

EVALUACIÓN DE DES, FSC Y SPME/CG-MS PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS RESPONSABLES DEL AROMA DE CAFÉ TOSTADO DE VILCABAMBA - ECUADOR

Jorge G. Figueroa^{a,*} y Luis F. Vargas^b

^aDepartamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n, Loja, Ecuador

^bEscuela de Post Grado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, La Molina – Ap.12-056, Lima, Perú

Recebido em 13/11/2015; aceito em 18/02/2016; publicado na web em 29/04/2016

EVALUATION OF SDE, SFE AND SPME/GC-MS FOR EXTRACTION AND DETERMINATION OF AROMA COMPOUNDS FROM VILCABAMBA – ECUADORIAN ROASTED COFFEE. The aim of this study was to compare the usefulness of three extraction methods: solid-phase microextraction (SPME) with four different coating (PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS and PA), supercritical fluid extraction with carbon dioxide (SCF) and simultaneous distillation and extraction (SDE) for isolation of flavor compounds from roasted ground coffee (*Coffea arabica* L. var. Typica) of Vilcabamba (Ecuador). Identification and characterization of volatile compounds were achieved using gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS). Analysis of variance and principal components analysis was done. For the SPME method the coating material affect the amount and concentration of compounds extracted, the DVB/CAR/PDMS coating provided the most representative aroma extract (44 compounds were identified). The SCF method allowed extracting a higher amount of compounds and also their identification by GC-MS (72) that SDE (64) and SPME (57), in addition provide higher extractions. The acetic acid, caffeine, furfuryl alcohol, furfural, 5-methylfurfural, butylated hydroxytoluene and maltol were the compounds with higher concentrations found with SPME and SDE, with SCF were found higher concentration to compounds with high molecular weights (> 194 g mol⁻¹). Preferably SPME-DVB/CAR/PDMS method should be used for a characterization of coffee aroma compounds.

Keywords: aroma; roasted coffee; Vilcabamba; SPME; SCF; SDE.

INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, apetecida por su agradable aroma y propiedades estimulantes debido a la cafeína.¹ La creencia de que el café provoca efectos negativos para la salud, está teniendo un vuelco total, estudios demuestran que el consumo habitual de café provoca una disminución en el cáncer al colon.² Lo que ha provocado un incremento en su consumo, en el 2014 se comercializaron 8.76 millones de toneladas a nivel mundial.³

La globalización de mercados y la creciente demanda de los consumidores de conocer al detalle la procedencia de sus alimentos, ha provocado que la trazabilidad sea considerada como un factor preponderante. El término trazabilidad de acuerdo a la Comisión Europea, es definida como “La posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, procesamiento y distribución de productos alimenticios, piensos, animales destinados para la producción de alimentos o sustancias incorporadas en productos alimenticios o piensos o con probabilidad de ser usada como tal”.⁴

El precio del café depende de su procedencia, por ejemplo en Toronto - Canadá el café proveniente de Galápagos cuesta más del doble de cafés procedentes de otros mercados. Vilcabamba – Loja es conocido como el “Valle de la longevidad”, esto debido al mito de que la posibilidad de que sus habitantes puedan vivir más de 100 años.⁵ Esto puede ser una de las causas de que en el mercado ecuatoriano el café proveniente de Vilcabamba al igual que el de Galápagos tenga un precio diferenciado.⁶

Existen numerosos estudios del perfil aromático del café; basados en diferentes técnicas de extracción y análisis; que buscan distinguir el café en función a su especie y lugar de origen, con la finalidad de poder reconocer y garantizar su procedencia,^{4,7} esto cada día gana

mayor importancia debido a la necesidad de disponer de una herramienta que permita validar la procedencia del café y evitar fraudes.⁸

El objetivo de la presente investigación fue extraer los componentes volátiles del café (*Coffea arabica* L) tostado y molido de Vilcabamba (Ecuador) mediante los métodos fibra de microextracción en fase sólida, dióxido de carbono en condiciones supercríticas y destilación extracción simultánea, e identificación mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra

