coffea* spp.). En Sing, R. (ed): Genetic Resources, Chromosome, Engineering and Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Estados Unidos.

- HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. y PRIOR, R. 2002. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 437-444.
- IBARZ, A. y BARBOSA-CÁNOVAS, G. 2002. Unit Operations in Food Engineering. CRC Press. Boca Ratón, Estados Unidos.
- ILBAY, Z.; ŞAHİN, S. y KIRBAŞLAR, Ş. 2013. Optimization of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93:2804-2809.
- ICAFE. (Instituto del Café de Costa Rica). 2015. El Mejor Café del Mundo. Recuperado el 04/02/2020 de <http://www.icafe.cr/nuestro-café/el-mejor-café-del-mundo/>
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2019. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. Recuperado el 18/02/2020 de http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/71Información_mercado/informes_actividad/actual/Informe%20Actividad%20Cafetalera.pdf
- IDF (1998) Heat Treated Milk – Determination of lactulose content method. Standard No |47B International Dairy Federation. Bruselas
- INTE/ISO 20481:2011 Café y productos del café. Determinación del contenido de cafeína Usando cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Método de referencia.
- IRIONDO-DEHOND, A.; APARICIO, N.; FERNÁNDEZ-GOMEZ, B.; GUI SANTES-BATAN, E.; VELÁZQUEZ, F.; BLANCH, G.; SAN ANDRÉS, M.; SANCHEZ-FORTUN, S. y DEL CASTILLO, M. 2019. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 51:194-204.

- JANISSEN, B. y HUYNH, T. 2018. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation y Recycling*, 128, 110-117.
- JIMÉNEZ, J. 2016. Valorización de la pulpa de café (*Coffea arabica*) mediante la extracción de ácidos hidroxycinámicos y clorogénicos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica.
- JING, P. y GIUSTI, M. 2014. Analysis of anthocyanins in biological samples. En Giusti y Wallace (eds): *Anthocyanins in Health and Disease*. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton, Estados Unidos.
- KAMRAN, M., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A.S., DANGLES, O. y CHEMAT, F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119, 851-858.
- KESHARWAMI, R.; SINGH, P. y KESERVANI, R. 2017. Green Coffee Bean Extract and Chlorogenic Acids: Chemistry and Novel Antioxidant Benefits. En Bagchi, D. *et al.* (eds): *Green Coffee Bean Extract in Human Health*. CRC Press. Boca Raton.
- KUMARI, B.; TIWARI, B.; HOSSAIN, M. ; RAI, D. y BRUNTON, N. 2017. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from potato peels: profiling and kinetic modelling. *International Journal of Food Science and Technology*. 51:1432-1439.
- LI, X., CHEN, F., LI, S., JIA, J., GU, H. y YANG, L. 2016. An efficient homogenate-microwave-assisted from blackcurrant marc: Optimization using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design. *Industrial Crops and Products*, 94, 834-847.
- LASHERMES, P. 2018. Achieving sustainable cultivation of coffee: Breeding and quality traits. Cambridge: Burleigh Dodd Science Publishing

- MALEKJANI, N. y JAFARI, M. 2020. Food process modeling and optimization by response surface methodology (RSM). En Sevda y Singh (eds): Mathematical and Statistical Applications in Food Engineering. CRC Press. Boca Raton, Estados Unidos.
- MOJZER, E., KNEZ, M., SKERGET, M., KNEZ, Z. y BREN, U. 2016. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*. 21(901): 1-38.
- MURTHY, P. y NAIDU, M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 66:45-58
- MURTHY, P., MANJUNATHA, M., SULOCHANNAMA, G. y NAIDU, M. 2012. Extraction, characterization and bioactivity of coffee anthocyanins. *European Journal of Biological Sciences*, 4,13-19.
- MUSSATTO, S. y TEIXEIRA, J. 2013. Coffee. En Engineering Aspects of Food Biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- MUSTAPA, A.N., MARTIN, A., GALLEGO, J.R., MATO, R.B. y COCERO, M.J. 2015. Microwave-assisted extraction of polyphenols from *Clinacanthus nutans* Lindau medicinal plant: Energy perspective and kinetics modeling. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 7, 66-74.
- OTT, R. y LONGNECKER, M. 2010. An introduction to statistical methods and data analysis. 6 ed. Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, Estados Unidos.
- PAN, Z., QU, W., MA, H., ATUNGULU, G. y MCHUGH, T. 2011. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 1249-1257.

