



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de
la República
(PROPAC)**

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Caracterización química de la fibra dietaria de café (*Coffea arabica* L.) usado, obtenida mediante calentamiento óhmico”

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de: Maestro en Ciencia
y Tecnología de los Alimentos

Presenta: IBT. Carlos Vladimir López Rodríguez

Dirigido por: Dra. Rocio Campos Vega

CU, Santiago de Querétaro, Qro, diciembre 2018.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

"Caracterización química de la fibra dietaria de café (*Coffea arabica* L.) usado, obtenida mediante calentamiento óhmico"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:


IBT. Carlos Vladimir López Rodríguez

Dirigido por:


Dra. Rocio Campos Vega

SINODALES

Dra. Rocio Campos Vega
Presidente


Firma

Dr. Eduardo Morales Sánchez
Secretario


Firma

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Vocal


Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Suplente


Firma

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Suplente


Firma


Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el procesamiento térmico del café usado (CU), seguido de calentamiento óhmico por lote (OHML, que utiliza exceso de agua) permite la obtención de un ingrediente con alto contenido en fibra dietética y capacidad antioxidante, reconocida como: fibra dietaria antioxidante (FDA). Además, un estudio clínico evidenció algunos efectos benéficos de su consumo. Sin embargo, se obtuvo una tendencia a la elevación del colesterol total en plasma, lo que se asocia a su contenido de diterpenos (cafestol y kahweol). El objetivo de este trabajo fue obtener FDA de CU mediante calentamiento óhmico semisólido (OHMS) y compararla con la obtenida por OHML mediante su caracterización química, nutracéutica y estructural (microscopía electrónica de barrido, SEM). Así como disminuir el contenido de diterpenos en la fibra obtenida utilizando dos solventes identificados como solvente A y B. Aunque el procesamiento por OHMS disminuyó el consumo de agua y favoreció la retención de antioxidantes (149 y 77.2 $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$, DPPH y ABTS, respectivamente), el contenido de fibra dietaria no se modificó, con respecto a la FDA de OHML. Se identificó que el tratamiento térmico previo al OHML concentra la FDA en un 11% y su posterior tratamiento (OHML) la concentra en un 4% adicional (54 y 62.6% fibra dietaria total, en CU y FDA, respectivamente). Las imágenes obtenidas por SEM muestran que el OHML y OHMS rompen la matriz del CU, disminuyendo el tamaño de partícula. La fibra obtenida mediante OHML fue procesada para disminuir su contenido de diterpenos pasando de 7.2 y 7.0 mg/g a 1.5 y 1.5mg/g, cafestol y kahweol, respectivamente. La fibra resultante de este proceso fue evaluada en un estudio clínico con 14 sujetos y no se mostraron incrementos significativos del colesterol en plasma. Estos resultados sugieren que el proceso empleado disminuyó el contenido de los diterpenos, generando un ingrediente para su inclusión en la industria de alimentos, seguro, con características nutritivas y funcionales.

Palabras clave: Café usado, fibra dietaria, antioxidante, subproductos, compuestos bioactivos, calentamiento óhmico

SUMMARY

In our work group it has been demonstrated that the thermal processing of spent coffee (SC), followed by ohmic heating by lot (OHML, which uses excess water) allows obtaining an ingredient with a high content of dietary fiber and antioxidant capacity, recognized as: antioxidant dietary fiber (ADF). In addition, a clinical study showed some beneficial effects. However, a tendency to raise total cholesterol in plasma was observed, which is associated with its diterpene content (cafestol and kahweol). The objective of this work was to obtain ADF from SC from semi-solid ohmic heating (OHMS) and compare it with that obtained by OHML through its chemical, nutraceutical and structural characterization (scanning electron microscopy, SEM). As well as decreasing the content of diterpenes in the fiber obtained using two solvents identified as solvent A and B. Although processing by OHMS decreased water consumption and favored the retention of antioxidants (149 and 77.2 $\mu\text{mol eq Trolox / g}$, DPPH and ABTS, respectively), the dietary fiber content was not modified, with respect to the OHML ADF. It was identified that the thermal treatment prior to OHML concentrates the FDA by 11% and its subsequent treatment (OHML) concentrates it in an additional 4% (54 and 62.6% total dietary fiber, in CU and FDA, respectively). The images obtained by SEM show that OHML and OHMS break the SC matrix, decreasing the particle size. The fiber obtained by means of OHML was processed to reduce its diterpene content from 7.2 and 7.0 mg / g to 1.5 and 1.5 mg / g, cafestol and kahweol, respectively. The fiber resulting from this process was evaluated in a clinical study with 14 subjects and there were no significant increases in plasma cholesterol. These results suggest that the process used decreased the content of diterpenes, generating an ingredient for inclusion in the food industry, safe, with nutritional and functional characteristics.

Key words: spent coffee, dietary fiber, antioxidants, by-products, bioactive compounds, ohmic heating.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca brindada durante la realización de la Maestría.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** por aceptarme en el programa de posgrado y todo el apoyo en general.

A la **Dra. Rocio Campos Vega** por todo el apoyo, sus conocimientos, sugerencias y consejos. Sobre todo, su paciencia y optimismo en los momentos más difíciles que ayudó mucho para sacar adelante la realización de este trabajo.

Al **Dr. Eduardo Morales Sánchez** y **Dra. Marcela Gaytán Martínez** por su apoyo en cuanto a conocimientos y equipos de laboratorio que fueron de vital utilidad para el desarrollo de este trabajo. Además de los consejos y sugerencias que realizaron a lo largo del proyecto.

A la **Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña** y **Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz** por darme la oportunidad de brindarme su colaboración, tiempo y apoyo. Nunca se negaron en cualquier situación cuando pedí su ayuda.

Agradezco también a la **Dra. María de la Luz Reyes Vega** y **Dra. Aurea Ramírez** por su apoyo y conocimientos que aportaron en algún momento para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio y amigos generación: **Eli, Daniela, Vanessa, Isac, Gersaín, Gloria, Raúl, Luis Carlos, Astrid, Jonathan, Adri, Iván, Liz y Erick** por su apoyo, conocimientos, consejos y sugerencias a lo largo de la maestría.

A mis colegas **Ana, Montse, Freddy y Migue** por su apoyo y conocimiento cuando más lo necesité.

A **Yaz** por todo su apoyo incondicional, paciencia y comprensión que me han ayudado a perseguir mis objetivos cada día.

A mis padres **Ruth y Francisco** porque siempre han estado apoyándome y guiándome en mi desarrollo personal y profesional, sin ellos este trabajo no sería posible.

A mis hermanos **Rubén y Azul** por su apoyo y además han sido fuente de inspiración para la realización de este trabajo.

A mis abuelitos **Rubén y Virginia** por todo el apoyo a lo largo de mi vida, por su ejemplo y consejos. Han sido fuente de inspiración para seguir adelante y cumplir este sueño.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del café	3
2.2 Tostado del grano del café	6
2.2.1 Reacciones de Maillard y compuestos involucrados en el tueste del café	7
2.3 Subproductos de la industria del café.....	8
2.4 Café usado	10
2.4.1 Generalidades y características	10
2.5 Compuestos de interés nutracéutico	12
2.5.1 Fibra dietética.....	12
2.5.2 Compuestos antioxidantes	13
2.6 Métodos de extracción de fibra dietética	14
2.6.1 Procesamiento seco.....	15
2.6.2 Procesamiento húmedo	15
2.6.3 Procesos físicos y microbiológicos.....	17
2.6.4 Métodos gravimétricos	18
2.6.5 Métodos químico-enzimáticos.....	19
2.7 Calentamiento óhmico (OHM)	19
2.7.1 Calentamiento óhmico por lote (OHML).....	21
2.7.2 Calentamiento óhmico semi-sólido (OHMSS).....	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Materiales.....	26
5.1.1 Material biológico	26

5.1.2	Reactivos.....	26
5.2	Métodos	26
5.2.1	Obtención de fibra	26
5.2.1.1	Pre tratamiento de café usado	26
5.2.1.2	Extracción de fibra por calentamiento óhmico en lote	26
5.2.1.3	Extracción de fibra por calentamiento óhmico semi-sólido.....	27
5.2.1.4	Proceso de extracción de diterpenos en fibra de café usado y diseño de superficie de respuesta.....	27
5.2.1.4.1	Obtención de aceite de la fibra de café usado y determinación de índice de peróxidos (IP).....	28
5.2.2	Cuantificación de cafestol y kahweol por HPLC-DAD	29
5.2.3	Características fisicoquímicas y tecnológicas del CU y de la FCU.....	30
5.2.3.1	Medición de pH.....	30
5.2.3.2	Capacidad de retención de agua	30
5.2.3.3	Capacidad de retención de aceite.....	31
5.2.3.4	Capacidad de hinchamiento (CH)	32
5.2.3.5	Actividad (AE) y estabilidad emulsificante (EE)	32
5.2.3.6	Determinación de sacáridos.....	33
5.2.3.6.1	Autohidrólisis	33
5.2.3.6.2	Recobro de polisacáridos.....	33
5.2.3.6.3	Azúcares totales.....	34
5.2.3.6.4	Azúcares reductores	34
5.2.3.6.5	Caracterización de polisacáridos por HPLC-RI.....	35
5.2.4	Análisis proximal	35
5.2.4.1	Determinación de humedad (925.23).....	35
5.2.4.2	Determinación de lípidos (920.39)	36
5.2.4.3	Determinación de proteína (920.105)	36
5.2.4.4	Determinación de cenizas (945.46)	37
5.2.4.5	Determinación de carbohidratos	38
5.2.4.5.1	Determinación de fibra total	38
5.2.4.5.2	Determinación de fibra insoluble	38
5.2.4.5.3	Determinación de fibra soluble.....	39
5.2.5	Análisis nutracéutico	39
5.2.5.1	Extracto etanólico.....	39
5.2.5.2	Cuantificación de fenoles totales.....	39
5.2.5.3	Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD	40

5.2.5.4	Identificación de compuestos fenólicos por UPLC-MS/MS.....	41
5.2.5.5	Capacidad antioxidante.....	42
5.2.5.5.1	ABTS.....	42
5.2.5.5.2	Método DPPH.....	43
5.2.6	Caracterización estructural.....	43
5.2.7	Estudio clínico piloto.....	43
5.2.7.1	Criterios de inclusión y exclusión.....	44
5.2.7.2	Vehículo ingerido y monitoreo de colesterol total.....	44
6.	RESULTADOS.....	45
6.1	Contenido de carbohidratos del café usado con tratamiento de calentamiento óhmico semi-sólido.....	45
6.2	Contenido de diterpenos analizado por HPLC-DAD.....	46
6.3	Diseño de superficie de respuesta para disminuir el contenido de diterpenos en fibra dietaria de café usado...	47
6.4	Índice de peróxidos del aceite de la fibra de café usado.....	49
6.5	Propiedades y características físico-químicas y tecnológicas.....	50
6.6	Contenido de sacáridos y azúcares.....	54
6.7	Determinación próximal.....	56
6.8	Determinación de fenoles totales, ácidos fenólicos, cafeína y capacidad antioxidante.....	59
6.9	Caracterización microestructural por microscopía electrónica de barrido.....	63
6.10	Estudio piloto.....	64
7.	CONCLUSIONES.....	66
8.	REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Compuestos fenólicos presentes en café.....	5
Figura 2. Diagrama de cámara del calentamiento óhmico por lote	22
Figura 3. Diagrama de calentamiento óhmico semi-sólido.....	23
Figura 4. Imágenes Microscopía electrónica de barrido.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del grano de café (<i>Coffea arabica</i> L.).....	4
Tabla 2. Composición química del grano de café (<i>Coffea arabica</i> L.) usado	11
Tabla 3. Polifenoles totales en el café (<i>Coffea arabica</i> L.) usado.....	14
Tabla 4. Diseño de superficie de respuesta para disminuir concentración de diterpenos	28
Tabla 5. Contenido de carbohidratos y fibra dietaria del café usado tratado con calentamiento óhmico semi-sólido.	45
Tabla 6. Contenido de diterpenos en el café usado y posterior a los tratamientos	46
Tabla 7. Contenido de diterpenos del DSR para los solventes utilizados	48
Tabla 8. Resultados predictivos (fórmula de predicción del DSR), y obtenidos para el contenido de diterpenos de la fibra dietaria de café usado.	49
Tabla 9. Índice de peróxidos del aceite de café usado, aceite vegetal comercial nuevo y aceite vegetal comercial usado.	50
Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas y tecnológicas del café usado, café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con calentamiento óhmico en lote y con solvente (A o B).	53
Tabla 11. Contenido de sacáridos y azúcares del café usado, café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con calentamiento óhmico en lote y con solvente (A o B).	55
Tabla 12. Composición proximal del café usado, café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con los solventes A y B.	58
Tabla 13. Determinación de fenoles totales, ácidos fenólicos por UPLC-MS/MS, cafeína y capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en café usado posterior al pretratamiento, café	

usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con los solventes A y B.	62
Tabla 14. Variables del estudio piloto basales y finales	66

1. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más populares. Consumir la bebida por la mañana es rutina para aproximadamente el 40% de la población mundial (Wolska *et al.*, 2017). México ocupa el quinto lugar como productor de café arábica a nivel mundial, siendo los principales estados productores Chiapas, Colima, Oaxaca y Veracruz (Muñiz-Valencia *et al.*, 2014). Esta planta es producida sobre una superficie de 761 mil hectáreas en 12 estados de la República Mexicana. El fruto está compuesto por el pericarpio, pulpa o exocarpio, mucílago o mesocaripio, endocaripio, cutícula y grano de café (Temis-Pérez, López-Malo Vigil, & Sosa-Morales, 2011).

Además, la bebida de café ocupa el segundo puesto en cuanto a producto comercializado, como consecuencia, genera desechos que llegan a representar hasta el 90% de la masa total de la cereza. Y aunque el café usado, recuperado posterior al a preparación de la bebida, representa el 50% de los subproductos generados, tiene limitado valor comercial para la industria (Campos-Vega, Loarca-Piña, Vergara-Castañeda, & Oomah, 2015; Zuorro & Lavecchia, 2012).

El café usado presenta compuestos benéficos a la salud que son de interés industrial. Entre ellos los ácidos grasos, proteínas, minerales, carbohidratos, antioxidantes como polifenoles, que también tienen capacidades anti-bacteriales, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas (Campos-Vega *et al.*, 2015). Además, el café usado ha demostrado ser una excelente fuente de fibra dietética, con valores que van del 55 al 60 %. El grano contiene polisacáridos como galactomananos, arabinogalactanos de tipo II y celulosa (Passos & Coimbra, 2013).

Según la Organización Internacional de Café (ICO) a finales del 2016 hubo una producción aproximada de 9 millones de toneladas de granos a nivel mundial, el cual es poco aprovechado. Es por esto que en los últimos años la creciente toma de conciencia de la necesidad de reducción de residuos y protección al medio

ambiente ha estimulado la búsqueda de posibles métodos de utilización de estos materiales (Zuorro & Lavecchia, 2012).

El calentamiento óhmico es una nueva alternativa tecnológica para el procesamiento de los alimentos a nivel industrial, además de otras aplicaciones como destilación de agua, tratamiento de residuos, procesamiento químico, etc. (Sakr & Liu, 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que el calentamiento óhmico favorece la extracción de aceites esenciales, disminuyendo considerablemente el tiempo de extracción, el uso de solventes y consumo de energía (Nair *et al.*, 2012). En nuestro grupo de trabajo se ha informado que el calentamiento óhmico concentra la fibra dietaria del café usado, permitiendo obtener un potencial ingrediente alimentario alto en fibra insoluble. Por lo anterior este trabajo se enfoca en la caracterización química y estructural del mismo, así como en la extracción mediante calentamiento óhmico semi-sólido.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del café

El café se define como la semilla seca de la planta del café sin distinción entre café molido o café tostado. El árbol donde proviene el café se denomina cafeto y es originario de África (Etiopía). A principios del siglo XVII el café pudo ser cultivado en la India Oriental gracias a las condiciones climáticas y a la fertilidad de las tierras. Para el siglo XVIII la planta se propagó a Europa y América. Con la revolución industrial y la alta tasa de crecimiento poblacional en el siglo XX se convirtió en una bebida universal ya extendida en muchos países del continente americano. La planta de café llegó a México hace aproximadamente 200 años y a nivel mundial pertenece a uno de los primeros lugares como productor de café (Martini *et al.*, 2016; Temis-Pérez *et al.*, 2011).

Industrialmente el café ha venido en aumento, siendo el producto agrícola más importante del mundo, ocupando el segundo lugar como producto comercial solo después del petróleo (Zuorro & Lavecchia, 2012).

En 2009 Brasil produjo cerca de 40 millones de costales de café (60kg) y en el 2007 el consumo estimado a nivel mundial fue de 124,636 millones de costales, representando un incremento del 2.8% con respecto al año anterior y a pesar de la crisis financiera del 2008 las personas no dejaron de tomar café, sino que simplemente compraron una calidad de café media. Además de Brasil se pueden encontrar Colombia, Guatemala y México como algunos de los países del continente americano productores de café (ICO, 2017). Actualmente el producto se exporta a más de 90 países, con una gran variedad de presentaciones a nivel comercial gracias a la amplia gama de granos y a producción de mezclas disponibles (Bedoya-Ramírez, Cilla, Contreras-Calderón, & Alegría-Torán, 2017).

En la Tabla 1 se muestra la composición química del grano del café (*Coffea arabica* L.)

Tabla 1. Composición química del grano de café (*Coffea arabica* L.)