- PAPOUTSIS, K., PRISTIJONO, P., GOLDING, J., STATHOPOULOS, C., BOWYER, M., SCARLET, C. y VUONG, Q. 2018. Optimizing a sustainable ultrasound-assisted extraction method for the recovery of polyphenols from lemon by-products: comparison with hot water and organic solvents extractions. *European Food Research and Technology*, 244, 133-1365.
- PARDOE, I. 2012. Applied regression modeling. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, Estados Unidos.
- PIRISINO, J. 1983. High Performance Liquid Chromatographic determination of lactose, glucose and galactose in lactose-reduced milk. *Journal Food Science*, 48, 742-754.
- PRATA, E. y OLIVEIRA, L. 2007. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. *LWT-Food science and Technology*, 40(9):1555-1560.
- PRIOR, R., WU, X. y SCHAICH, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- PUGA, H.; ALVES, R.; COSTA, A.; VINHA, A. y OLIVEIRA, M. 2017. Multi-frequency multimode modulated technology as a clean, fast, and sustainable process to recover antioxidants from a coffee by-product. *Journal of Cleaner Production*. 168: 14-21.
- QUIRÓS, A. 2016. Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- RANGEL, V. 2016. Valorización de un subproducto del procesamiento agroindustrial de guayaba (*Psidium guajava*) mediante la extracción de compuestos antioxidantes (polifenoles y carotenoides). Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

- RODRÍGUEZ-DURÁN, L.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. y SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. 2018. Coffee. Pulp as potential source of phenolic bioactive compounds. En Chávez-González *et al.* (eds) Handbook of Research on Food and Technology. vol 1. Apple Academic Press, New York, Estados Unidos.
- RODRÍGUEZ, M. y LEMMA, A. 2015. Experimental Design and Process Optimization. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos
- ROSALES, S.; ALZATE, A. y ROJANO, B. 2019. Antioxidant capacity, bioactive compounds in coffee pulp and implementation in the production of infusions. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 18(3):235-248.
- ROSELLÓ-SOTO, E., GALANAKIS, C., BRNCIC, M., ORLIEN, V., TRUJILLO, F., MAWSON, R., KNOERZER, K., TIWARI, B. y BARBA, F. 2015. Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science y Technology*, 42, 134-149.
- ROSTAGNO, M.; MANCHON, N.; ARRIGO, M.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; RAMOS, A. y MARTÍNEZ, J. 2011. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*. 685:204-211.
- SUI, X.; DONG, X. y ZHOU, W. 2014. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry*, 163:163-170.
- SULLIVAN, D. y CARPENTER, D. 1993. AOAC International, methods of analysis for nutrition labeling. 455-534. Arlington, Estados Unidos.

- TANASE, C.; DOMOKOS, E.; COSARCĂ, S.; MIKLOS, A.; IMRE, S.; DOMOKOS, J. y DEHELAN, C. 2018. Study of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Beech (*Fagus sylvatica* L.) Bark. *BioResources*. 13(2):2247-2267.
- TIWARI, B. 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71:100-109.
- TORRES-LEÓN, C., ROJAS, R., SERNA-COCK, L., BELMARES, R. y AGUILAR, C. 2017. Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 188-196.
- TEXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E.; GARRIDO, J. y BORGES, F. 2013. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*. 251754. Recuperado e 20/03/2020 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730368/>
- TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. 2016. Polyphenols market by product (grapeseed, green tea, apple and others), by application (functional beverages, functional food, dietary supplements and others)—global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast (2012–18). Recuperado el 0/09/2018 de <https://www.transparencymarketresearch.com/polyphenol-market.html>
- VANAJA, K. y RANI, R.H. 2007. Design d experiments: Concept and application of Plackett Burman Design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 24, 1-23.
- VIGNOLI, J., CALDEIRA, M., GENTIL, D. y DE TOLEDO, M. 2016. Coffee Brews Preparation: Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity. Coffee Production, Consumption and Health Benefits. Brazil: Nova Science Publishers, Inc.
- VILLALTA, K. 2016. Estudio de la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza de café (*Coffea arabica*) para su aplicación como ingrediente colorante de alimentos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