Componente	Cantidad (g/100g)
Proteína	16.5
Grasas	15.9
Ceniza	6.2
Carbohidratos	58.5
Fibra total	48.6
<i>Soluble</i>	2.1
<i>Insoluble</i>	46.5
Almidón resistente	4.8

(López-Barrera *et al.*, 2016).

La composición química del grano de café comprende 16.5 % de proteína, 15.9% de grasa, 6.2% de cenizas y 58.5% de carbohidratos, de los cuales el 48.6% corresponde a fibra total. Esta última comprende fibra soluble e insoluble con 2.1 y 46.5 %, respectivamente. Finalmente para almidón resistente presenta un valor del 4.8 % (López-Barrera, Vázquez-Sánchez, Loarca-Piña, & Campos-Vega, 2016).

El café tostado está compuesto básicamente de azúcares, hemicelulosa, fibra, proteínas, algunos ácidos no volátiles como lo son el cafético, clorogénico, cítrico, málico, oxálico, quínico y tartárico; contiene también, lípidos y cenizas (potasio, fosforo y magnesio). Las melanoidinas son un componente macromolecular con contenido de nitrógeno que está presente en el grano de café y diversas investigaciones demuestran su capacidad antioxidante, antibacteriana y quelante (Temis-Pérez *et al.*, 2011).

Además, contiene otros compuestos bioactivos incluyendo cafeína, fenoles, trigonelina, diterpenos y fibra soluble. La ingesta de cafeína se ha asociado con un alto número de efectos biológicos, principalmente en relación con la estimulación del sistema nervioso central, típicamente asociada a una sensación de alerta después del consumo de café. Por otro lado, se ha informado también que la ingesta de cafeína ejerce efectos ergogénicos. Entre los compuestos fenólicos, los ácidos clorogénicos (CGA) son los más abundantes en el café, representando más del 98% de su contenido fenólico total, como se muestra en la Figura 1, mientras que el 2% restante está compuesto por alquilmtoxifenoles, alquifenoles, metoxifenoles y otros fenólicos tales como pirogalol, catecol y fenol (Martini *et al.*, 2016).

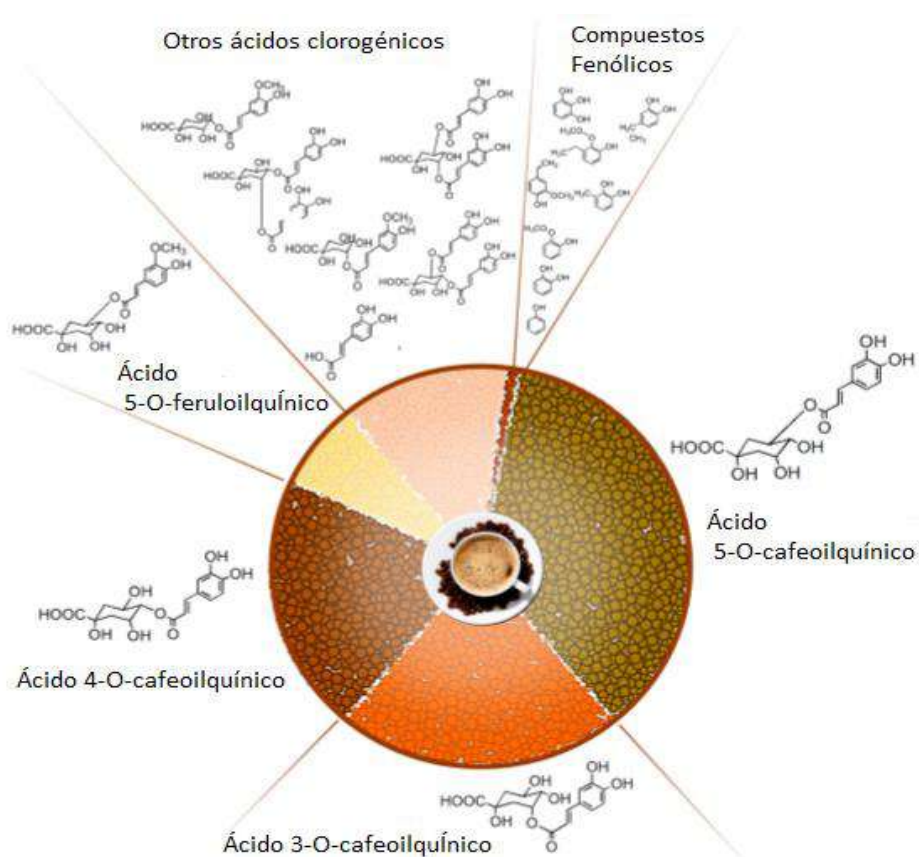


Figura 1. Compuestos fenólicos presentes en café (Martini *et al.*, 2016).

El café representa una de las principales fuentes de antioxidantes en la dieta, cerca del 64% de la ingesta total diaria. Se conoce que otros alimentos contienen

más antioxidantes que el café, sin embargo, la frecuencia y cantidades consumidas definen a la bebida como una de las principales fuentes de antioxidantes. Esta capacidad antioxidante está directamente relacionada con el proceso de tostado. Además el café es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo después del agua y del té. Se han descrito ingredientes de la bebida de café como antioxidantes, compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los ácidos hidroxicinámicos (ácidos clorogénico, caféico, cumárico y ferúlico), melanoidinas, productos de la reacción de Maillard, cafeína y otros compuestos volátiles (Bedoya-Ramírez *et al.*, 2017).

2.2 Tostado del grano del café

Los cambios físicos que se dan en el tueste son la forma, color, volumen, masa, humedad y densidad del grano. Durante el tostado tanto el dióxido de carbono como el vapor de agua van a generar una alta presión la cual cambia la forma de las células; incrementándose el volumen y las paredes celulares se hacen más delgadas (Díaz, 2014).

El proceso de tostado es un punto crítico en la preparación del grano de café para la maduración del aroma, sabor y color tradicionales del café. Los ácidos clorogénicos también son afectados por este proceso ya que cerca del 90% del 5-ácido cafeliquínico (compuesto más abundante) se pierde en comparación con el grano verde. Además al someter al grano a una infusión se pierden otras cantidades de CGA, a pesar de eso se ha demostrado que puede existir una sobre extracción de ácidos dependiendo de la preparación de la bebida y puede incrementar el total del contenido de los CGA (Martini *et al.*, 2016).

La calidad de una taza de café y sus propiedades sensoriales dependen de muchos factores, sobre todo en la cadena de producción, los cuales son: origen geográfico, clima, especies métodos de cosecha, procesamiento tecnológico

(principalmente tostado y molido), condiciones de almacenamiento y finalmente la infusión (Bressanello *et al.*, 2017).

La actividad antioxidante del café es fuertemente afectada por el proceso de tostado, las altas temperaturas provocan la pérdida de los antioxidantes naturales presentes en el café, principalmente los ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, la capacidad antioxidante del café se puede preservar gracias a la formación de nuevos compuestos durante el tostado que también poseen propiedades antioxidantes. Los granos de café verde son ricos en compuestos fenólicos y polisacáridos, y el bajo contenido de agua y altas temperaturas que caracterizan el tostado favorecen la generación de reacciones de Maillard y sus productos entre proteínas y carbohidratos (Bedoya-Ramírez *et al.*, 2017).

2.2.1 Reacciones de Maillard y compuestos involucrados en el tueste del café

La reacción de Maillard (MR) es la reacción de pardeamiento no enzimático que puede ocurrir en los alimentos cuando se someten a altas temperaturas. Los productos de reacción de Maillard (MRP), también conocidos como productos finales de glicación avanzada (AGEs), son un grupo heterogéneo y complejo de compuestos con muchas actividades diferentes. Desde el punto de vista tecnológico, la industria alimentaria se ha interesado desde hace tiempo en esta reacción, ya que sus productos pueden aportar color, olor y sabor deseables a los alimentos. Datos recientes sugieren que los MRP derivan aromas. Los efectos *in vivo* de los AGEs han atraído la atención de muchos investigadores por su participación en el desarrollo de trastornos degenerativos, como enfermedades cardiovasculares, neuronales, complicaciones con diabetes o enfermedades de cartílago y hueso. Del mismo modo en el café estas reacciones que se presentan durante el tueste da como resultado la formación de sustancias tóxicas como 5-hidroxfurfural (HMF), furfural (F) y acrilamida. EL HMF en altas concentraciones es citotóxico (Bedoya-Ramírez *et al.*, 2017; Delgado-Andrade, 2014).

La reacción de Maillard se ha dividido en etapas: inicial, avanzada y final. En la etapa inicial se forman compuestos de Amadori (1-amino-1-desoxi-cetosis) por la condensación de un carbonilo, proveniente de un azúcar reductor, y de un grupo amino de una proteína o aminoácido; los compuestos de Amadori son degradados a productos avanzados, es entonces cuando comienza la etapa avanzada, dando lugar a estos compuestos son incoloros o pueden ser amarillos además de ser altamente insaturados y sensibles a polimerización. En el transcurso de esta etapa avanzada se forman compuestos α -dicarbonilo reactivos como 1,3 y 4-desoxicelulosa, también se producen AGEs y pre-melanoidinas. La etapa final comprende productos como melanoidinas color pardo de alto y bajo peso molecular, formados gracias a la condensación de compuestos amino y fragmentos de azúcar (Taş & Gökmen., 2017; Poulsen *et al.*, 2013).

2.3 Subproductos de la industria del café

La biomasa es renovable, abundante, barata y no compite con la producción de alimentos. Los residuos industriales de procesamiento de alimentos son una fuente de biomasa que puede ser transformada en energía, biocombustibles y productos químicos. La biomasa a partir de desechos de alimentos típicamente consiste de 50-75% de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa, los principales polímeros biodegradables), 5-25% de lignina, y cantidades modestas de otras sustancias, incluyendo compuestos fenólicos, lípidos y compuestos ácidos que pueden ser transformados en productos de mayor valor agregado. Por esta razón, la biomasa es una fuente ideal para obtener azúcares simples (monómeros de cadena corta), que se utilizan como sustratos de fermentación para la producción de etanol, y compuestos fenólicos que poseen propiedades antioxidantes de valor en productos con aplicación en farmacéutica y alimentos (Mayanga-torres *et al.*, 2017).

En la industria del café entre el 5 y 10 % de la biomasa generada se aprovecha para la elaboración de la bebida, el resto son residuos en materiales lignocelulósicos (hojas, ramas y tallos), generados en el proceso de renovación de los cafetales. El procesamiento para obtener al grano de café consiste en eliminar las cascavas, tales como pericarpio, pulpa, mucílago y pergamino. Es posible quitar también la piel plateada del café, si se prefiere con una pulidora que daría un valor agregado al café. Además una vez preparada la bebida quedan residuos no solubles en agua que representan del 45–50 % del café que se necesita para la extracción del café soluble. Estos subproductos representan más del 50% del fruto del café y son descartados para el procesamiento y su comercialización. Se han encontrado algunos usos para estos subproductos en la industria energética pero es muy poco usado para intereses en la industria de los alimentos (Campos-Vega *et al.*, 2015; Esquivel & Jiménez, 2012).

Debido a la gran presión política y social para reducir la contaminación generada por las actividades industriales la mayoría de los países desarrollados y subdesarrollados han tratado de modificar sus procesos para que sus residuos puedan ser reciclados o aprovechados de alguna otra manera, es por esto que ahora ya no se le llaman residuos ya que serán materia prima para otros procesos (Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, 2011).

Existen varias propuestas como alternativa para el reuso del grano de CU; una de ellas es la producción de biodiesel que promete tener capacidades potenciales de cerca de 200 millones de litros a nivel laboratorio (Kondamudi, Mohapatra, & Misra, 2008). Se menciona el uso de este tipo de residuos como sustrato de algunos hongos del género *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Neurospora* para su desintoxicación biológica y su posterior eliminación al medio ambiente. También como sustrato de otros microorganismos para producción de otros productos como etanol o tratamientos de aguas residuales. Algunos otros autores mencionan la gran capacidad antioxidante del café usado y podría ser considerado como un nuevo ingrediente funcional potencial. Además existe la posibilidad de

aplicar el café usado como alimento para rumiantes, cerdos, pollos y conejos por su alto contenido de lignina (Mussatto *et al.*, 2011).

2.4 Café usado

2.4.1 Generalidades y características

Este subproducto representa cerca del 50% de la cereza del café, y es recuperado posterior a la preparación de la bebida. El CU tiene una concentración alta en cuanto a fibra dietética total, con un valor alrededor del 60% y una alta capacidad antioxidante, probablemente debido a los compuestos fenólicos del grano, así como de otros compuestos que se han generado por las reacciones de Maillard (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Los carbohidratos del CU representan el 60% en contenido (Tabla 2) representados en su mayoría por polisacáridos, que son azúcares polimerizados en estructuras de celulosa y hemicelulosa. La mayoría de estos polisacáridos permanecen como material insoluble unido a la matriz de CU. Contiene además manosa, galactosa, glucosa y arabinosa. Existen algunos estudios y aplicaciones que distinguen a los monoligosacáridos (MOS), derivados de manosa, que demostraron promover el crecimiento de bifidobacterias, además de una ingesta continua de estos MOS puede disminuir los niveles de grasa en el área abdominal y subcutánea, inclusive inhibir la absorción intestinal de grasa provocando una disminución en el almacenamiento del tejido adiposo. Se ha utilizado este potencial de los MOS para ser incluido en alimentos como ingrediente prebiótico activo y aprobado como ingrediente alimentario funcional de oligosacárido de Alimentos para Usos Especificados (FOSHU) (Campos-Vega, *et al.*, 2015).

El CU tiene un contenido proteico importante (15.8 %) los valores reportados pueden variar debido a otros compuestos nitrogenados como cafeína, trigonelina, aminas libres y aminoácidos. Se han identificado leucina, valina, fenilalanina e isoleucina como los aminoácidos esenciales mayoritariamente presentes en el CU.

Estos comprenden casi la mitad (49%) del total de aminoácidos del CU principalmente leucina. En comparación con la pulpa de café la mayoría del contenido de aminoácidos es más alto en el CU. La proteína de CU es también una excelente fuente de arginina, glutamina e histidina, los tres aminoácidos que se sabe que tienen fuertes efectos sobre las funciones inmunes del cuerpo. El alto contenido de cisteína y metionina de algunas proteínas del CU puede aumentar los niveles de antioxidantes del cuerpo, potencialmente estabilizar el ADN durante la división celular y reducir el riesgo de ciertas formas de cáncer de colon (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Tabla 2. Composición química del grano de café (*Coffea arabica* L.) usado

Componente	Cantidad (g/100g)
Proteína	15.8
Grasas	15.1
Ceniza	1.8
Carbohidratos	60.3
Fibra total	21.2
<i>Soluble</i>	1.6
<i>Insoluble</i>	55.5
Almidón resistente	5.6

(López-Barrera *et al.*, 2016).

Con respecto a los diterpenos, el café contiene cafestol y kahweol, que se han encontrado en mayor cantidad (hasta 1.2 g / 100 g de materia seca) en semillas

de *C. arabica*. Al ser poco solubles en agua, estos compuestos pueden ser atrapados por filtros, por lo que están presentes principalmente en café no filtrado. A pesar de las propiedades anticancerígenas y hepatoprotectoras que han sido reportadas en modelos *in vitro* y animales, un alto consumo de cafestol y kahweol parece aumentar el riesgo de CHD (enfermedad cardíaca coronaria), principalmente a través de un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) plasmáticas (Martini *et al.*, 2016).

2.5 Compuestos de interés nutracéutico

2.5.1 Fibra dietética

Se consideran fibras dietéticas a los polisacáridos vegetales, lignina, almidón resistente, inulina, oligosacáridos, que son resistentes a las enzimas digestivas del intestino delgado del ser humano y que pueden ser fermentadas de manera parcial o completa por el intestino grueso o el colón. La fibra dietética, soluble o insoluble, es importante para la nutrición humana. Promueven efectos benéficos fisiológicos como tipo laxantes naturales y atenúan los niveles de colesterol y glucosa en sangre (Álvarez, E & González Sánchez, 2006). La capacidad de la fibra dietética hace absorberse en el colón por las bacterias de la flora intestinal y a su vez protegen contra el cáncer de colón (Rathinavelu & Graziosi, 2005).

El contenido de fibra dietética en el CU es representativo en cuanto a carbohidratos. La fibra dietaria del CU es hemicelulosa, celulosa y lignina. El aislamiento de fibra dietética a partir de subproductos vegetales puede ir acompañado de la recuperación de otros constituyentes como antioxidantes o proteínas. Además, las fibras de CU demuestran propiedades antioxidantes similares a antioxidantes de alimentos conocidos como los vinos tintos y melocotones. Por lo tanto la fibra dietética del CU puede clasificarse como antioxidante, útil como suplemento dietético potencial (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Es importante destacar que cada tipo de fibra (insoluble y soluble) tiene propiedades específicas. Por ejemplo, la fibra dietaria soluble posee una gran retención de agua, promueve la creación de flora bacteriana y disminuye la absorción de grasa y azúcares. Por otra parte, la fibra dietaria insoluble tiene baja retención de agua, aceleran el movimiento de los alimentos a través del sistema digestivo y promueven la regularidad en la excreción fecal. El CU es un material con alto nivel en fibra dietaria insoluble, por lo tanto, tiene un gran potencial para ser utilizado como materia prima en el desarrollo de alimentos funcionales (Ballesteros *et al.*, 2014).

2.5.2 Compuestos antioxidantes

Los granos de CU tienen potencial antioxidante debido a los diversos componentes que puede llegar a albergar como lo pueden ser los compuestos fenólicos que no sólo sirve como antioxidante, sino que se ha reportado como antiviral, antiinflamatorio e incluso anticancerígeno. Se tienen reportes de polifenoles totales, otros ácidos como el ácido clorogénico o ácidos cafeoilquinicos en mayor cantidad (Campos-Vega *et al.*, 2015; Esquivel & Jiménez, 2012) .

El CU contiene propiedades funcionales interesantes incluyendo la capacidad de retención de agua, la capacidad de retención de aceite, la actividad y estabilidad de la emulsión y el potencial antioxidante, lo que abre posibilidades para su reutilización en diferentes procesos biotecnológicos. Pueden utilizarse, por ejemplo, como conservantes en formulaciones alimenticias y farmacéuticos, o como materia prima para obtener nuevos ingredientes funcionales para la industria alimentaria (Ballesteros *et al.*, 2014).

El interés por los productos naturales derivados de plantas ha crecido, principalmente porque los antioxidantes sintéticos sufren varios inconvenientes. El CU contiene varios compuestos relacionados con la salud humana, tales como compuestos fenólicos con actividad antioxidante, anti-bacteriana, antiviral, antiinflamatoria y anti-carcinógena demostrada. La recuperación de compuestos

fenólicos de los subproductos de la industria del café y su actividad antioxidante ha sido investigada en los últimos años. Los compuestos fenólicos que se han encontrado en el CU son polifenoles totales como ácido clorogénico, ácido gálico, caféico, elágico, *p*-cumárico, ferúlico, catequina, rutina y quercetina (Tabla 3) (Campos-Vega *et al.*, 2015; López-barrera, *et al.*, 2016).

Tabla 3. Polifenoles totales en el café (*Coffea arabica* L.) usado.

Polifenoles	Cantidad (mg/g)
Ácido gálico	2.5
Ácido clorogénico	5.6
Catequina	0.6
Ácido caféico	0.07
Rutina	0.06
Ácido elágico	0.1
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.01
Ácido ferúlico	0.004
Quercetina	
Polifenoles totales	9.9

(López-Barrera *et al.*, 2016).

2.6 Métodos de extracción de fibra dietética

La elección del método de extracción para aislar fibras depende en gran medida de la composición de la fibra en particular, su complejidad, naturaleza química, grado de polimerización y presencia de oligosacáridos. La base de todos

los métodos de extracción de fibra es similar; sin embargo, el enfoque difiere dependiendo del producto final deseado, la aplicación prevista, la fuente de fibra y el equipo utilizado. Todos los métodos implican el fraccionamiento; esto permite la eliminación de componentes no deseados. La fibra se puede extraer en su conjunto, denominada fibra total, o como fibra soluble o insoluble o como sus componentes individuales. Algunos métodos previamente investigados para extraer fibra de fuentes vegetales incluyen procesamiento en seco, procesamiento en húmedo, químico, gravimétrico, enzimático, físico, microbiano o una combinación de estos métodos. La extracción de fibra dietética está muy relacionada con los métodos analíticos de la misma (Maphosa & Jideani, 2015).

2.6.1 Procesamiento seco

Este tipo de proceso se ha aplicado con fines experimentales e industriales. El método implica la desintegración de las semillas mediante molienda y “clasificación aérea” en fracciones de almidón y proteína. La molienda crea harina que contiene dos poblaciones distintas de partícula que son distintas en tamaño y densidad. Para separar estas dos fases, se utiliza una corriente de aire, por eso la denominación “clasificación aérea”. Una fase consiste en partículas finas y más ligeras que contienen principalmente almidones y fibras mientras que la otra fase es gruesa y relativamente más pesada que contiene principalmente proteínas y lípidos. Las ventajas de los métodos de procesado en seco incluyen la reducción del consumo de energía y agua. La clasificación aérea es más eficiente cuando se usa en cultivos que tienen almidón como su principal material de almacenamiento, como los frijoles (Maphosa & Jideani, 2015).

2.6.2 Procesamiento húmedo

Los métodos de molienda húmeda utilizan agua para la extracción de fibras, pero difieren en los reactivos y condiciones adicionales. En esta sección abarcan los métodos de molienda húmeda convencional, molienda húmeda alcalina,

procesamiento enzimático en húmedo y el método de molienda húmeda modificada (Maphosa & Jideani, 2015).

La molienda húmeda convencional, se utilizan semillas descascaradas, debido a los componentes antinutricionales de la cascara que se liberan durante la extracción. Las semillas descascaradas se trituran a harina y se tratan con un agente de descomposición, usualmente una solución alcalina para extraer proteínas. La proteína se separa entonces mediante precipitación ácida o ultrafiltración. La fibra obtenida contiene aproximadamente 4 - 8% de proteínas y 0.5 – 1.5 % de lípidos. Este proceso implica el remojo de las materias primas en una solución de ácido sulfúrico. Los productos y el almidón obtenido se separan físicamente. Además de consumir mucho tiempo y energía, este proceso también es poco amigable con el medio ambiente debido a las grandes cantidades de dióxido de azufre requeridas durante la etapa de remojo. Este proceso dura hasta 36 horas (Maphosa & Jideani, 2015).

La molienda en húmedo alcalino implica sumergir el material en NaOH (pH 13) a 85°C. El material empapado se desrama, se agrieta y se impregna en NaOH a 45 °C, luego se tritura para formar un polvo. El polvo se mezcla a continuación con NaOH y la suspensión recuperada se separa, se tamiza de tamices, recuperando el residuo en fibra fina (Maphosa & Jideani, 2015).

Para ayudar a frenar los problemas asociados del ácido sulfúrico, se desarrolló la molienda enzimática en húmedo como una alternativa. En este proceso, el ácido sulfúrico se reduce a niveles mínimos teniendo únicamente propiedades antimicrobianas. El tiempo de este proceso se reduce y, por lo tanto, ahorra energía. Se utilizan proteasas como alcalasas, que solubilizan e hidrolizan la matriz de gluten (proteína), α amilasa, que gelatiniza, hidrólisis y despolimeriza al almidón y la amilogucosidasa, que desintegra los fragmentos de almidón en glucosa. Los polisacáridos de almidón no modificado se recuperan por precipitación con etanol, después se lavan y se secan. La fibra se separa y se recupera

eliminando el almidón y las proteínas pasando sobre un tamiz (Maphosa & Jideani, 2015).

El método de molienda húmeda modificada implica el uso de agua y produce productos de alta pureza que pueden utilizarse para una amplia gama de aplicaciones, incluida la investigación científica. El primer paso consiste en moler las semillas a partículas muy pequeñas para aumentar el área superficial. La proteína se extrae luego a un pH alcalino seguido de precipitación ácida. El hidróxido de sodio se emplea comúnmente para proporcionar el pH alcalino y HCl para el pH ácido. Para aislar la fibra insoluble, se utilizan diferencias en las propiedades de hinchamiento de las fracciones. A temperatura ambiente, la fibra tiene una alta capacidad de hinchamiento mientras que el hinchamiento del almidón es muy restringido. Tales diferencias en la capacidad de hinchamiento dan lugar a diferentes tamaños. La fracción insoluble se dispersa en una gran cantidad de agua y se tamiza a través de una serie de diámetros de poro comprendidos entre 30 y 300 μm . El sobrenadante es principalmente una dispersión de gránulos de almidón y el residuo es principalmente fibra. Este método utiliza mucho menos agua que el método tradicional de molienda húmeda y además sólo requiere el uso de productos químicos (HCl y NaOH) para ajustes de pH en la precipitación de proteínas (Maphosa & Jideani, 2015).

2.6.3 Procesos físicos y microbiológicos

Los métodos físicos de extracción de fibra preservan su estructura y evitan daños significativos a la cadena del polímero. Como resultado, las fibras extraídas tienden a tener una alta capacidad de intercambio catiónico. No se han hecho muchas investigaciones sobre estos métodos. Los métodos microbianos implican la fermentación de la fibra utilizando microorganismos y enzimas. A menudo se usan enzimas de alta pureza para eliminar selectivamente oligosacáridos y polisacáridos tales como galactanos, fructanos, mananos y arabinanos. Algunas de las ventajas del aislamiento microbiano son que la estructura de las fibras permanece sin

distorsión y no se pierden hemicelulosas de manera significativa y fibras solubles. Por otro lado, se sospecha que la fermentación microbiana produce sustancias tóxicas, por lo que las fibras extraídas son inadecuadas para su uso en aplicaciones alimentarias (Maphosa & Jideani, 2015).

2.6.4 Métodos gravimétricos

En cuanto a métodos gravimétricos se encuentran los enzimáticos y no enzimáticos. Los métodos gravimétricos no enzimáticos son uno de los primeros métodos desarrollados para la extracción de fibras. Los métodos incluyen la descomposición química hidrolítica u oxidativa dejando atrás la fibra cruda. Estos métodos se pueden dividir en dos categorías. La primera categoría incluye extracciones de detergente ácido y detergente neutro. El procedimiento ácido-detergente aísla la fibra total como la suma de celulosa, lignina y hemicelulosas insolubles en ácido; como resultado, la mayoría de los componentes de fibra se pierden. El procedimiento de detergente neutro aísla la celulosa, la lignina y las hemicelulosas insolubles en detergente neutro. Sin embargo, no es adecuado para plantas con alto contenido de fibra soluble (Maphosa & Jideani, 2015).

El método enzimático-gravimétrico hace uso de la eliminación enzimática de almidón y proteínas seguido por la precipitación del concentrado de fibra soluble usando etanol. El método gravimétrico comienza con el uso de álcalis y ácidos para determinar la fibra total en la muestra. El método también implica la eliminación de la grasa si está presente por encima del 10%. Además, el procedimiento ha evolucionado para hacer uso de tampón de ácido 4-morfolino-etanosulfónico-TRIS (MES-TRIS) en lugar del tampón fosfato original, ahorrando así tiempo y energía asociados con los ajustes continuos del pH. Un método actualizado de este tipo consiste en suspender muestras en tampón de acetato a pH 5, luego digerir con α -amilasa, termoresistente, a temperaturas entre 95 - 100°C durante 30 minutos a 1 hora para digerir el almidón. Las muestras se incuban adicionalmente a 60 °C con proteasa seguido de digestión con amiloglucosidasa a 60 °C para hidrolizar

fragmentos de almidón a glucosa. Las fibras solubles se precipitan entonces con etanol y la fibra total se recupera por centrifugación con etanol y acetona y se deja secar a temperatura ambiente. También puede usarse alcalasa como enzima degradadora de proteína, pepsina y pcreatina para la digestión de proteína y almidón que imitan las enzimas digestivas alimentarias (Maphosa & Jideani, 2015).

2.6.5 Métodos químico-enzimáticos

El método enzimático implica una digestión enzimática de fracciones no fibrosas acopladas con la eliminación química de las fracciones. Específicamente, el método implica la eliminación enzimática de almidón y el uso de etanol para aislar el concentrado de fibra soluble a partir de productos de hidrólisis de almidón y azúcares de bajo peso molecular. El etanol se emplea comúnmente en estos métodos para precipitar componentes de fibra solubilizados como en los métodos gravimétricos enzimáticos. La eliminación de todo el almidón presente en la muestra se consigue mediante el uso de dimetilsulfóxido. El paso inicial implica la digestión usando H_2SO_4 seguido por una filtración agua y NaOH. Las muestras se lavan luego con H_2SO_4 y etanol y se secan en un horno de mufla. El método de extracción de fibra con alcohol involucra la muestra hirviendo en agua durante 3 horas y la extracción usando etanol al 95%, seguido de agitación durante la noche y filtración a través de una bolsa de nylon usando una prensa hidráulica. La fibra se recupera después por secado al aire del residuo durante 6 horas. La fibra puede ser sometida a digestión alcalina, estirada a través de una gasa y secada al horno durante la noche. Se recomienda reducir la concentración de etanol que se utiliza en la precipitación de fibra soluble del 76% a entre el 41% y el 56% para reducir el costo y también reducir la contaminación química ambiental (Maphosa & Jideani, 2015).

2.7 Calentamiento óhmico (OHM)

El calentamiento óhmico (OHM) se define como un proceso en el que la corriente eléctrica pasa a través de un material con el propósito principal de

calentarlo. En OHM no hay necesidad de transferir calor a través de interfaces sólido-líquido. La energía se disipa directamente en los alimentos. Existe un gran número de aplicaciones reales y potenciales para OHM, incluyendo blanqueo, evaporación, deshidratación, fermentación, extracción, esterilización, pasteurización y calentamiento de alimentos. Además calentar el material, las investigaciones sugieren que el campo eléctrico aplicado por OHM provoca la electroporación de las membranas celulares (Knirsch, Alves dos Santos, Martins de Oliveira Soares Vicente, & Vessoni Penna, 2010).

El sistema OHM puede ser visto como una tecnología de generación de energía térmica interna, y no sólo como una transferencia de energía calórica, lo que significa que no depende de la transferencia de calor a través de una interfaz de líquido sólido o dentro de un sólido en un sistema de dos fases. El procesamiento óhmico permite calentar materiales a velocidades extremadamente rápidas (en general, de unos segundos a unos minutos). También permite que, en determinadas circunstancias, las partículas grandes y los fluidos portadores se calienten a velocidades comparables, permitiendo de este modo utilizar técnicas de Tiempo Corto de Alta Temperatura (HTST) y Ultra Alta Temperatura (UHT) sobre sólidos o materiales suspendidos, aumentando la calidad del producto final y agregando valor a los productos (Knirsch *et al.*, 2010).

En un material no homogéneo, la conductividad eléctrica de las partículas y su relación con la conductividad del fluido son un parámetro crítico para la comprensión de la velocidad de calentamiento de las partículas. La conductividad eléctrica depende de la temperatura, el gradiente de voltaje aplicado, la frecuencia y la concentración de electrolitos. La velocidad de calentamiento de las partículas en un fluido depende de las conductividades relativas de las fases del sistema y del volumen relativo de esas fases. Las partículas sólidas de baja conductividad y en pequeñas concentraciones en comparación con la del fluido retrasan su calentamiento. Sin embargo, en condiciones en las que la concentración de las partículas es alta, esas mismas partículas de baja conductividad pueden calentarse

más rápidamente que el fluido circundante. Este fenómeno se produce porque, con el aumento de la concentración de las partículas, la trayectoria de la corriente eléctrica a través del fluido se vuelve más tortuosa, forzando un mayor porcentaje de la corriente a fluir a través de las partículas. Esto puede resultar en mayores tasas de generación de energía dentro de las partículas y consecuentemente en una mayor velocidad de calentamiento relativa de las partículas (Darvishi, Khostaghaza, & Gholamhassan, 2013; Knirsch *et al.*, 2010; Sakr & Liu, 2014).

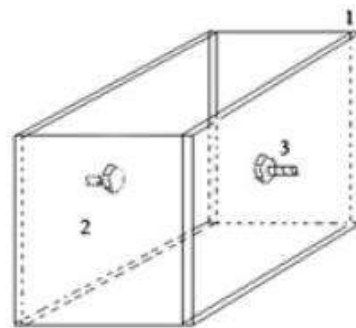
Además del calentamiento, los datos de la investigación sugieren fuertemente que el campo eléctrico aplicado por OHM provoca la electroporación de las membranas celulares en procesos fermentativos. La electroporación celular se define como la formación de poros en las membranas celulares debido a la presencia de un campo eléctrico y como consecuencia, se mejora la permeabilidad de la membrana y la difusión de material a través de la membrana (electro-osmosis). La electroporación de membrana provoca un transporte de nutrientes más rápido y más eficiente al interior de la célula y posiblemente permite el transporte de metabolitos al interior de la célula (Knirsch *et al.*, 2010).

2.7.1 Calentamiento óhmico por lote (OHML)

La cámara de OHML consiste en una celda rectangular o cuadrado de acrílico y dos electrodos fijados en lados opuestos de la celda. El material a calentar se llena en el depósito entre los electrodos y cuando se aplica voltaje se produce calentamiento (Nair *et al.*, 2012).

La cámara de OHML (Figura 2) no debe ser hecha de materiales eléctricamente corrosivos, debe ser capaz de soportar la temperatura del proceso y no debe afectar a la calidad del producto. Al seleccionar los electrodos se deben tener las siguientes consideraciones: buena calidad, no corrosivo, viable y debe proporcionar un acabado liso. Se puede atornillar los electrodos a la celda para mantener una postura correcta. También se puede acoplar a un termómetro para el control de la temperatura así como un medidor de voltaje y corriente, una barra

magnética no conductora se puede añadir para mantener agitación constante durante el procedimiento (Cho *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2012).



Cámara de OHML

1. Electrodo de acero
2. Celda de acrílico
3. Conectores

Figura 2. Diagrama de cámara del calentamiento óhmico por lote. Modificado de Nair *et al.*, (2012).

2.7.2 Calentamiento óhmico semi-sólido (OHMSS)

El sistema de calentamiento óhmico semi-sólido respeta el mismo principio que el calentamiento óhmico convencional el cual está dado por el paso de corriente eléctrica alterna a través de dos electrodos insertados en el alimento, como se muestra en la Fig. 3. La energía eléctrica conducida a través del alimento se convierte en energía térmica debido a la resistencia eléctrica de la comida (fenómeno conocido como efecto Joule), que conduce a un calentamiento volumétrico e instantáneo. La generación de energía es directamente proporcional al cuadrado del campo eléctrico aplicado y a la conductividad eléctrica de los alimentos (Cappato *et al.*, 2017).