- VIROT, M. ; TOMAO, V. ; LE BOURVELLEC, C. ; RENARD, C. y CHEMAT, F. 2010. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17:1066-1074.
- WANG, L. y WELLER, C. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 17:300-312.
- WEN, C.; ZHANG, J.; ZHANG, H. ; DZAH, C. ; ZANDILE, M.; DUAN, Y.; MA, H. y LUO, X. 2018. Advances in ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 48:538-549.
- WU, X., BEECHER, G., HOLDEN, J., HAYTOWITZ, D., GEBHARDT, S. y PRIOR, R. 2004. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12): 4026-4037.
- YASHIN, A.; YASHIN, Y.; WANG, J. y NEMZER, B. 2013. Antioxidant and antiradical activity of coffee. *Antioxidants* 2:230-245.
- ZORIĆ, Z.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; PEDISIĆ, S.; KURTANJEK, Ž. Y ELEZ, I. 2014. Kinetics of the degradation of anthocyanins, phenolics acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry Marasca paste. *Food Technol. Biotechnol.* 52:101-108.
- ZÚÑIGA, G. 2017. Evaluación del efecto de la ultrafiltración, la diafiltración y de las condiciones de secado por atomización para la obtención de un extracto de broza de café en polvo rico en antocianinas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

9. Anexos

9.1 Prueba de discriminación con el diseño de Plackett-Burman

9.1.1 Resultados de rendimiento de 5-CQA y C3R

Cuadro XIV. Valores obtenidos de ácido 5-cafeoilquínico y cianidina 3-rutinósido, a partir de las combinaciones de factores para la prueba de discriminación Plackett-Burman.

Variables independientes ¹								Variables respuesta ²	
T (°C)	t (min)	pH	S/D (m/m)	Etanol (%)	AUS (%)	FUS	V. Ag. (rpm)	C3R mg/100 g pulpa	5-CQA mg/100 g Pulpa
50 (+1)	10 (-1)	5 (+1)	1/10 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	Continuo (+1)	220 (+1)	2,85	38,89
50 (+1)	40 (+1)	3,5 (-1)	1/5 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	15/15 (-1)	220 (+1)	3,16	31,90
20 (-1)	40 (+1)	5 (+1)	1/10 (-1)	30 (+1)	0 (-1)	15/15 (-1)	0 (-1)	3,02	48,66
50 (+1)	10 (-1)	5 (+1)	1/5 (+1)	0 (-1)	40 (+1)	15/15 (-1)	0 (-1)	3,80	51,54
50 (+1)	40 (+1)	3,5 (-1)	1/5 (+1)	30 (+1)	0 (-1)	Continuo (+1)	0 (-1)	3,15	52,26
50 (+1)	40 (+1)	5 (+1)	1/10 (-1)	30 (+1)	40 (+1)	15/15 (-1)	220 (+1)	3,37	65,36
20 (-1)	40 (+1)	5 (+1)	1/5 (+1)	0 (-1)	40 (+1)	Continuo (+1)	0 (-1)	4,15	44,50
20 (-1)	10 (-1)	5 (+1)	1/5 (+1)	30 (+1)	0 (-1)	Continuo (+1)	220 (+1)	2,14	40,50
20 (-1)	10 (-1)	3,5 (-1)	1/5 (+1)	30 (+1)	40 (+1)	15/15 (-1)	220 (+1)	2,61	44,26
50 (+1)	10 (-1)	3,5 (-1)	1/10 (-1)	30 (+1)	40 (+1)	Continuo (+1)	0 (-1)	3,21	55,57
20 (-1)	40 (+1)	3,5 (-1)	1/10 (-1)	0 (-1)	40 (+1)	Continuo (+1)	220 (+1)	2,79	40,32
20 (-1)	10 (-1)	3,5 (-1)	1/10 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	15/15 (-1)	0 (-1)	2,23	27,59

¹T: temperatura. t: tiempo. S/D: Relación sólido/disolvente. Etanol: Concentración de solución de etanol. AUS: Porcentaje de amplitud de ultrasonido. FUS: Forma uso de ultrasonido, continuo o lapsos de 15 s encendido/15s apagado. V. Ag.: Velocidad de agitación. Valores entre paréntesis corresponden a los valores codificados para cada variable independiente.