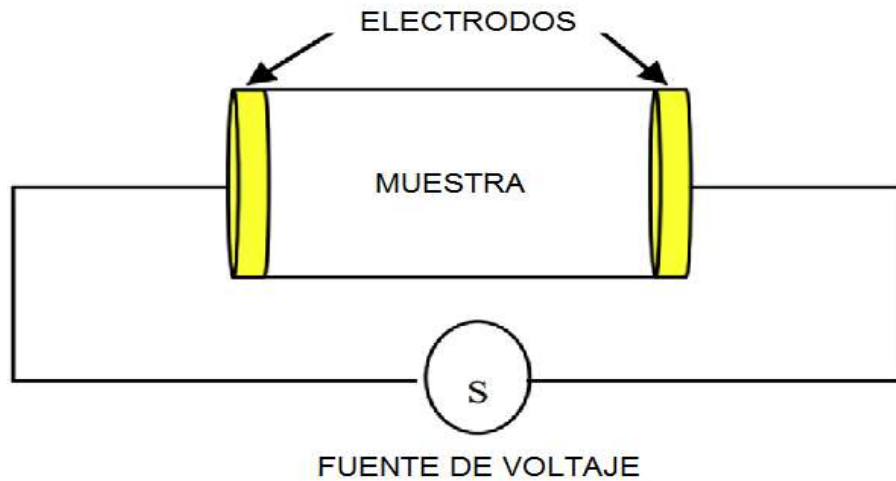


Figura 3. Diagrama de calentamiento óhmico semi-sólido. Modificado de (Sakr & Liu, 2014)

Esta tecnología puede ser aplicada cuando los materiales contienen suficiente agua y electrolitos para permitir el paso de la corriente eléctrica y se puede utilizar para generar calor dentro del producto. El calentamiento ocurre en forma de transformación de energía interna (de eléctrica a térmica) dentro del material. Por lo tanto puede verse como una tecnología interna de generación de energía térmica, y no solo como una transferencia de energía térmica, lo que significa que no depende de la transferencia de calor a través de una interfaz de líquido sólido o dentro de un sólido en un sistema de dos fases (Knirsch *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El café ocupa el segundo puesto en cuanto a producto comercializado, sin embargo, el fruto no es totalmente aprovechado. Genera subproductos que llegan a representar hasta el 90% de la masa total de la cereza. Además, estos subproductos generalmente son desechados ya que tienen limitado valor comercial y son muy poco aprovechados. El café usado representa el 50% de los subproductos de la industria del café. En el 2016 hubo una producción aproximada de 9 millones de toneladas de granos a nivel mundial. Es por esto que en los últimos años la creciente toma de conciencia de la necesidad de reducción de residuos y protección al medio ambiente ha estimulado la búsqueda de posibles métodos de utilización de estos materiales.

El consumo del café está representado por aproximadamente el 40% de la población mundial, preferentemente por la mañana. Además, México ocupa el quinto lugar como productor de café arábica a nivel mundial, siendo los principales estados productores Chiapas, Colima, Oaxaca y Veracruz. La creación de nuevas tecnologías para el uso de los subproductos de la industria de los alimentos es una preocupación para los investigadores ya que se estima que la población mundial crecerá un 35% en los próximos 25 años y la demanda de alimentos crecerá proporcionalmente. Esta preocupación se mantiene vigente ya que se calcula que con la producción actual de alimentos no alcanzará a cubrir dicha demanda.

El interés por los productos naturales derivados de plantas ha crecido, principalmente porque los antioxidantes sintéticos sufren varios inconvenientes. El café usado contiene varios compuestos relacionados con la salud humana, tales como la fibra dietaria antioxidante. En nuestro grupo de trabajo se obtuvo un ingrediente alto en este componente, sin embargo, no se ha caracterizado completamente su composición y, no se ha evaluado el impacto que puede tener sobre esto el obtener usando calentamiento óhmico en lote o semi-sólido

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Extraer y caracterizar la fibra dietaria de café usado mediante calentamiento óhmico en lote y semi-sólido.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener fibra dietaria de café (*Coffea arabica* L.) usado mediante calentamiento óhmico por lote y semi-sólido.
2. Disminuir la cantidad de diterpenos de la fibra de café usado obtenida por calentamiento óhmico por lote.
3. Evaluar nutrimental y nutracéuticamente el café (*Coffea arabica* L.) usado, la fibra dietaria de café usado obtenida mediante calentamiento óhmico por lote, semi-sólido y la reducida en diterpenos.
4. Determinar las propiedades tecnológicas del café (*Coffea arabica* L.) usado, la fibra dietaria de café usado obtenida mediante calentamiento óhmico por lote, semi-sólido y la reducida en diterpenos.
5. Caracterizar microestructuralmente el café (*Coffea arabica* L.) usado, la fibra dietaria de café usado obtenida mediante calentamiento óhmico por lote, semi-sólido y la reducida en diterpenos.
6. Evaluar el efecto del colesterol en el consumo de la fibra dietaria de café usado posterior a su reducción de diterpenos en sujetos sanos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

Se utilizó CU obtenido a partir de granos de café de la variedad arábica con tostado medio (americano) obteniéndolo de una cafetería local después de su percolación de cafetera comercial. El café usado fue secado a 43°C por 24 horas en un horno convencional, se protegió de la luz y se almacenó hasta su uso (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

5.1.2 Reactivos

Los reactivos y solventes que se emplearon en los diferentes ensayos fueron de grado analítico y serán adquiridos de las marcas Sigma-Aldrich, Roche, Merck y J. T. Baker.

5.2 Métodos

5.2.1 Obtención de fibra

5.2.1.1 Pre tratamiento de café usado

Para extraer la fibra del CU se llevó a cabo un tratamiento previo al OHML. Brevemente, el CU seco se tamizó en una malla número 40. 140g de CU seco se sometieron a un calentamiento con 4 L de agua en baño maría a 80°C por 1 h, con agitación continua (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

5.2.1.2 Extracción de fibra por calentamiento óhmico en lote

El CU previamente pre-tratado se colocó en una celda de acrílico y se sometió a calentamiento óhmico por medio de dos electrodos de acero inoxidable conectados a una fuente de voltaje (VARIAC). Se usó un valor de 200 V hasta llegar

a 90°C y se dejó enfriar. El voltaje y corriente fueron monitoreados con un multímetro (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

Se filtró el residuo y se secó a 43°C en un horno de secado durante 24 h. La fibra fue almacenada en refrigeración y protegida de la luz hasta su análisis.

5.2.1.3 Extracción de fibra por calentamiento óhmico semi-sólido

Este paso no lleva un pretratamiento como sucede en el OHML. Brevemente, se somete la muestra del café usado sin secar (humedad aproximada de 67%) a una celda por medio de dos electrodos de acero inoxidable conectados a una fuente de voltaje (VARIAC). Se usaron valores máximos y mínimos; un valor de 60V y 90V hasta llegar a 90 y 105°C y se mantuvo a esa temperatura durante 5 y 10 minutos, respectivamente.

Se secó la muestra resultante a 43°C en un horno de secado durante 24 h. La fibra se almacenó en refrigeración protegida de la luz hasta su análisis.

5.2.1.4 Proceso de extracción de diterpenos en fibra de café usado y diseño de superficie de respuesta

La fibra de café usado obtenida por OHML fue procesada para retirar los diterpenos cafestol y kahweol utilizando dos solventes, aprobados para su uso en alimentos (FDA, 2018), a los cuales se les denominó solvente A y solvente B. Se hizo un diseño de superficie de respuesta (RSD) en donde se varió el volumen del solvente y la concentración del solvente ambas variables para 1 gramo de muestra. Se fijó el tiempo y la temperatura de extracción. Las variables de respuesta fueron la concentración de cafestol y kahweol. Se utilizó el mismo diseño (Tabla 4) para cada solvente.

Se utilizó la fórmula de predicción del diseño para obtener la respuesta teórica mínima deseable de diterpenos y se realizó el mismo proceso de extracción

y cuantificación a esas condiciones para comparar los resultados reales con los teóricos.

Tabla 4. Diseño de superficie de respuesta para disminuir concentración de diterpenos

Prueba	Concentración (%)	Volumen (ml)	Kahweol g/100g	Cafestol g/100g
	Variables codificadas			
1	1	1	.	.
2	-1	1	.	.
3	0	0	.	.
4	1	-1	.	.
5	1.414	0	.	.
6	0	0	.	.
7	-1	-1	.	.
8	0	1.414	.	.
9	0	0	.	.
10	-1.414	0	.	.
11	0	-1.414	.	.
12	0	0	.	.

Se muestran las variables codificadas

Posterior al tratamiento térmico la mezcla fue centrifugada a 5000rpm por 15 minutos. Finalmente se separaron las fracciones líquidas y sólidas. La fracción sólida se secó a 45°C por 24 horas y a la fracción líquida se le retiró la mayor cantidad de solvente para recuperar la fracción lipídica.

5.2.1.4.1 Obtención de aceite de la fibra de café usado y determinación de índice de peróxidos (IP).

Se retiró la totalidad del solvente 2 de la fracción líquida resultante de la sección 5.2.1.2.1.1 con un rotavapor a 40°C. El aceite resultante se conservó a 4°C y se determinó su índice de peróxidos siguiendo la metodología descrita por Rondon *et al.*, (2004). 5 g aceite fueron mezclados con 40 mL de agua y 0.5 de una solución saturada de yoduro de potasio (1g/ml), se dejó reaccionar la mezcla durante 1

minuto y se agregaron 0.5 ml de una solución de almidón al 1% y se tituló de forma gradual con una solución de tiosulfato de sodio 0.001M, hasta que desapareciera el color azul.

Las unidades de medición del índice de peróxidos utilizados son miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite (meqO₂/Kg). Para realizar el cálculo se utiliza la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{1000 (V - V_0) M}{m}$$

Donde:

IP= índice de peróxidos (meqO₂/Kg)

V= volumen de solución de tiosulfato de sodio utilizado para la determinación

V₀= volumen de solución de tiosulfato utilizado en el blanco

M= molaridad de la solución de tiosulfato

m= masa de la muestra

5.2.2 Cuantificación de cafestol y kahweol por HPLC-DAD

Para la extracción y cuantificación de cafestol y kahweol se siguió la metodología descrita por Eloy *et al.*, (2010). Brevemente, 0.2 g de muestra se mezclan con 2 mL de una solución de hidróxido de potasio (2.5 M) en etanol al 96%. Posteriormente se saponificó con un baño a 80°C durante 1 hora. Se dejó enfriar a 25°C y se agregaron 2 mL de agua destilada y se homogenizó con vortex. Se agregaron 2 mL de éter etílico y se homogenizó con vortex. Se centrifugó a 3000 RPM durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante en otro tubo. Se repitió la extracción con éter etílico dos veces más. Los sobrenadantes recuperados de cada muestra se evaporaron en un baño a 70°C por 15 minutos. Al eliminar el solvente de los tubos se reconstituyó con la fase móvil hasta llegar a un volumen de 25 mL.

Finalmente se filtra con un acrodisco de membrana de 0.45 μm y se depositó en un vial para ser inyectado al HPLC bajo las siguientes condiciones. Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) el análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), se utilizó una columna Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies, 4, 6 x 250 mm, 5,0 micras). La temperatura de la columna se controló con ayuda de un termostato a 25 ± 1 °C y la velocidad de flujo se ajustó a 1 ml/min. La fase móvil isocrática constó de dos disolventes grado HPLC agua y acetonitrilo (1:1). La detección se realizó a 290 nm para kahweol y 230 nm para cafestol con una velocidad de adquisición de 1 s. Se inyectó un volumen de 20 μL , las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con los estándares comerciales de: cafestol y kahweol.

5.2.3 Características fisicoquímicas y tecnológicas del CU y de la FCU

5.2.3.1 Medición de pH

El valor de pH del café usado y fibra de café usado fueron determinados por una medición directa en la muestra, empleando las siguientes proporciones (w/w): 1 residuo húmedo: 4 agua destilada o 1 residuo seco: 10 agua destilada (Lario *et al.*, 2004). La determinación fue realizada por triplicado.

5.2.3.2 Capacidad de retención de agua

Para determinar la capacidad de retención de agua en las muestras de café usado y fibra de café usado, se siguió la metodología descrita por Anderson, (1982) con algunas modificaciones.

Se suspendieron 2.5 g de muestra molida y tamizada (malla 40) en 30 ml de agua destilada dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml a peso constante. Se agitó

por 30 minutos dentro de un baño María a 30 °C y cada 5 minutos se mezcló con vortex. Las muestras se centrifugaron a 3000 g por 10 minutos a temperatura de 30 °C. Se decantó el sobrenadante y se dejó drenar los tubos. Posteriormente, se pesó la muestra drenada para calcular el índice de absorción de agua expresado como porcentaje de gel obtenido por gramo de muestra seca (g/g).

El sobrenadante fue colocado en una cápsula de evaporación a peso constante y se eliminó el agua, mediante evaporación en una estufa a 105 °C. Finalmente, se pesó la cápsula de evaporación para calcular el índice de solubilidad de agua (ISA) expresado como porcentaje de sólidos secos por gramo de muestra seca (g/g). La determinación fue realizada por triplicado. Se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$CRA = \frac{\text{Residuo centrifugado (g)}}{\text{Muestra seca (g)} - \text{Residuo evaporado (g)}}$$

$$ISA = \frac{\text{Residuo evaporado (g)}}{\text{Muestra seca (g)}} \times 100$$

5.2.3.3 Capacidad de retención de aceite

La capacidad de absorción de aceite en la muestra de café usado y de la fibra de café usado se determinó empleando la metodología descrita por Beuchat, (1977) con ligeras modificaciones.

Un gramo de muestra deshidratada, molida y tamizada (malla 40) se mezcló con 10 ml de aceite vegetal dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml, a peso constante. La suspensión fue incubada durante 30 minutos en un baño maría a 30 °C y cada 5 minutos se agitó con vortex. Después de centrifugar a 15000 g por 20 minutos, el sobrenadante fue decantado y desechado, las gotas de aceite adherido en el tubo de centrifuga fueron removidas con ayuda de una torunda de algodón. Finalmente, el tubo fue pesado y los resultados se expresaron como gramos de

aceite absorbido por gramo de muestra seca (g/g). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Cálculos:

$$CRAc = \frac{\text{Peso muestra humeda} - \text{Peso muestra seca}}{\text{Peso muestra seca}}$$

5.2.3.4 Capacidad de hinchamiento (CH)

La capacidad de hinchamiento en la muestra de café usado y en la fibra de café usado se determinó empleando la metodología descrita por Vilela *et al.*, (2016).

Para la determinación de CH, 1 g de muestra se hidrató con 70 ml de agua destilada en una probeta graduada a temperatura ambiente. La suspensión se mantuvo en agitación constante de 150 rpm durante dos horas. Posteriormente se dejó reposar por 18 horas y se registró el volumen del lecho. Los cálculos se expresaron como volumen (ml) por masa seca (g) de muestra bajo la siguiente ecuación:

$$CH = \frac{\text{Volumen del lecho de muestra (mL)}}{\text{Peso muestra seca (g)}}$$

Los experimentos fueron realizados por triplicado.

5.2.3.5 Actividad (AE) y estabilidad emulsificante (EE)

La actividad emulsificante (AE) y la estabilidad de emulsión (EE) fueron determinadas por la metodología de Ballesteros *et al.*, (2014). Brevemente, se mezclaron 2 g de muestra con 100 ml de agua destilada y se homogeneizaron con vortex durante 2 minutos. Después, se añadieron 100 ml de aceite de maíz a la muestra y la mezcla se homogeneizó durante 1 minuto. Las muestras se centrifugaron a 1200 g por 5 minutos. Se calculó la AE en porcentaje de la relación entre los volúmenes de la capa emulsionada y el volumen total utilizado:

$$AE = \frac{\text{Volumen de capa de emulsión (mL)}}{\text{Volumen total utilizado (mL)}} \times 100$$

Para determinar EE, las emulsiones preparadas se calentaron a 80°C durante 30 minutos, se enfriaron a 25°C y se centrifugaron a 1200 g por 5 minutos. Se calculó la EE en porcentaje por la relación entre los volúmenes de la capa emulsionada restante y el volumen original de la emulsión:

$$EE = \frac{\text{Volumen de capa de emulsión restante (mL)}}{\text{Volumen original de emulsión (mL)}} \times 100$$

Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2.3.6 Determinación de sacáridos

Esta determinación se realizó siguiendo la metodología de Ballesteros *et al.*, (2017) con algunas modificaciones.

5.2.3.6.1 Autohidrólisis

Los ensayos se realizaron a 160°C, 15 ml de agua (ultra pura) por cada gramo de muestra seca y con un tiempo de extracción de 10 minutos. Brevemente, las muestras se colocarán junto con el agua ultra pura en matraces de vidrio de 50 ml en un horno convencional. Posteriormente al tratamiento los cilindros se enfriaron con hielo durante 10 min. Cada muestra se centrifugó a 2500 g por 20 min. Se recuperó el sobrenadante para el recobro de polisacáridos.

5.2.3.6.2 Recobro de polisacáridos

Para la recuperación de los polisacáridos presentes en la fracción líquida de la centrifugación correspondiente a la autohidrólisis, se mezclaron 30 ml del sobrenadante con etanol absoluto en una relación 1:3 (v/v) y se dejó a 4°C durante una noche. Los polisacáridos precipitados se recuperaron por centrifugación a 2500 g por 20 minutos, se hidrataron con 15 ml de agua destilada y se mantuvieron en

agitación durante 3 horas a 200 rpm y a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó de nuevo, el sobrenadante se recuperó y filtró en acrodiscos de 0.22 μm y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

5.2.3.6.3 Azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó mediante el ensayo de ácido antransulfúrico. Brevemente, se mezcló una alícuota de 50 μl de la muestra descrita en la sección anterior con 150 μl de reactivo de antrona en una microplaca de 96 pocillos. Dejando reaccionar a 4°C por 10 min. Posteriormente se incubó a 100 °C durante 20 min. Después del calentamiento, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 min.

La absorbancia se determinó en un lector de microplacas espectrofotométricas, ajustado a 620 nm y usando agua destilada como blanco. El reactivo de antrona se preparó inmediatamente antes del análisis disolviendo 0.1 g de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%), se protegió de la luz. Se realizó una curva de calibración utilizando una solución de glucosa estándar (10, 60, 120, 200, 250, 300, 400 y 600 g/ml) para calcular el contenido de azúcares totales en las muestras.

5.2.3.6.4 Azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores (RS) se estimó mediante el método colorimétrico DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) adaptado a una microplaca de 96 pocillos. Brevemente, se mezclaron 25 μl de cada muestra descrita en la sección del recobro de polisacáridos con 25 μl de reactivo DNS y se incubaron a 100 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 250 μl de agua destilada a cada pocillo y la microplaca se colocará en un baño de hielo para detener la reacción. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas espectrofotométricas ajustado a 540 nm, usando agua destilada como blanco. El reactivo DNS se preparó

inmediatamente antes del análisis disolviendo 2.5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 25 ml de agua destilada precalentada a 80 °C. La solución se enfrió a temperatura ambiente y después se añadieron 50 ml de una solución de hidróxido de sodio (2N) y 75 g de tartrato de sodio y potasio siendo el volumen final completado a 250 ml con agua destilada. Se preparó una curva de calibración estándar utilizando solución de glucosa (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 y 1.8 mg/ml) para estimar el contenido de RS en miligramos de equivalente de glucosa por g de muestra.

5.2.3.6.5 Caracterización de polisacáridos por HPLC-RI

Los polisacáridos extraídos se sometieron a una hidrólisis ácida diluida con ácido sulfúrico (120 mg H₂SO₄/g material liofilizado) a 120 °C durante 20 min. La solución resultante se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se usó una columna Meta Carb 87P o similar y se controló su temperatura a 80°C. La fase móvil utilizada fue agua ultra pura previamente hervida y sonicada. Se usará un detector de índice de refracción (RI), el flujo será de 0.4 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 µl. Se utilizaron estándares comerciales de glucosa, arabinosa, galactosa y manosa para identificar y cuantificar las muestras.

5.2.4 Análisis proximal

Los análisis proximales se realizaron al café usado, a la fibra obtenida después del tratamiento con calentamiento óhmico y a la tratada para disminuir diterpenos de cada solvente.

5.2.4.1 Determinación de humedad (925.23)

Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula (a peso constante). Las cápsulas se colocaron en una estufa a 130°C por 2 horas, posteriormente se colocaron en un desecador para permitir que las muestras se enfríen durante 40 min. Finalmente,

las muestras se pesaron y se realizó el cálculo correspondiente empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = (\text{peso inicial muestra} - \text{peso final muestra}) * 100$$

La determinación se realizará por triplicado y los resultados se expresarán en porcentaje de base seca / g de muestra (923.25. AOAC; 2002).

5.2.4.2 Determinación de lípidos (920.39)

Los lípidos totales se determinaron por el método 920.39 (extracto etéreo) descrito por la AOAC (2002). En un cartucho de celulosa se colocaron 3 g de muestra, se cubrieron con algodón y se colocaron en el compartimento de extracción de Soxhlet, donde el matraz (a peso constante), contuvo 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo. Se mantuvo la extracción a 10 reflujos / hora durante 5 horas. Posteriormente, se dejó evaporar el solvente, el matraz se secó en estufa con la finalidad de retirar la humedad y residuos de solvente. El matraz se pesó y se calcularon los resultados con la siguiente formula:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{\text{peso final del matraz} - \text{peso inicial del matraz}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

La determinación fue realizada por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

5.2.4.3 Determinación de proteína (920.105)

La proteína total se determinó empleando el método 920.105 (Kjeldhal) descrito por la AOAC (2002). En un tubo de digestión tipo Kjeldhal se colocó 1 g de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio, 0.4 g de sulfato de cobre y se adicionaron 15 ml de ácido sulfúrico. El tubo en el digestor se colocó durante cuatro horas hasta el cambio de color de la muestra a verde claro, se dejó enfriar la muestra y se agregaron 100 ml de agua en cada tubo.

Los tubos se colocaron en el destilador donde se adicionó hidróxido de sodio al 40%. El destilador recibió un matraz EM de 250 ml que contendrá 25 ml de ácido bórico (4 %) y se emplearon como indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol. Se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta que se presente un vire de color de verde a rosa. Finalmente, se determinó el nitrógeno (N) total multiplicado por un factor de conversión equivalente al % de proteína presente en el alimento. Los cálculos que se realizaron fueron los siguientes:

$$\% N = \frac{A * B * C}{D} * 100$$

Dónde: **A** = ml HCl que se usó en la titulación de la muestra; **B** = concentración del ácido clorhídrico a emplear; **C** = meq N₂ 0.014; **D** = peso de la muestra.

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

5.2.4.4 Determinación de cenizas (945.46)

De acuerdo a la metodología (945.46) descrita por la AOAC (2002). Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana, previamente debió ser lavado y llevado a peso constante. La muestra fue calcinada en una mufla a 550 – 560 °C durante 5 horas hasta conseguir cenizas completamente blancas. Los crisoles se colocaron en un desecador hasta que se llegó a temperatura ambiente para poder pesarlos. Los cálculos correspondientes se obtuvieron empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{peso del residuo de cenizas}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

5.2.4.5 Determinación de carbohidratos

El cálculo del contenido de carbohidratos de la muestra, fue realizado por diferencia de peso, con respecto al porcentaje de las determinaciones anteriores (proteína, lípidos, cenizas y humedad).

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

5.2.4.5.1 Determinación de fibra total

La fibra total fue determinada como la suma de las fracciones obtenidas de fibra insoluble y fibra soluble, a continuación, se detallan los procedimientos a seguir para cada una.

5.2.4.5.2 Determinación de fibra insoluble

La metodología a seguir fue la establecida por Shiga *et al.*, (2003). Se pulverizó y desgrasó la muestra, se adicionaron 50 ml de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100 μ L de una solución de α -amilasa. El matraz con el que se trabajó fue cubierto con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, se incubó en baño a 95 °C por 30 min, con agitación continua. Cuando llegó a temperatura ambiente, la muestra se ajustó el pH a un valor de 7.5. Se adicionaron 100 μ L de proteasa (5 mg/ml) y se incubó en baño a 60°C por 30 min con agitación continua.

Al finalizar la incubación, se permitió que la muestra se enfríe a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.0. Posteriormente se adicionaron 300 μ L de amiloglucosidasa y se incubó durante 30 min a 60°C con agitación continua.

Después de incubar se filtró con papel Whatman No. 4 a peso constante, y se realizó 2 lavados con 15 ml de agua destilada a 60°C, el filtrado obtenido después de los lavados se recuperó y almacenó para la determinación de fibra soluble, como se describe más adelante. Por otro lado, el papel filtro junto con la muestra fue secado

en estufa a 60°C por 24 h, hasta peso constante, finalmente se pesó. La fibra insoluble es lo que se obtuvo en el filtro. La determinación fue realizada por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

5.2.4.5.3 Determinación de fibra soluble

De la prueba anterior, se debió conservar el residuo del filtrado, a éste se le se adicionó un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó precipitar por 24 h. El precipitado fue filtrado en papel Whatman No. 42 a peso constante, se realizaron 2 lavados con 15 ml de etanol al 80 % y 2 con 15 ml de acetona. Se dejó secar el papel filtro por 24 h a 60°C, hasta peso constante. Finalmente se pesó el papel filtro, siendo el contenido la fibra soluble. La determinación fue realizada por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca / g de muestra.

5.2.5 Análisis nutracéutico

5.2.5.1 Extracto etanólico

La obtención del extracto etanólico se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Campos-Vega *et al.*, (2015) usando un horno de microondas convencional. Un gramo de muestra fue suspendido en 9 ml de etanol (20 %), posteriormente se sometió a un calentamiento en el horno de microondas, en dos ocasiones, durante 20 s con un poder del 80 % (1200 W). Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue usado para las siguientes pruebas.

5.2.5.2 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó basándose en la metodología de Singleton y Rossi (1965). Se mezclaron 40 µL del extracto etanólico con 460 µL de agua. Se les añadió el reactivo Folin-Ciocalteu (1:10), y la reacción de oxidación se neutralizó con Carbonato de Sodio (7%), se mantuvo en reposo durante 2 h en

un frasco protegido de la luz. Se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (UV-visible).

Mediante los resultados obtenidos y una curva de calibración de ácido clorogénico se calcularon los fenoles totales en las muestras expresados como mg equivalentes de ácido clorogénico/g de muestra.

5.2.5.3 Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD

Esta determinación se realizó a partir del extracto etanólico descrito anteriormente. Los extractos se filtraron a través de un acrodisco de 0.45 μm para jeringa e inyectados en el HPLC bajo las siguientes condiciones. Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) el análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5.0 micras). La temperatura de la columna se controló con ayuda de un termostato a 35 ± 0.6 °C y la velocidad de flujo se ajustó a 1 ml/min. La fase móvil consta de dos disolventes. El disolvente A fue agua grado HPLC y fue ajustada con ácido acético al 0.1 % y el disolvente B fue acetonitrilo 100 %. Se empleó un gradiente lineal como se describe a continuación: una concentración del disolvente A del 80 – 83 % durante 7 min, de 83 – 60 % durante 5 min, de 60 – 50 % durante 1 min y finalmente 50 – 85 % durante 2 min. La detección se realizó a 280 nm con una velocidad de adquisición de 1 s. Se inyectó un volumen de 20 μL , las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con los estándares comerciales de: (+)-catequina, rutina, quercetina y los ácidos clorogénico, caféico, p-cumárico, ferúlico, gálico, ascórbico (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014).

5.2.5.4 Identificación de compuestos fenólicos por UPLC-MS/MS

Los compuestos fenólicos individuales presentes en los extractos se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Amaya-Cruz *et al.*, (2017) con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó un equipo UPLC Acquity Clase I de bomba binaria y con un detector de arreglo de diodos de la marca Waters. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 micras) utilizando agua/ácido fórmico 0.1% (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B) como fases móviles, con una velocidad de flujo de 0.4 ml/min. El volumen de inyección fue de 2 μ l y se utilizó un gradiente lineal como se describe a continuación: una concentración inicial del solvente A del 95% durante 2 minutos, 5% durante 20 minutos, y finalmente de 95% durante 5-10 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C y se monitoreo a 260, 280, 320, 360 y 520 nm.

El equipo UPLC a su vez estaba acoplado a un espectrómetro de masas Vion IMS QToF de la marca Waters. Los datos se adquirieron en modo de ionización negativo para ácidos fenólicos y positivo para la identificación de cafeína, con un rango de masas de 50-1800 Da. Se utilizó una energía de capilar de 3.5 KV, una energía baja de colisión igual a 5 eV y una rampa de alta energía que iba de los 15 eV a los 45 eV. Como estándar de calibración de masa se utilizó leucina-encefalina con una infusión de 10 ml/min y una masa de 556.6766 m/z. La temperatura de la fuente fue de 120°C usando un flujo de gas (Ar) de 800 l/h.

La identidad de los compuestos se estableció en comparación con los tiempos de retención de los estándares comerciales disponibles y el patrón de fragmentación de masas. La identificación de compuestos fenólicos se realizó con ayuda del sistema de información científica UNIFI y el software Progenesis QI de Waters. Se tuvieron como referencia 12 estándares: ácido elágico, gálico, ferúlico, vanílico, clorogénico, cafeico, p-cumárico, protocatecuico, sinápico, rosmarínico, rutina y cafeína.

Las muestras fueron realizadas por triplicado.

5.2.5.5 Capacidad antioxidante

5.2.5.5.1 ABTS

Se utilizó la técnica de Nenadis *et al.*, (2004), para la aplicación del método de ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), y de esa manera determinar la capacidad antioxidante. Primeramente, se mezclaron 5 ml de una solución acuosa de ABTS 7mM y 88 µL de una solución de persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ 140 mM, conservándose en un lugar oscuro durante 12 hrs, para la generación del radical. Terminado el tiempo, a 500 µL de la solución se les agregó de 20-25 ml de etanol. La absorbancia debió de estar entre 0.7 y 1 a 734 nm.

El extracto metanólico (20 µL) se adicionó a una microplaca de 96 pozos, así como metanol (blanco). Se les agregó 0.23 ml de solución ABTS, y se leyó al tiempo 0 y 6min a 734 nm en un lector ELISA. NOTA: las placas se mantuvieron cubiertas (evitando contacto con la luz) y a una temperatura de 27°C.

El porcentaje de inhibición se calculará con la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{(100|1 - A_{muestra})}{A_{control}}$$

Donde,

% inhibición es la actividad antioxidante de la muestra

$A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra a 734 nm

$A_{control}$ es la absorbancia del control a 734 nm

Se realizó una curva de calibración de trolox y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como µmol equivalentes de trolox/g de muestra.

5.2.5.5.2 Método DPPH

Se siguió el método descrito por Fukumoto y Mazza (2000). Brevemente, se añadieron 0.02 ml de extracto metanólico y 0.2 ml de solución de DPPH (150 µM) en una placa de 96 pozos. La paca se leyó a 0, 10, 30, 60, 90 y 120 min a 520 nm en un espectrofotómetro. NOTA: las placas se mantuvieron cubiertas y en la obscuridad a temperatura ambiente.

La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de inhibición de DPPH, usando la siguiente ecuación (Burda y Oleszek, 2001):

$$ARA = \left(100 \left| \frac{1 - A_{muestra}}{A_{control}} \right. \right)$$

Donde,

$A_{muestra}$ = la absorbancia de la muestra a 520 nm

$A_{control}$ = la absorbancia de control (ausencia de antioxidante)

5.2.6 Caracterización estructural

Para esta determinación se siguió el método descrito por Ballesteros *et al.*, (2014). Se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se aplicó una tensión de aceleración de 2keV con aumentos de 780 y 6800 veces. Las muestras se recubrieron con carbón por pulverización catódica al vacío para mejorar la conductividad de las muestras y, por lo tanto, la calidad de las imágenes SEM.

5.2.7 Estudio clínico piloto

Con la finalidad de determinar si la disminución de diterpenos en la muestra era efectiva para no incrementar los valores de colesterol en plasma de sujetos sanos, se realizó un estudio piloto. Se reclutaron 14 sujetos sanos a los cuales se le midió circunferencia de cintura y cadera, peso corporal, porcentaje de grasa

corporal, porcentaje de musculatura corporal. Además, se midió el nivel de colesterol total en plasma. Estas mediciones se realizaron de manera basal y al finalizar el tratamiento.

Participaron 6 mujeres y 8 hombres, todos adultos de entre 24 a 45 años de edad. Se les informó acerca del estudio para aclarar dudas, aceptaron participar y firmaron una carta de consentimiento informado. Los datos solicitados a los participantes se manejaron como confidenciales. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.2.7.1 Criterios de inclusión y exclusión

Se aceptó la participación voluntaria de sujetos sanos y sin diagnóstico de alguna enfermedad crónica (diabetes, obesidad, enfermedades gastrointestinales, etc.). El contenido de colesterol total basal de cada sujeto no debía sobrepasar los 190mg/dL. Se les pidió que mantuvieran su estilo de vida habitual (dieta y ejercicio) durante las semanas de estudio.

5.2.7.2 Vehículo ingerido y monitoreo de colesterol total

Se elaboró una galleta adicionada con la fibra dietaria de café usado con concentración mínima de diterpenos obtenido de la fórmula de predicción del RSD. El estudio consistió con una semana de toma de muestra de sangre para estimar la cantidad de colesterol total con ayuda de un sistema Accutrend Plus (Roche Diagnostics, Alemania) y aplicación de cuestionarios basales, seguido por un período de 21 días de tratamiento; cada semana se monitoreó la cantidad de colesterol total en plasma. Los voluntarios consumieron 3 galletas al día (45g porción), sin importar la hora del consumo. Durante el estudio, los sujetos consumieron su dieta habitual. En el momento de la inclusión, todos los sujetos fueron informados sobre los productos alimenticios que contienen alto contenido de fibra, pro-y prebióticos.

6. RESULTADOS

6.1 Contenido de carbohidratos del café usado con tratamiento de calentamiento óhmico semi-sólido

Con la finalidad de extraer el mayor contenido de fibra dietaria del café usado se usó la tecnología del calentamiento óhmico, denominado semi-sólido (CU-OHMS) ya que no requiere un exceso de agua. Este exceso no es necesario ya que la humedad a la que el café usado es recolectado es de aproximadamente 67% y es suficiente contenido de agua para mantener el paso de corriente eléctrica a través de la muestra. En la Tabla 5 Se muestran los resultados de fibra dietaria total, soluble e insoluble, además del contenido de carbohidratos. Se utilizaron condiciones mínimas y condiciones máximas a las que el café usado podía ser sometido usando esta tecnología. Las condiciones mínimas fueron ajustando el voltaje (60V), tiempo (5 minutos) y temperatura (90°C), mientras que las condiciones máximas fueron ajustadas a un voltaje de 90 V, tiempo de 10 minutos y temperatura de 105°C. Se compararon las muestras resultantes de cada tratamiento y se compararon junto con el café usado.

Tabla 5. Contenido de carbohidratos y fibra dietaria del café usado tratado con calentamiento óhmico semi-sólido.