² C3R: cianidina 3-rutinósido. C5Q: Ácido 5-cafeoilquínico

9.1.2. Efecto estimado y análisis de varianza para Plackett-Burman de cada variable respuesta

9.1.2.1. Ácido 5-cafeoilquínico

Cuadro XV. Efecto estimado para cada variable independiente para el modelo del 5-CQA.

Factor	Efecto	Error estándar	t (3)	p	-90 %	+90 %
Mean/Intercepto	45,1117	0,86003	52,4535	0,000015*	43,0877	47,1357
Temperatura (°C)	8,2841	1,72006	4,8161	0,01705	4,2361	12,3320
Tiempo (min)	4,1062	1,72006	2,3872	0,09698*	0,0582	8,1541
pH	6,2606	1,72006	3,6397	0,03575*	2,2127	10,3085
Relación S/D (g/g)	-1,9057	1,72006	-1,1079	0,34874	-5,9536	2,1423
Concentración etanol (%)	11,9802	1,72006	6,9650	0,00607*	7,9323	16,0281
Amplitud ultrasonido (%)	10,2929	1,72006	5,9840	0,00934*	6,2449	14,3408
Frecuencia ultrasonido	0,4583	1,72006	0,2664	0,80717	-3,5897	4,5062
Velocidad agitación (rpm)	-3,1480	1,72006	-1,8302	0,16464	-7,1960	0,8999

Cuadro XVI. Análisis de varianza del modelo diseñado con Plackett-Burman para el 5-CQA.

Factor	SS	df	MS	F	p
Temperatura (°C)	205,877	1	205,8771	23,19518	0,017052*
Tiempo (min)	50,582	1	50,5820	5,69883	0,096984*
pH	117,586	1	117,5856	13,24781	0,035748*
Relación S/D (g/g)	10,895	1	10,8949	1,22748	0,348740
Concentración etanol (%)	430,575	1	430,5752	48,51084	0,006073*
Amplitud ultrasonido (%)	317,830	1	317,8297	35,80834	0,009343*
Frecuencia ultrasonido	0,630	1	0,6300	0,07098	0,807172
Velocidad agitación (rpm)	29,730	1	29,7302	3,34955	0,164640
Error	26,628	3	8,8759		
Total SS	1190,332	11			

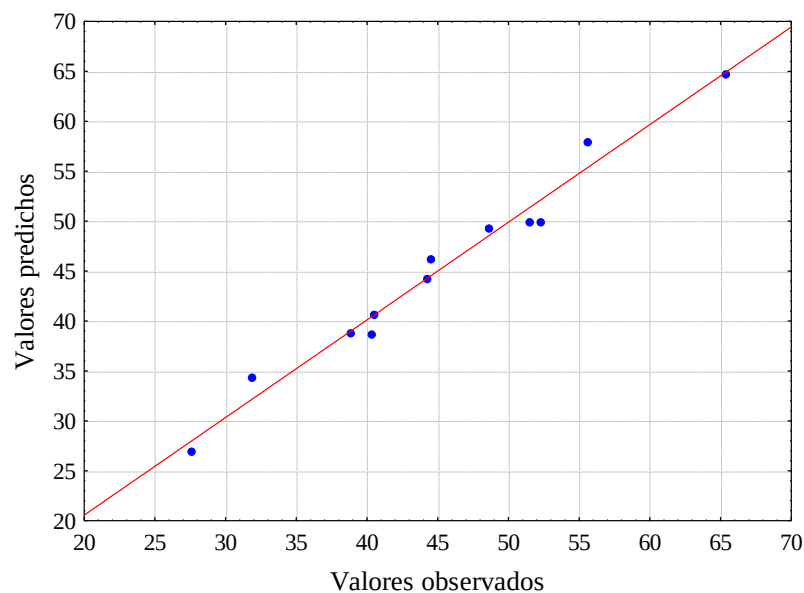


Figura 17. Gráficos de valores predichos vs observados para el modelo del rendimiento de ácido 5-cafeoilquínico generado del diseño Plackett-Burman.

9.1.2.2. Cianidina 3-rutinósido

Cuadro XVII. Efecto estimado para cada variable independiente para el modelo del C3R

Factor	Efecto	Error estándar	t (3)	p	-90 %	+90 %
Mean/Intercepto	3,040080	0,073002	41,64365	0,000030*	2,868279	3,211881
Temperatura (°C)	0,431770	0,146005	2,95724	0,059676*	0,088168	0,775371
Tiempo (min)	0,464132	0,146005	3,17889	0,050137*	0,120531	0,807734
pH	0,361174	0,146005	2,47372	0,089768	0,017572	0,704776
Relación S/D (g/g)	0,258955	0,146005	1,77361	0,174233	-0,084647	0,602556
Concentración etanol (%)	-0,245591	0,146005	-1,68208	0,191144	-0,589193	0,098011
Amplitud ultrasonido (%)	0,563270	0,146005	3,85790	0,030776*	0,219669	0,906872
Frecuencia ultrasonido	0,015334	0,146005	0,10503	0,922984	-0,328267	0,358936
Velocidad agitación (rpm)	-0,442766	0,146005	-3,03255	0,056197*	-0,786368	-0,099164

Cuadro XVIII. Análisis de varianza del modelo diseñado con Plackett-Burman para el C3R.

Factor	SS	df	MS	F	p
Temperatura (°C)	0,559275	1	0,559275	8,74524	0,059676
Tiempo (min)	0,646256	1	0,646256	10,10534	0,050137
pH	0,391340	1	0,391340	6,11929	0,089768
Relación S/D (g/g)	0,201173	1	0,201173	3,14568	0,174233
Concentración etanol (%)	0,180945	1	0,180945	2,82939	0,191144
Amplitud ultrasonido (%)	0,951821	1	0,951821	14,88337	0,030776
Frecuencia ultrasonido	0,000705	1	0,000705	0,01103	0,922984
Velocidad agitación (rpm)	0,588125	1	0,588125	9,19636	0,056197
Error	0,191856	3	0,063952		
SS Total	3,711496	11			

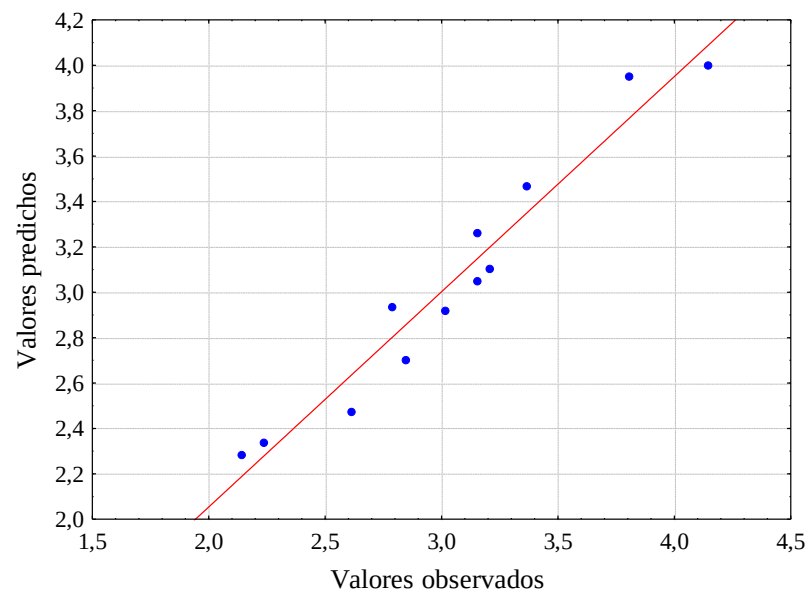


Figura 18. Gráficos de valores predichos vs observados para el modelo del rendimiento de cianidina 3-rutinósido generado del diseño Plackett-Burman.

9.2 Análisis de los modelos mediante superficie de respuesta

9.2.1 Resultados obtenidos para las corridas de DCCR

Cuadro XIX. Resultados obtenidos de cada variable respuesta para las diferentes condiciones de ultrasonido, temperatura y concentración de etanol utilizadas en la optimización de la extracción en estudio. Con un coeficiente de variación de puntos centrales: C5Q 4,95% y C3R 1,72%.