Determinación	CU	CU-OHMS-MÍNIMO	CU-OHMS-MÁXIMO
Carbohidratos	67.14 ± 1.19 ^a	68.01 ± 0.13 ^a	68.21 ± 0.27 ^a
Fibra total	54.02 ± 2.51 ^a	57.64 ± 0.22 ^a	57.08 ± 0.42 ^a
Fibra insoluble	51.38 ± 2.05 ^a	53.65 ± 0.44 ^a	54.58 ± 0.43 ^a
Fibra soluble	2.64 ± 0.45 ^a	3.98 ± 0.66 ^a	2.50 ± 0.85 ^a

Los resultados están expresados en % y se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes por renglón representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

Los resultados en todos los parámetros no muestran diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados demuestran que el calentamiento óhmico, sin exceso de agua y con estas condiciones, no es el causante de concentrar la fibra dietaria de manera importante a nivel estadístico. Debido a esto de ahora en

adelante se presentarán los resultados del CU-OHMS que corresponden a las condiciones máximas a las que se usó esta tecnología. Además, es por esto que se decidió bajar el contenido de diterpenos para la muestra resultante del café usado con pretratamiento y usando la tecnología del calentamiento óhmico en lote (FCU-OHML) ya que se ha demostrado por Vázquez-Sánchez *et al.*, (2018) que usando este procedimiento sí se concentra el contenido de fibra dietaria.

6.2 Contenido de diterpenos analizado por HPLC-DAD

Se cuantificó el contenido de diterpenos en el café usado (CU), café usado después del pretratamiento (P-CU), fibra dietaria de café usado obtenida por calentamiento óhmico en lote (FCU-OHML) y semi-sólido (CU-OHMS) (Tabla 6).

Tabla 6. Contenido de diterpenos en el café usado y posterior a los tratamientos

Diterpenos	CU	P-CU	FCU-OHML	CU-OHMS
Cafestol	5.61 ± 0.00 ^b	6.42 ± 0.01 ^a	6.41 ± 0.01 ^a	6.06 ± 0.20 ^{ab}
Kahwerol	6.26 ± 0.06 ^c	7.06 ± 0.13 ^a	6.93 ± 0.04 ^{ab}	6.59 ± 0.16 ^{bc}

Los resultados están expresados en mg/g y se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes por renglón representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

El contenido de cafestol y kahweol en el café usado (sin ningún tratamiento previo) fue de 5.61 y 6.26 mg/g de muestra, respectivamente. Después de realizar el pretratamiento hubo un aumento de ambos diterpenos (~1 mg/g). Mientras que, posterior al tratamiento óhmico por lote no hubo diferencias significativas con respecto al pretratamiento. Por su parte el café usado con el tratamiento óhmico en semi-sólido no muestra diferencias significativas con ninguna muestra en el contenido de diterpenos. El aumento de diterpenos cuando el café usado es sometido al pretratamiento puede deberse al uso de cantidades elevadas de agua, donde pueden estar migrando algunos compuestos a fines a esta tal como fibra soluble o azúcares, provocando la concentración de algunos componentes en el material tratado (Wennberg *et al.*, 2006; Larrauri, 1999). Rendón *et al.* (2017)

informaron que los diterpenos están presentes en la fracción lipídica y reportan valores similares (cafestol 7.7 mg/g y kahweol 5.1 mg/g) a los encontrados en este estudio para CU; esto explicaría que la interacción de estas moléculas con el agua es débil. En todos los tratamientos, los diterpenos y los lípidos no interactúan con el agua por lo que no se pueden arrastrar en la fracción soluble.

Un metaanálisis, que incluyó 11 estudios mostró un aumento de 5.0 mg / dL y 0.9 mg / dL en el colesterol sérico total con cada 10 mg de cafestol y kahweol consumidos por día durante cuatro semanas, respectivamente, con un efecto lineal de hasta 100 mg de cafestol / día. Este estudio presenta datos en donde la concentración a la que no se tiene un aumento del colesterol total es de 1-1.5 mg/g de ambos diterpenos (Urgert *et al.*, 1997). Por lo que es importante disminuir la concentración de estos diterpenos a los valores de consumo seguros (1-1.5 mg/g).

6.3 Diseño de superficie de respuesta para disminuir el contenido de diterpenos en fibra dietaria de café usado.

Los resultados del DSR (Tabla 7) muestran una disminución en el contenido de ambos diterpenos en la fibra dietaria de café usado (OHML). En la prueba número 8 con el solvente B se tiene el menor contenido de diterpenos con 2.01 y 2.26 mg/g de cafestol y kahweol, respectivamente. Sin embargo, este valor estuvo por encima de lo requerido (1-1.5 mg/g) para cafestol y kahweol. Para llegar a este valor se utilizó la fórmula de predicción de cada modelo, alimentando las variables y así obtener el valor teórico deseado (Tabla 8).

La fórmula de predicción del solvente B permitió obtener una cantidad de 1.49 y 1.38 mg/g de cafestol y kahweol, respectivamente, que se encuentran dentro de los valores mínimos requeridos para obtener un material seguro, respecto a su efecto de colesterol en plasma, para el consumo humano, de acuerdo con la literatura. Los resultados demuestran que el solvente B es más eficiente para permitir la reducción de diterpenos y también permitió la obtención de aceite de fibra

de CU con un rendimiento del 9.7%. No fue posible obtener aceite con el solvente A. Por lo que se sugiere utilizar el solvente B para extraer los diterpenos y por ende el aceite de la fibra de CU. Además, cabe la posibilidad de utilizar un diseño de optimización para minimizar la concentración de diterpenos aún más y por lo tanto un mejor rendimiento de aceite. Phimsen *et al.*, (2016) realizaron una extracción de aceite del CU utilizando hexano como solvente y lograron obtener un rendimiento del 13% aunque su proceso de extracción es más agresivo que el utilizado en este estudio. Somnuk *et al.*, (2017) lograron obtener aceite de CU utilizando distintos solventes y tuvieron el mejor rendimiento (14.6 %) con hexano, su proceso de extracción está automatizado con un prototipo a escala elaborado con acero inoxidable, bomba de recirculación para los solventes y acoplado a un tanque de destilación para recuperar el solvente utilizado. No se tiene hasta nuestro conocimiento algún estudio que reporte el contenido de diterpenos (cafestol y kahweol) en CU o fibra de CU posterior a la extracción de aceite.

Tabla 7. Contenido de diterpenos del DSR para los solventes utilizados

*Puntos centrales del diseño de superficie de respuesta.

Prueba	Volumen	Concentración	Solvente A		Solvente B	
	(ml)	(%)	Cafestol	Kahweol	Cafestol	Kahweol
Variables codificadas						
1	1	1	3.85	4.46	2.84	3.09
2	-1	1	4.00	4.28	5.84	5.97
3*	0	0	4.60	5.34	6.57	6.22
4	1	-1	3.18	5.37	5.80	5.87
5	1.414	0	3.69	4.50	5.42	5.64
6*	0	0	4.65	5.27	6.12	6.44
7	-1	-1	5.45	5.73	6.20	6.36
8*	0	1.414	3.85	4.45	2.01	2.26
9*	0	0	4.66	5.54	6.28	6.01
10	-1.414	0	4.47	5.19	6.60	6.60
11	0	-1.414	5.71	6.18	5.65	5.59
12	0	0	4.69	5.54	5.84	5.71

Tabla 8. Resultados predictivos (fórmula de predicción del DSR), y obtenidos para el contenido de diterpenos de la fibra dietaria de café usado.

Prueba	Solvente A				Solvente B			
	Predictivo		Real		Predictivo		Real	
	Cafestol	Kahweol	Cafestol	Kahweol	Cafestol	Kahweol	Cafestol	Kahweol
1	1.08	0.00	2.90 ± 0.02	3.63 ± 0.02	1.77	2.08	1.49 ± 0.01	1.38 ± 0.05
2	0.00	0.50	1.86 ± 0.02	2.07 ± 0.02	0.75	1.26	1.66 ± 0.11	1.56 ± 0.01
3	1.60	0.80	2.57 ± 0.02	3.02 ± 0.02	0.00	0.50	1.76 ± 0.09	1.68 ± 0.06

Los resultados de cafestol y kahweol reales están expresados en mg/g de muestra. Se presentan las medias ± la desviación estándar de tres réplicas.

6.4 Índice de peróxidos del aceite de la fibra de café usado

Con la finalidad de conocer la calidad del aceite de fibra de CU obtenido se realizó un índice de peróxidos para estimar el nivel de oxidación de este material. Los resultados demuestran que el aceite obtenido a partir de la fibra de café usado presenta 4.80 meqO₂/kg de muestra, mientras que los aceites comerciales nuevo y usado presentan 1.87 y 55.33 meqO₂/kg respectivamente (Tabla 9). Esta determinación indica la cantidad de oxidación del aceite repercutiendo directamente con la calidad del mismo. El estado oxidativo de los aceites se determina usando el valor de peróxido. Si el valor de peróxido es superior a 9 meqO₂/kg de aceite, indica la corrupción oxidativa en el aceite (Amri *et al.*, 2017). En este caso el aceite comercial usado El Girasol ya se encuentra en condiciones de oxidación mientras que el aceite comercial Capullo y el aceite de la fibra de café usado no presentan condiciones oxidativas. La oxidación afecta significativamente a los aceites al aumentar la liberación de ácidos grasos y la ruptura de dobles enlaces. Este último, además de la polimerización y la liberación de compuestos de alto peso molecular, aumenta la viscosidad de los aceites al tiempo que mantiene su comportamiento newtoniano. La oxidación puede ser capaz de modificar las propiedades fisicoquímicas de los aceites (Jalkh, *et al.*, 2017). Hasta hoy no se tiene conocimiento del índice de peróxidos de café usado o fibra de café usado en la literatura.

Somnuk *et al.*, (2017) realizaron una extracción del aceite del café usado utilizando distintos solventes y con un sistema de recirculación a cierto tiempo y temperatura. Obtuvieron rendimientos de entre 14.7 a 7.5 %, mientras que en este trabajo se logró obtener un rendimiento del 9.6 %. Los lípidos del café usado tienen un uso potencial para aplicaciones cosméticas, ya que presentan propiedades fisicoquímicas interesantes. Las formulaciones de protectores solares en forma de emulsiones de agua en aceite pueden ser una aplicación adecuada para estos subproductos porque proporcionan un factor de protección solar (FPS) más alto para la misma concentración activa de protección solar de las emulsiones de aceite en agua (Martó *et al.*, 2016).

Tabla 9. Índice de peróxidos del aceite de café usado, aceite vegetal comercial nuevo y aceite vegetal comercial usado.

Muestra	Índice de peróxidos
Aceite de fibra de café usado	4.80 ± 0.20 ^a
Aceite de cocina nuevo (Capullo)	1.87 ± 0.12 ^b
<u>Aceite usado (El Girasol)</u>	<u>55.33 ± 5.00 ^c</u>

Los resultados del índice de peróxidos de los aceites están expresados en meqO₂/Kg de muestra y se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY (α=0.05).

6.5 Propiedades y características físico-químicas y tecnológicas

En la Tabla 10 se pueden observar los resultados de las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas en donde el café usado tiene un pH menor al de las demás muestras siendo significativamente diferente al del P-CU y CU-OHML. La determinación de pH puede dar una impresión rápida de las cantidades totales de ácido en las muestras a pesar de estar más asociado con el grado de ionización de la solución, en lugar de con la acidez percibida, como sería la acidez total (Cruz *et al.*, 2012). Por lo que se sugiere que esta disminución del pH se debe a que algunos de los ácidos fenólicos presentes en la muestra del café usado migran al agua

utilizada haciendo más eficiente este fenómeno gracias a las altas temperaturas del proceso (Cesari *et al.*, 2017).

Con respecto a la CRA el CU y la muestra CU-OHML-SA muestran la menor capacidad de retención de agua con 3.67 y 3.53 g / g, siendo estadísticamente diferente de las demás muestras. Después del pretratamiento y del calentamiento óhmico semi-sólido el café usado tiene una tendencia a aumentar su CRA siendo significativamente diferente. La CRA representa la cantidad de agua que permanece unida a la fibra hidratada después de la aplicación de una fuerza externa (presión o centrifugación), y se ve afectada por el tamaño de partícula, la porosidad, la hidrofobicidad y la temperatura de medición. Los valores de CRA son bajos, pero similares a los de otros materiales, incluido el bagazo de granada y la cascara de soja. La CRA también está relacionado con el contenido de fibra soluble, los niveles bajos de fibra dietaria soluble suelen asociarse a valores bajos de CRA (Vilela *et al.*, 2016). La fracción insoluble también contribuye a la CRA ya que el agua se une mediante tensión superficial con los poros de la fibra o mediante la formación de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y uniones iónicas, además la fracción insoluble también se relaciona con el aumento en la absorción de aceite (Thebaudin, *et al.*, 1997). El CU tratado con calentamiento óhmico aumentó su CRA. Esta tecnología ya ha demostrado promover una mayor retención de agua y mejoran las propiedades texturales en tortillas de maíz (Gaytán-Martínez, 2011). La CRA da información útil para determinar en qué cantidades se debe hidratar el material con la finalidad de mejorar las características de los alimentos ya que evita la sinéresis y ayuda a modificar su viscosidad y textura, así como para que brinde los efectos fisiológicos benéficos que se le atribuyen (Elleuch *et al.*, 2011).

Dado que existen moléculas presentes en el café usado que migran al agua durante el pretratamiento el ISA baja y es significativamente menor al de las demás muestras. Por su parte la muestra tratada para reducir diterpenos con calentamiento óhmico en lote usando el solvente B (CU-OHML-SB) disminuye su ISA hasta un 62.4 %, con respecto al CU, debido a que la mayor parte de las moléculas que

interaccionan con el agua ya han migrado lo que deja a esta muestra con in ISA de 1.9 %. El ISA de la muestra tratada para reducir diterpenos de fibra de café usado obtenida con calentamiento óhmico en lote usando el solvente A (CU-OHML-SA) es significativamente mayor con un valor de 62.3 % y no se debe a la naturaleza de la muestra en sí. Este efecto está explicado por el solvente que queda retenido en la muestra el cual no fue posible retirar y es altamente soluble. Esta solubilidad se debe a la conformación química en donde están presentes átomos de hidrogeno y oxígeno en el solvente que al interaccionar con el agua forma puentes de hidrogeno solubilizándose en su totalidad (Steiner & Saenger, 1993). Este efecto también explica que la CH de esta muestra sea significativamente baja con un valor de 1.10 ml /g.

La AE del café usado no es significativamente diferente a las demás muestras excepto en el tratamiento CU-OHML-SB con un valor del 55.46%. Esto se puede deber a que como se extrajeron los lípidos de esta muestra tiene mayor capacidad de absorberlos viéndose reflejado en AE, EE y CRAc. La AE es la capacidad que tiene un compuesto para formar una dispersión homogénea de dos líquidos o emulsiones inmiscibles, mientras que la EE es la eficacia de una molécula para mantener una emulsión termodinámicamente estable. Todos los tratamientos presentan valores de EE superiores a otros materiales tales como frijol lima (28.25%) (Betancur-Ancona *et al.*, 2004), harina de semilla de papaya (58%), mazorcas de maíz (80%) y paja de trigo (86.94%) (Kuan *et al.*, 2011). Este comportamiento está directamente relacionado con el tipo de fibra y el porcentaje de fibras solubles e insolubles en la composición del material. Además, la fracción de proteína presente en los residuos juega también un papel importante en el anclaje del resto de fibra a la interfaz de aceite o agua (Kuan & Liong, 2008). Las muestras de café usado junto con los tratamientos aplicados tienen una actividad y estabilidad de la emulsión con un gran potencial para ser utilizados como emulsionantes en diferentes productos alimenticios, incluyendo bebidas, productos lácteos, productos de panadería, confitería o en productos para la nutrición animal, que requieren una larga estabilidad de la emulsión (Ballesteros *et al.*, 2014).

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas y tecnológicas del café usado, café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con calentamiento óhmico en lote y con solvente (A o B).

Muestra	pH	CRA ¹	ISA ²	CRAC ³	CH ⁴	AE ²	EE ²
CU	6.28 ± 0.07 ^b	3.67 ± 0.03 ^b	5.11 ± 0.13 ^b	1.49 ± 0.04 ^b	4.23 ± 0.15 ^c	50.95 ± 0.39 ^b	95.77 ± 0.25 ^b
P-CU	6.53 ± 0.07 ^a	4.12 ± 0.02 ^a	2.13 ± 0.39 ^c	1.68 ± 0.15 ^{abc}	4.58 ± 0.06 ^b	53.01 ± 0.44 ^{ab}	97.40 ± 0.31 ^{ab}
FCU-OHML	6.53 ± 0.03 ^a	4.06 ± 0.10 ^a	2.18 ± 0.46 ^c	1.63 ± 0.09 ^{abc}	4.58 ± 0.08 ^b	52.08 ± 1.63 ^b	97.42 ± 0.68 ^{ab}
CU-OHMS	6.39 ± 0.15 ^{ab}	4.12 ± 0.07 ^a	5.95 ± 0.70 ^b	1.93 ± 0.12 ^a	5.35 ± 0.14 ^a	50.25 ± 0.35 ^b	97.48 ± 0.06 ^{ab}
FCU-OHML-SA	6.42 ± 0.05 ^{ab}	3.53 ± 0.15 ^b	62.33 ± 0.45 ^a	1.36 ± 0.09 ^c	1.10 ± 0.15 ^d	50.71 ± 0.47 ^b	98.19 ± 0.74 ^a
FCU-OHML-SB	6.36 ± 0.01 ^{ab}	4.26 ± 0.00 ^a	1.92 ± 0.02 ^c	1.94 ± 0.13 ^a	5.50 ± 0.07 ^a	55.46 ± 1.06 ^a	89.23 ± 1.21 ^c

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas y están expresados como: ¹ g de agua/g muestra seca; ²%; ³g de aceite/ g de muestra seca; ⁴ml / g. Letras diferentes representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY (α=0.0

6.6 Contenido de sacáridos y azúcares

En este trabajo no fue posible extraer e identificar la presencia de rafinosa, arabinosa, verbascosa, estaquiosa, xilosa, fructosa, glucosa y maltosa en ninguna de las muestras analizadas. Ballesteros et al., (2017) identificó estos azúcares y sacáridos con la misma metodología.