Variables independientes			Variables respuesta		
Amplitud ultrasonido (%)	Temperatura (°C)	Concentración Etanol (%)	5-CQA (mg/100g pulpa)	C3R (mg/100g pulpa)	Influencia de Cook
32 (-1)	28,1 (-1)	12,2 (-1)	36,44	3,22	0,0664
32 (-1)	28,1 (-1)	47,8 (+1)	34,76	2,95	0,0086
32 (-1)	51,9 (+1)	12,2 (-1)	38,63	3,34	0,6495*
32 (-1)	51,9 (+1)	47,8 (+1)	46,27	3,59	0,0077
68 (+1)	28,1 (-1)	12,2 (-1)	39,19	3,18	0,1170
68 (+1)	28,1 (-1)	47,8 (+1)	43,47	3,27	0,1415
68 (+1)	51,9 (+1)	12,2 (-1)	37,36	3,39	0,1135
68 (+1)	51,9 (+1)	47,8 (+1)	48,21	3,68	0,02960
20 (-1,68)	40,0 (0)	30,0 (0)	41,08	3,32	0,1820
80 (+1,68)	40,0 (0)	30,0 (0)	44,25	3,46	0,0036
50 (0)	20,0 (-1,68)	30,0 (0)	38,64	3,22	0,00022
50 (0)	60,0 (+1,68)	30,0 (0)	48,34	3,80	0,2519
50 (0)	40,0 (0)	0,0 (-1,68)	37,31	3,28	0,4406
50 (0)	40,0 (0)	60,0 (+1,68)	41,75	3,52	0,0313
50 (0)	40,0 (0)	30,0 (0)	39,56	3,40	0,0495
50 (0)	40,0 (0)	30,0 (0)	40,33	3,44	0,0259
50 (0)	40,0 (0)	30,0 (0)	44,95	3,29	0,0431
50 (0)	40,0 (0)	30,0 (0)	42,29	3,30	0,000019
50 (0)	40,0 (0)	30,0 (0)	42,53	3,37	0,00021
50 (0)	40,0 (0)	30,0 (0)	44,17	3,36	0,02112

¹C5Q: ácido 5-cafeoilquínico, mg de ácido 5-cafeoilquínico/100 g pulpa de café C3R: cianidina 3-rutinósido, mg de cianidina 3-rutinósido/100 g de pulpa de café.

²Valores entre paréntesis representan los niveles codificados para cada variable independiente

* Número de mayor distancia según la influencia de Cook.

9.2.2 Análisis de varianza

Cuadro XX. Análisis de varianza y de la falta de ajuste para el C5Q.

Fuente	Grados libertad	Suma cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Relación F	Prob > F
Modelo	9	245,50598	27,2784	9,6174	0,0012*
Error	9	25,52726	2,8364		
Total	18	271,03324			
Falta ajuste	4	3,56651	0,89163	0,2030	0,9262
Error puro	5	21,96075	4,39215		
Error total	9	25,52726			

Cuadro XXI. Análisis de varianza y de la falta de ajuste para el C3R.

Fuente	Grados libertad	Suma cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Relación F	Prob > F
Modelo	9	0,602989	0,066999	11,4407	0,0006*
Error	9	0,052706	0,005856		
Total	18	0,655695			
Falta ajuste	4	0,036106	0,009026	2,7188	0,1510
Error puro	5	0,016600	0,003320		
Error total	9	0,052706			