La manosa fue el único oligosacárido que se identificó, presentando un contenido para el CU, P-CU, CU-OHML y CU-OHMS de 0.26, 0.17, 0.21 y 0.38 mg/g, respectivamente (Tabla 11). No se presentan diferencias estadísticamente significativas entre estas, pero se nota que de CU a P-CU hubo una disminución de este azúcar. Posterior al tratamiento con OHML la concentración de manosa aumenta con respecto al P-CU. El tratamiento con CU-OHMS tiene un mayor contenido de manosa con respecto al CU, P-CU y CU-OHML. Únicamente se encontró la sacarosa de los azúcares en las muestras con un valor de 0.02 mg/g para CU. Debido a esto se puede sugerir que durante el calentamiento óhmico se daña la estructura del grano dejando expuestas moléculas tales como los sacáridos y azúcares. Las investigaciones sugieren que el campo eléctrico aplicado por OHM provoca la electroporación y posiblemente electrólisis de las membranas celulares. La electroporación celular se define como la formación de poros en las membranas celulares debido a la presencia de un campo eléctrico. Mientras que la electrólisis descompone dicha membrana dada la corriente eléctrica continua. Como consecuencia de ambos fenómenos, se mejora la permeabilidad de la membrana y la difusión de material a través de esta. Estos fenómenos de membrana provocan un transporte de nutrientes más rápido y más eficiente al interior de la célula y posiblemente permite el transporte de metabolitos al interior de la célula (Jaeger *et al.*, 2016; Knirsch *et al.*, 2010). También se encontró lactosa en la muestra de CU-OHMS, pero se sugiere que se debió a una contaminación proveniente de la cafetería local de donde se recolectó la muestra de CU.

Tabla 11. Contenido de sacáridos y azúcares del café usado, café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con calentamiento óhmico en lote y con solvente (A o B).

Carbohidratos	Muestra	CU	P-CU	FCU-OHML	CU-OHMS	FCU-OHML-SA	FCU-OHML-SB
Sacáridos ¹	Rafinosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Arabinosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Verbascosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Estaquiosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Xilosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Manosa	0.26 ± 0.11 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.38 ± 0.23 ^a	ND	ND
Azúcares ¹	Fructosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Glucosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Sacarosa	0.02 ± 0.01	ND	ND	ND	ND	ND
	Maltosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Lactosa	ND	ND	ND	0.05 ± 0.02	ND	ND
Azúcares totales ²		3.10 ± 0.33 ^a	1.15 ± 0.04 ^e	2.11 ± 0.04 ^{cd}	2.48 ± 0.10 ^{bc}	1.72 ± 0.09 ^d	2.69 ± 0.16 ^{ab}
Azúcares reductores ²		1.25 ± 0.07 ^c	0.95 ± 0.04 ^d	1.17 ± 0.01 ^c	1.93 ± 0.14 ^b	2.70 ± 0.10 ^a	0.72 ± 0.06 ^e

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas y están expresados como: ¹ mg/g muestra seca; ² mg glucosa / g muestra seca. Letras diferentes representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). ND: No detectado.

El contenido de azúcares en los polisacáridos extraídos revela una diferencia estructural entre el porcentaje de azúcares reductores con respecto al porcentaje de azúcares totales en todas las muestras. Esto se debe a que son principalmente polisacáridos de cadenas largas, mientras que los azúcares recuperados en la otra determinación se componen en gran parte de oligosacáridos y / o polisacáridos de cadena corta (Ballesteros *et al.*, 2017)

Se esperaba encontrar manosa, galactosa, arabinosa y azúcares de glucosa en el material. Sin embargo, la eficiencia de la extracción depende de diferentes factores que incluyen la variedad de granos de café y su grado de tueste, relación sólida / líquido, solvente, temperatura y tiempo de extracción, entre otros (Ballesteros *et al.*, 2017).

6.7 Determinación proximal

La Tabla 12 muestra los carbohidratos como el componente principal del CU (67.1%), este dato ya había sido reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015). Se observó un aumento significativo en el contenido de carbohidratos (4%) cuando CU se somete al pretratamiento (P-CU, 69.8%). Además, se observa un aumento en el contenido de fibra dietaria total (11.8%) en ese mismo paso, tal comportamiento es explicado por la fibra dietética insoluble, que cambia de 51.38 a 57.15 % para CU y P-CU, respectivamente. Se observa que la cantidad de fibra total de la muestra CU-OHMS no presenta diferencia estadística significativa con respecto al CU por lo que se sugiere que usar únicamente el calentamiento óhmico (sin exceso de agua) no permite un aumento en la concentración de fibra dietaria total.

Además de la fibra dietaria la proteína también se concentra en la muestra CU-OHML-SB pasando de 12.1 % (CU-OHML) a 14.2 %. El contenido de proteína fue un poco más alto porque el aceite residual en el CU-OHML se eliminó después de su extracción con solvente. Estos resultados fueron similares a los descritos por Berk (1992) donde la concentración de proteína aumentó cuando se eliminaron la mayoría de los componentes solubles no proteicos. Los productos antes y después

de la extracción de aceite se han comercializado como productos nutritivos para la alimentación animal (Bouafou *et al.*, 2011).

Tabla 12. Composición proximal del café usado, café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con los solventes A y B.

Determinación	CU	P-CU	FCU-OHML	CU-OHMS	FCU-OHML-S1	FCU-OHML-S2
Proteínas	13.11 ± 0.13 ^b	12.41 ± 0.06 ^c	12.07 ± 0.44 ^c	13.13 ± 0.17 ^b	4.18 ± 0.01 ^d	14.22 ± 0.01 ^a
Grasa	13.60 ± 1.01 ^a	12.69 ± 0.19 ^{ab}	11.93 ± 0.31 ^b	13.10 ± 0.02 ^{ab}	2.88 ± 0.19 ^c	1.48 ± 0.15 ^d
Carbohidratos	67.14 ± 1.19 ^c	69.82 ± 0.12 ^{cd}	70.70 ± 0.23 ^c	68.21 ± 0.27 ^{de}	84.45 ± 0.14 ^a	77.30 ± 0.11 ^b
Fibra total	54.02 ± 2.51 ^d	60.39 ± 0.14 ^{bc}	62.61 ± 0.36 ^b	57.08 ± 0.42 ^{cd}	27.58 ± 0.25 ^e	79.57 ± 0.47 ^a
Fibra insoluble	51.38 ± 2.05 ^d	57.15 ± 0.35 ^{bc}	59.66 ± 0.18 ^b	54.58 ± 0.43 ^{cd}	23.50 ± 0.29 ^e	74.63 ± 0.34 ^a
Fibra soluble	2.64 ± 0.45 ^b	3.24 ± 0.49 ^{ab}	2.95 ± 0.17 ^b	2.50 ± 0.85 ^b	4.08 ± 0.04 ^{ab}	4.94 ± 0.13 ^a
Cenizas	1.68 ± 0.02 ^a	1.30 ± 0.10 ^b	1.44 ± 0.05 ^{ab}	1.42 ± 0.04 ^{ab}	0.24 ± 0.11 ^c	1.35 ± 0.06 ^b
Humedad	4.48 ± 0.06 ^c	3.78 ± 0.09 ^e	3.86 ± 0.14 ^{de}	4.14 ± 0.07 ^{cd}	8.22 ± 0.00 ^a	5.59 ± 0.09 ^b

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas y están expresados como: % por gramo de muestra seca. Letras diferentes representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). La proteína fue calculada con el factor de 6.25

La pérdida de componentes de bajo peso molecular tales como minerales, vitaminas y azúcares de las células de la planta en el agua puede ocurrir durante el calentamiento del baño SCG, lo que lleva a un aumento relativo en los contenidos de fibra dietética, como lo sugieren Wennberg *et al.*, (2006), explicando estos resultados. Además, eso explica también el aumento estadísticamente significativo de la muestra de CU-OHML-S2 de fibra dietaria total que está representada por la fracción insoluble ya parte importante de los lípidos presentes fueron extraídos. Chantaro *et al.*, (2008) reporta un efecto similar para la fibra dietética de la cáscara de zanahoria después de pasar por un escaldado. Curiosamente, CU-OHMS no tuvo un efecto sobre los carbohidratos o el contenido de fibra dietética.

Con respecto a la humedad se observa que la muestra CU-OHML-SA es la que presenta el mayor valor con 8.2 % y es significativamente mayor con respecto a las demás muestras. Además, esta misma muestra tiene un valor de cenizas (0.24 %) muy por debajo de lo mostrado para las otras muestras. Esto se puede explicar por la naturaleza del solvente A, ya que no fue posible retirarlo de la muestra. Los efectos de la humedad en la muestra se atribuyen a las propiedades del disolvente. Este como tal puede retener partículas de agua que no pueden ser desprendidas fácilmente. Por lo tanto también se ve afectada la cantidad de cenizas ya que al calcinar toda la materia orgánica, desaparece gran parte de este solvente y deja al descubierto la poca cantidad de minerales (Nezarati *et al.*, 2013).

6.8 Determinación de fenoles totales, ácidos fenólicos, cafeína y capacidad antioxidante.

El CU presenta la mayor cantidad de fenoles totales (Tabla 13), seguido de CU-OHMS que presenta una disminución con diferencias significativas. En tercer término, se encuentran las demás muestras de P-CU, CU-OHML y CU-OHML-SB y con la cantidad de fenoles más baja está la muestra tratada con el solvente B CU-OHMLS-SB. El CU en todas las muestras lleva un proceso térmico que se lleva a cabo mediante el calentamiento óhmico para la extracción de la fibra dietaria antioxidante y la posible retención de algunos fenoles en el filtrado después de éste.

Así como el pretratamiento que también calienta agua y el OHMLS también lleva un proceso térmico que pueda afectar la integridad de estos compuestos y por la solubilidad de estos compuestos en aquellos tratamientos que ocupan agua. Los resultados presentados en este trabajo con respecto al CU no concuerdan con lo reportado por Vázquez-Sánchez *et al.*, (2016) y Oseguera-Castro, (2017). Pero sí concuerdan para la muestra de CU-OHML. No se tiene reporte alguno con respecto a la muestra P-CU, CU-OHMS y ni las tratadas con los solventes para disminuir los diterpenos. Las diferencias encontradas con lo encontrado por otros autores se pueden atribuir a distintos factores como al método de extracción utilizado para la obtención de cada la muestra, al origen del café usado y a los procesos de extracción y medición de la técnica utilizada para la determinación (Conde y Mussatto, 2016; Bravo *et al.*, 2012 y Cruz *et al.*, 2012).

Con respecto a los compuestos fenólicos identificados por UPLC-MS/MS fue posible identificar cafeína y los ácidos clorogénico, cafeico, gálico, protocatecuico y ferúlico. El ácido clorogénico es el compuesto mayoritario en todas las muestras siendo para el CU la que tiene el mayor contenido de este compuesto. Posterior a los tratamientos aplicados en el CU se nota una disminución significativa. Estos resultados difieren de lo reportado por Vazquez-Sanchez *et al.*, (2016) para el CU y CU-OHML. Pero concuerda con lo reportado por López-Barrera *et al.*, (2016) para la muestra de CU. Si bien ambos trabajos citados no utilizaron un UPLC-MS/MS sino más bien un HPLC-DAD, el método de extracción y procesamiento de las muestras fue el mismo por lo que la diferencia de ambas instrumentaciones a nivel cromatográfico son la alta especificidad y sensibilidad a de la espectrometría de masas por lo que con esta tecnología pudieran verse trazas de las moléculas buscadas (Bandeira *et al.*, 2013).

La disminución de los compuestos fenólicos y cafeína por los tratamientos térmicos y/o la cantidad de agua utilizada puede ser explicado por lo reportado por Mayanga-Torres *et al.*, (2017) que menciona que, para temperaturas superiores a 25 ° C, la constante dieléctrica del agua disminuye monótonamente en el punto

crítico. Como resultado de la constante dieléctrica reducida, la capacidad de solvatación del agua se aproxima a la de los disolventes orgánicos, lo que aumenta la solubilidad en agua de los compuestos orgánicos como los fenoles. Simultáneamente, el agua se vuelve más agresiva químicamente al aumentar la temperatura. Las condiciones agresivas tienen el efecto de abrir la estructura de biomasa para mejorar el rendimiento de extracción de fenol y las propiedades químicas cada vez más agresivas del agua, posiblemente combinadas con ácidos orgánicos formados por la degradación de carbohidratos, parecen dar como resultado una disminución del rendimiento de compuestos soluble al aumentar la temperatura la degradación del compuesto fenólico se vuelve cada vez más rápido a altas temperaturas.

La capacidad antioxidante determinada por ABTS muestra que el CU tiene la mayor capacidad antioxidante (83.1 mg Eq. Trolox/g) y se tiene una disminución cuando se analiza la muestra CU-OHML, lo que concuerda con lo reportado por Osceguera-Castro, (2017). Pero se recalca que esa pérdida de capacidad antioxidante sucede desde el P-CU (33.4 mg Eq. Trolox/g) la cual puede ser atribuida a los tratamientos térmicos y solubilidad. Las diferencias de resultados con respecto a esta determinación que pueden observarse de otras fuentes para este material pueden deberse a la diferencia de solventes utilizados para la extracción de los antioxidantes de la muestra previo al análisis de la capacidad antioxidante de la muestra. Por su parte los valores obtenidos por la técnica de DPPH no muestran diferencias significativas para en los tratamientos que no incluyeron el uso de los solventes A y B (CU, P-CU, CU-OHML/OHMS) y concuerdan con lo reportado por Osceguera-Castro, (2017).

Tabla 13. Determinación de fenoles totales, ácidos fenólicos por UPLC-MS/MS, cafeína y capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en café usado posterior al pretratamiento, café usado posterior al calentamiento óhmico en lote y semi-sólido y el café usado tratado con los solventes A y B.

Determinación	CU	P-CU	FCU-OHML	CU-OHMS	FCU-OHML-SA	FCU-OHML-SB
Fenoles totales¹	143.26 ± 13.15 ^a	31.63 ± 3.02 ^c	29.156 ± 2.80 ^c	117.75 ± 12.81 ^b	7.133 ± 0.18 ^d	35.53 ± 1.45 ^c
Ác. clorogénico²	8.97 ± 0.11 ^a	2.39 ± 0.03 ^c	3.05 ± 0.12 ^c	4.93 ± 0.06 ^b	0.43 ± 0.01 ^d	3.11 ± 0.04 ^c
Ác. cafeico²	0.19 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^d	0.05 ± 0.00 ^c	0.10 ± 0.00 ^b	0.004 ± 0.00 ^f	0.03 ± 0.00 ^e
Ác. gálico²	0.03 ± 0.00 ^a	0.003 ± 0.00 ^d	0.005 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^b	ND	0.005 ± 0.00 ^e
Ác. protocatecuico²	0.07 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.00 ^c	0.08 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^d	0.006 ± 0.00 ^e	0.04 ± 0.00 ^d
Ác. ferúlico²	0.004 ± 0.00 ^a	0.001 ± 0.00 ^{cd}	0.001 ± 0.00 ^c	0.002 ± 0.00 ^b	ND	0.001 ± 0.00 ^d
Cafeína²	1.00 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.00 ^d	0.26 ± 0.00 ^c	0.43 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.00 ^f	0.01 ± 0.00 ^e
Capacidad Antioxidante						
DPPH³	139.83 ± 14.81 ^a	137.49 ± 5.03 ^a	136.20 ± 6.41 ^a	148.50 ± 4.21 ^a	17.52 ± 1.74 ^c	87.06 ± 4.13 ^b
ABTS³	83.08 ± 7.35 ^a	33.36 ± 1.91 ^c	38.18 ± 8.82 ^c	77.24 ± 12.26 ^{ab}	25.92 ± 0.24 ^c	49.34 ± 4.87 ^{bc}

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas y están expresados en: ¹mg Eq. Ácido gálico/g muestra, ² mg / g, ³μmol Eq. Trolox / g por gramo de muestra seca. Letras diferentes por renglón representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY (α=0.05). ND: no detectado.

Una vez que los lípidos fueron retirados se puede ver que la capacidad antioxidante disminuye de manera significativa en las dos muestras tratadas con ambos solventes, siendo el solvente B el que deja mayor capacidad antioxidante a la muestra comparada con la del solvente A. Es posible que moléculas lipofílicas interfieran en la respuesta de la capacidad antioxidante utilizando esta técnica. La alta capacidad antioxidante del café se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos generados por la reacción de Maillard durante el tostado (López-Barrera *et al.*, 2016; Panusa *et al.*, 2013).

6.9 Caracterización microestructural por microscopía electrónica de barrido

Con la finalidad de conocer la estructura y modificaciones a nivel microscópico de las muestras de CU y todos sus tratamientos se utilizó la microscopía electrónica de barrido para generar imágenes de alta calidad y ver las modificaciones superficiales.

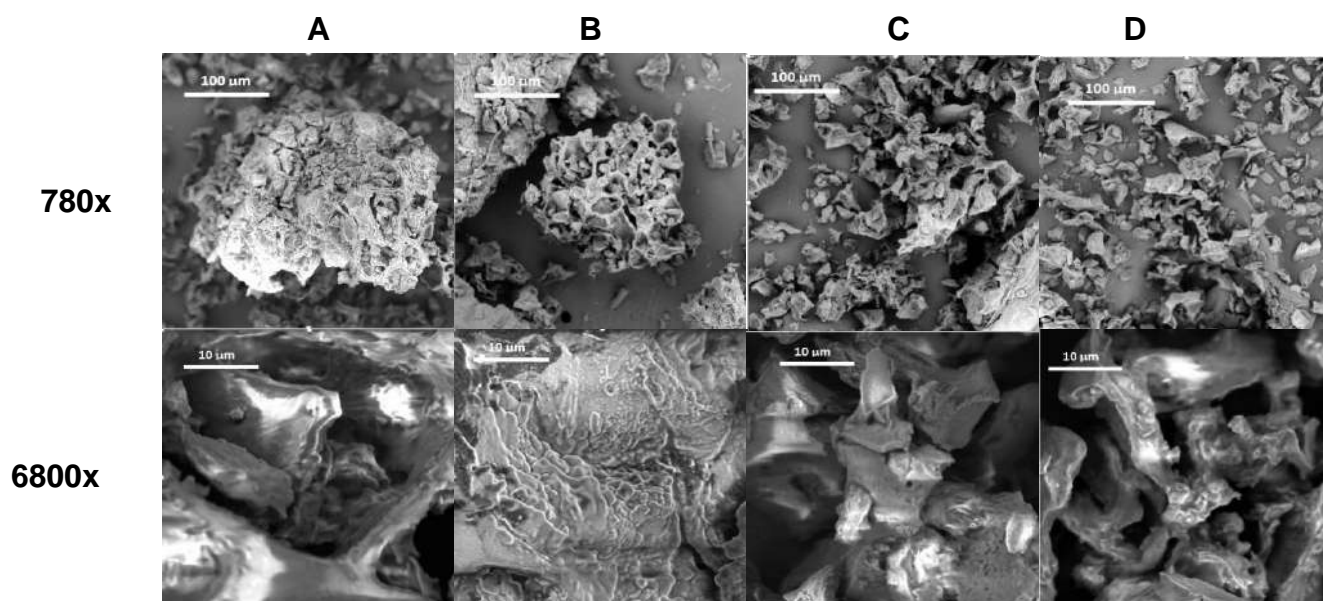


Figura 4. Imágenes Microscopía electrónica de barrido: A) CU, B) P-CU, C) FCU-OHML, D) OHMS. A 700X y 6800X.

Se observa que el CU contiene un grano con poros limitados, P-CU mantiene el mismo tamaño de partícula, pero se observa mayor porosidad, una especie de huecos vacíos. Y los tratamientos con calentamiento óhmico parecen dañar la estructura del grano pudiendo estar ocasionando una electrólisis. La densidad de corriente (dependiendo de la geometría del electrodo), la frecuencia y el material del electrodo (con tendencia específica a oxidarse) son particularmente importantes con respecto a la magnitud de posibles reacciones electroquímicas en los electrodos que conducen a la electrólisis del producto y a la erosión de los electrodos (Jaeger *et al.*, 2016).

Estas modificaciones se relacionan con los resultados de capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, contenido de fibra dietaria y propiedades tecnológicas. Con las micrografías se pueden explicar los fenómenos de transporte de nutrientes solubles que migran al agua y la electroporación junto con la electrólisis. P-CU fue es el tratamiento donde únicamente se usa exceso de agua y sin calentamiento óhmico, la micrografía muestra mayor porosidad del grano, pero el mismo tamaño de partícula (no se rompe) por lo que se relaciona con la migración de nutrientes que dejan expuestos los huecos (poros) una vez separada el agua. Por otra parte, los tratamientos que incluyen calentamiento óhmico (CU-OHML, CU-OHMS) muestran un tamaño de partícula menor por lo que se sugiere que se están rompiendo, independientemente si el tratamiento lleva un exceso de agua o no.

6.10 Estudio piloto

El estudio consistió en la participación de 14 adultos con edad de 29.00 ± 4.28 años. Este grupo de personas consumieron galletas añadidas con 5g (por 45 g de galletas) de fibra dietaria de café usado con calentamiento óhmico tipo lote y tratada con el solvente B que ayudo a reducir los diterpenos (CU-OHML-SB); además esta muestra es la que presentó mayor contenido de fibra dietaria total.

Las variables que se tomaron en cuenta para este estudio fueron el peso (kg), circunferencia de cintura (cm), IMC (kg / cm^3), grasa (kg), musculo (kg) y colesterol total en plasma (mg / dL) (Tabla 14). Gómez-Castrejón., (2017) y Osceguera-Castro., (2017) realizaron un estudio clínico con respecto al consumo de este tipo de fibra dietaria de café usado (CU-OHML), sin retirar los diterpenos. Los resultados revelaron mejorar en los participantes parámetros gastrointestinales, cardiovasculares como una disminución de triglicéridos, aumentó la capacidad antioxidante en plasma, entre otras. También se observó un aumento en el colesterol total. En promedio este aumento no rebasó los valores normales (superior a $200\text{mg} / \text{dL}$). Como ya se mencionó anteriormente Urgert & Katan., (1996) y más recientemente Eloy *et al.*, (2010) han evaluado el efecto del consumo de cafestol y kahweol en humanos y se observó que el consumo de estas moléculas con una dosis de 10 mg diariamente puede aumentar el colesterol total en sangre alrededor de 5.0 y 0.9 mg / dL . Con la muestra de CU-OHML-SB que tiene 1.49 y 1.38 mg/g de cafestol y kahweol respectivamente, se encuentra por debajo de lo reportado para aumentar el colesterol sérico.

Los resultados demuestran que para ninguna de las variables medidas se identifican diferencias estadísticas a pesar de que se ve una disminución en promedio del colesterol total en sangre de los participantes, el cambio no presenta significancia estadística. Con esta evidencia se puede decir que el consumo de esta fibra dietaria antioxidante del café usado baja en diterpenos cafestol y kahweol 1.49 y 1.30 mg/g , respectivamente, contenidos en la fracción lipídica, es segura para consumo humano y no altera el colesterol total en plasma. Cabe señalar que se requieren estudios adicionales para afirmar estos resultados.

Tabla 14. Variables del estudio piloto basales y finales

N= 14			
Variable	Basal	Final	Cambio
Peso (kg)	67.01 ± 9.76 ^a	66.57 ± 9.74 ^a	-0.58 ± 0.87
Circunferencia de cintura (cm)	80.76 ± 6.94 ^a	80.34 ± 6.88 ^a	-0.51 ± 0.79
IMC (kg/cm ²)	23.72 ± 2.75 ^a	23.55 ± 2.71 ^a	-0.25 ± 0.29
% Grasa	27.21 ± 7.14 ^a	26.89 ± 6.87 ^a	-0.98 ± 1.18
Grasa (kg)	18.10 ± 4.87 ^a	17.71 ± 4.43 ^a	-0.79 ± 0.93
% Musculo	31.76 ± 6.27 ^a	31.68 ± 6.10 ^a	-0.82 ± 0.70
Musculo (kg)	21.51 ± 6.25 ^a	21.34 ± 6.22 ^a	-0.59 ± 0.43
Colesterol total (mg/dL)	172.2 ± 14.8 ^a	167.6 ± 15.0 ^a	-6.29 ± 5.01
Edad (años)		29.00 ± 4.28	

ANOVA y Media ± ES.

7. CONCLUSIONES

La caracterización química del CU y de todos los tratamientos a los que fue sometido dieron información importante para poder explicar los fenómenos que se presentaban entre tratamientos cuando se extrae la fibra dietaria antioxidante del café usado mediante OHM. Se desconocía la caracterización del P-CU que demuestra que es el responsable mayoritario de concentrar la fibra y no se pudo concentrar la fibra en OHMS únicamente este tratamiento demuestra que las moléculas presentes en el grano al ser electrolizado son expuestas. Y se confirma que el OHM ya sea en lote o semi-sólido fragmenta la matriz celular del material. Fue posible disminuir la cantidad de diterpenos y aceite del CU-OHML en un 80% con el solvente B. Si bien el solvente A también demostró reducir las moléculas lipofílicas pero la cantidad de fibra dietaria disminuye por lo tanto usar el solvente A no es un método viable para seguir siendo aplicado. El estudio clínico muestra evidencia de que la cantidad de diterpenos resultante en la fibra es segura para consumo humano ya que no aumentó en ninguno de ellos la cantidad de colesterol en plasma. Sin embargo, se sugiere un estudio con mayor cantidad de sujetos para

establecer este dato. Esta información sugiere que el CU-OHML-SB brinda un ingrediente seguro, nutritivo y funcional para su inclusión en la industria de alimentos.

8. REFERENCIAS

- Amaya-Cruz, D. M., Perez-Ramirez, I. F., Ortega-Diaz, D., Rodriguez-Garcia, M. E., & Reynoso-Camacho, R. (2018). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) by-product as functional ingredient: effect of thermal processing and particle size reduction on bioactive constituents and functional, morphological, and structural properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 135-144.
- Amri, Z., Lazreg-Aref, H., Mekni, M., El-Gharbi, S., Dabbaghi, O., Mechri, B., & Hammami, M. (2017). Oil characterization and lipids class composition of pomegranate seeds. *BioMed research international*, 2017.
- Anderson, R. A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. *Cereal Chem*, 59(4), 265-269.
- AOAC. (2002). Official methods of analysis. (Vol. 32). EUA: Washington, EEUU
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493-3503.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Extraction of polysaccharides by autohydrolysis of spent coffee grounds and evaluation of their antioxidant activity. *Carbohydrate polymers*, 157, 258-266.
- Bandeira, R. D. D. C. C., Uekane, T. M., Cunha, C. P. D., Rodrigues, J. M., la Cruz, M. H. C. D., Godoy, R. L. D. O., & Fioravante, A. D. L. (2013). Comparison of High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector and with Tandem Mass Spectrometry methods for detection and quantification of Ochratoxin A in green and roasted coffee beans. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(6), 911-920.
- Bedoya-Ramírez, D., Cilla, A., Contreras-Calderón, J., & Alegría-Torán, A. (2017). Evaluation of the antioxidant capacity, furan compounds and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of commercial Colombian coffee. *Food Chemistry*, 219, 364-372.
- Berk, Z., 1992. Technology of Production of Edible Flours and Protein Products from Soybeans. In: *FAO Agricultural Services Bulletin No. 97b*
- Betancur-Ancona, D., Peraza-Mercado, G., Moguel-Ordonez, Y., & Fuertes-Blanco, S. (2004). Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. *Food Chemistry*, 84(2), 287-295.

- Bouafou, G.M., Konan, A., Zannou-Tchoko, V., Kati-Coulibally, S., 2011. Potential food waste and by-products of coffee in animal feed. *Electron. J. Biol.* 7, 74e80.
- Bressanello, D., Liberto, E., Cordero, C., Rubiolo, P., Pellegrino, G., Ruosi, M. R., & Bicchi, C. (2017). Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC–MS to describe the sensory properties in cup. *Food chemistry*, 214, 218-226.
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Castañeda, H. A., & Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 24-36.
- Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Guimaraes, J. T., Portela, J. B., Costa, A. L. R., Freitas, M. Q., ... & Cruz, A. G. (2017). Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 104-112.
- Cesari, L., Namysl, S., Canabady-Rochelle, L., & Mutelet, F. (2017). Phase equilibria of phenolic compounds in water or ethanol. *Fluid Phase Equilibria*, 453, 58-66.
- Chantaro, P., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2008). Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1987-1994.
- Cho, H. Y., Yousef, A. E., & Sastry, S. K. (1999). Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. *Biotechnology and bioengineering*, 62(3), 368-372.
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., ... & Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(32), 7777-7784.
- Darvishi, H., Khostaghaza, M. H., & Najafi, G. (2013). Ohmic heating of pomegranate juice: Electrical conductivity and pH change. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(2), 101-108.
- Delgado-Andrade, C. (2014). Maillard reaction products: some considerations on their health effects. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 52(1), 53-60.
- Díaz Santacruz, P. A. (2014). Efectos de la altitud sobre la calidad del café torrefactado (coffea arábica l. var. Colombia) producido en los municipios de Buesaco y la Unión–Nariño, pertenecientes al ecotopo e–220 a.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation,

- technological functionality and commercial applications: A review. *Food chemistry*, 124(2), 411-421.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutricion Hospitalaria*, 21. (SUPPL. 2), 61–72.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488-495.
- Food and Drug Administration (FDA). (2018). Code of Federal Regulations. 21 (1), 3. 184, B.
- Guidance for industry: A food labeling guide (14. Appendix F: Calculate the percent daily value for the appropriate nutrients).
- Gaytán-Martínez, M., Figueroa, J. D. C., Morales-Sanchez, E., Vazquez-Landaverde, P. A., & Martínez-Flores, H. E. (2011). Physicochemical properties of masa and corn tortilla made by ohmic heating. *African Journal of Biotechnology*, 10(71), 16028-16036.
- Jaeger, H., Roth, A., Toepfl, S., Holzhauser, T., Engel, K. H., Knorr, D., ... & Steinberg, P. (2016). Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 84-97.
- Jalkh, R., El-Rassy, H., Chehab, G. R., & Abiad, M. G. (2017). Assessment of the Physico-Chemical Properties of Waste Cooking Oil and Spent Coffee Grounds Oil for Potential Use as Asphalt Binder Rejuvenators. *Waste and Biomass Valorization*, 1-8.
- Knirsch, M. C., Dos Santos, C. A., de Oliveira Soares, A. A. M., & Penna, T. C. V. (2010). Ohmic heating—a review. *Trends in food science & technology*, 21(9), 436-441.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11757-11760.
- Kuan, C. Y., Yuen, K. H., Bhat, R., & Liong, M. T. (2011). Physicochemical characterization of alkali treated fractions from corncob and wheat straw and the production of nanofibres. *Food research international*, 44(9), 2822-2829.
- Kuan, Y. H., & Liong, M. T. (2008). Chemical and physicochemical characterization of agrowaste fibrous materials and residues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9252-9257.
- Lario, Y., Sendra, E., Garcia-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 113-117.

- López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food chemistry*, 212, 282-290.
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2016). Dietary fiber extraction for human nutrition—A review. *Food Reviews International*, 32(1), 98-115.
- Martini, D., Del Bo, C., Tassotti, M., Riso, P., Del Rio, D., Brighenti, F., & Porrini, M. (2016). Coffee consumption and oxidative stress: a review of human intervention studies. *Molecules*, 21(8), 979.
- Marto, J., Gouveia, L. F., Chiari, B. G., Paiva, A., Isaac, V., Pinto, P., ... & Ribeiro, H. M. (2016). The green generation of sunscreens: using coffee industrial sub-products. *Industrial Crops and Products*, 80, 93-100.
- Mayanga-Torres, P. C., Lachos-Perez, D., Rezende, C. A., Prado, J. M., Ma, Z., Tompsett, G. T., ... & Forster-Carneiro, T. (2017). Valorization of coffee industry residues by subcritical water hydrolysis: Recovery of sugars and phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 75-85.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179.
- Nair, G. R., Divya, V. R., Prasannan, L., Habeeba, V., Prince, M. V., & Raghavan, G. V. (2014). Ohmic heating as a pre-treatment in solvent extraction of rice bran. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2692-2698.
- Nezarati, R. M., Eifert, M. B., & Cosgriff-Hernandez, E. (2013). Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10), 810-819.
- Passos, C. P., & Coimbra, M. A. (2013). Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 626-633.
- Phimsen, S., Kiatkittipong, W., Yamada, H., Tagawa, T., Kiatkittipong, K., Laosiripojana, N., & Assabumrungrat, S. (2016). Oil extracted from spent coffee grounds for bio-hydrotreated diesel production. *Energy Conversion and Management*, 126, 1028-1036.
- Poulsen, M. W., Hedegaard, R. V., Andersen, J. M., de Courten, B., Bügel, S., Nielsen, J., ... & Dragsted, L. O. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 10-37.

- Rathinavelu, R., & Graziosi, G. (2005). Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización Internacional del Café, ITA. *Central European Journal of Chemistry*, (942), 4.
- Sakr, M., & Liu, S. (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 262-269.
- Somnuk, K., Eawlex, P., & Prateepchaikul, G. (2017). Optimization of coffee oil extraction from spent coffee grounds using four solvents and prototype-scale extraction using circulation process. *Agriculture and Natural Resources*, 51(3), 181-189.
- Steiner, T., & Saenger, W. (1993). Role of C-H-O hydrogen bonds in the coordination of water molecules. Analysis of neutron diffraction data. *Journal of the American Chemical Society*, 115(11), 4540-4547.
- Taş, N. G., & Gökmen, V. (2017). Maillard reaction and caramelization during hazelnut roasting: A multiresponse kinetic study. *Food chemistry*, 221, 1911-1922.
- Temis-Pérez, A. L., López-Malo Vigil, A., & Sosa-Morales, M. E. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5 (2), 54-74.
- Thebaudin, J. Y., Lefebvre, A. C., Harrington, M., & Bourgeois, C. M. (1997). Dietary fibres: nutritional and technological interest. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 41-48.
- Urgert, R., & Katan, M. B. (1997). The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annual review of nutrition*, 17(1), 305-324.
- Vázquez-Sánchez, K., Martínez-Saez, N., Rebollo-Hernanz, M., del Castillo, M. D., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2018). In vitro health promoting properties of antioxidant dietary fiber extracted from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. *Food chemistry*, 261, 253-259.
- Vilela, W. F., Leão, D. P., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2016). Effect of peroxide treatment on functional and technological properties of fiber-rich powders based on spent coffee grounds. *Int. J. Food Eng*, 2(1), 42-47.
- Zuorro, A., & Lavecchia, R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 34, 49-56.