9.2.3 Evaluación de validez de modelos

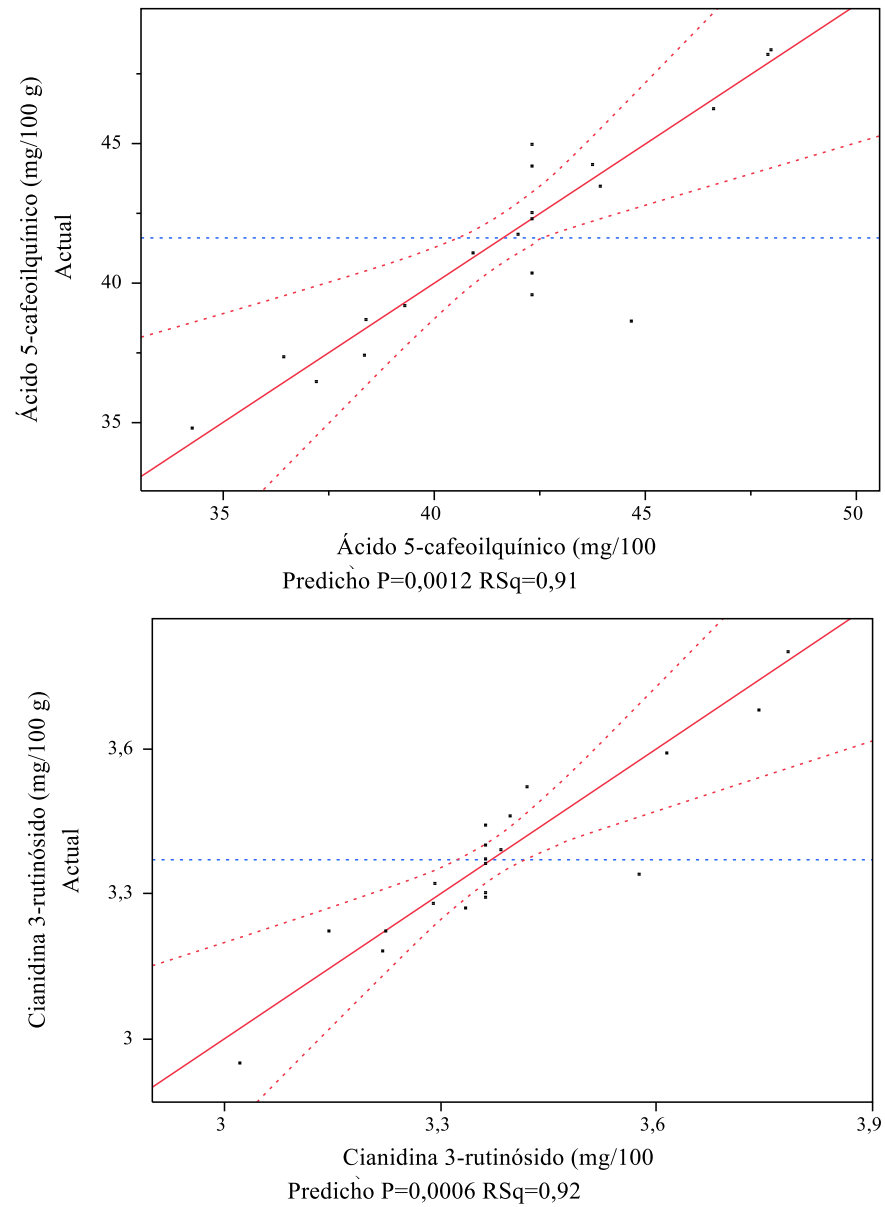


Figura 19. Gráficos de dispersión de los valores observados contra los predichos de los modelos generados por superficies de respuesta de a) 5-CQA y b) C3R.

9.3 Modelado de las cinéticas de extracción en región de mayor extracción

9.3.1 Regresión no lineal de los modelos cinéticos

Cuadro XXII. Resultados del análisis de regresión no lineal de los modelos utilizados para la extracción de cada variable respuesta.

Modelo	Fuente	Grados libertad	Suma cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Relación F	Prob > F	Error estándar estimado
Patricelli 5-CQA	Regresión	4	16561,35	5520,449	62,7205	<0,0001*	9,3817
	Residual	28	2464,468	88,0167			
	Total	32	19025,82	613,736			
Peleg 5-CQA	Regresión	1	15364,04	15364,04	125,8735	<0,0001*	11,048
	Residual	30	3661,781	122,0594			
	Total	31	19025,82	613,736			
Patricelli C3R	Regresión	3	65,1659	21,722	690,9101	<0,0001*	0,1773
	Residual	28	0,8803	0,0314			
	Total	31	66,0462	2,1305			
Peleg C3R	Regresión	1	62,3496	62,3496	505,9941	<0,0001*	0,3510
	Residual	30	3,6967	0,1232			
	Total	31	66,0462	2,1305			