Se analizó café (*Coffea arabica* L.) variedad Típica, proveniente de la parroquia Vilcabamba con una altura de 1594 metros sobre el nivel del mar (msnm), perteneciente al cantón Loja, provincia Loja de Ecuador. Debido a que los caficultores cosechan frutos verdes y maduros, se realizó una selección, en función al color del cerezo.⁹ La medida del color se la realizó por medio de las cartas de color de Royal Horticultural Society London.¹⁰ Se determinó acidez (AOAC 942.15), sólidos solubles (AOAC 932.12) y humedad (AOAC 920.151) de la pulpa del fruto de café.¹¹

Se realizó un beneficio húmedo como tratamiento post cosecha de acuerdo al protocolo de Brando.⁹ Para el despulpado se utilizó una despulpadora mecánica FIRMAR. La fermentación del grano se realizó a temperatura ambiente sin adición de levadura, el punto final se determinó en función al grado de pegajosidad,^{9,12} tomando este proceso alrededor de 18 horas. A continuación se eliminó el mucílago mediante lavado con agua potable. La deshidratación se realizó en estufa a 60 °C,¹³ hasta obtener una humedad comprendida entre el 10 al 12%.^{9,14} El pergamino se retiró utilizando una trilladora. El grano verde se clasificó en función al tamaño de grano (5.95 a 6.75

*e-mail: jfigueroa@utpl.edu.ec

mm),¹⁵ mediante juego de zarandas Penagos Clausen. Se determinó la humedad del café verde mediante el método AOAC 920.¹¹

El tostado se realizó siguiendo el protocolo de Specialty Coffee Association of America,¹⁴ que se fundamenta en tostar el grano hasta obtener un color igual al disco #55 perteneciente a la escala Roast Color Classification System,¹⁶ en un lapso de tiempo de 8 a 12 minutos. Se utilizó el tostador de laboratorio Quantik, cuando la temperatura del tambor se estabilizó en 150 °C se cargó 100 g del café y se mantuvo por 10 minutos \pm 30 segundos, finalizado el tostado se dejó reposar el grano por un lapso no menor a 8 horas ni mayor a 24 horas, pasadas las primeras 8 horas se almacenó el grano en fundas herméticas.¹⁷ Se trituró el café tostado utilizando un molino de disco abrasivo Bunn, se tamizó y se trabajó con la porción comprendida entre 1 mm y 500 μ m. Inmediatamente de moler el café, se realizó la extracción de los compuestos volátiles. En las muestras preparadas se cuantificó humedad, acidez y sólidos solubles siguiendo las técnicas AOAC 979.12, AOAC 920.92 y AOAC 973.21 respectivamente.¹¹

Extracción de compuestos

Se evaluó tres métodos de extracción: microextracción en fase sólida (SPME), dióxido de carbono en condiciones supercríticas (FSC) y destilación y extracción simultánea (DES). Además en el método SPME se evaluaron cuatro fibras.

Microextracción en fase sólida (SPME)

Se evaluaron cuatro fibras de microextracción en fase sólida: una apolar de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μ m de ancho de película, dos bipolares divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (PDMS/DBV) 60 μ m y divinilbenzeno/carboxen/ polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/20 μ m y una polar Poliácido (PA) 85 μ m, todas de Supelco (Bellafonte, PA, USA), previo a su uso fueron acondicionadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se colocaron 2,9 g de café tostado y molido en un vial ámbar de 15 mL, se realizó el enriquecimiento del espacio de cabeza mediante un calentamiento a 70 °C por 10 min; se expuso la fibra por 40 minutos a 70 °C. La desorción de compuestos se lo realizó en el puerto de inyección del cromatógrafo (tipo "splitless") a 250 °C por 10 minutos.

Dióxido de carbono en condiciones supercríticas (FSC).

La extracción fue realizada siguiendo la metodología descrita por Stashenko,^{18,19} utilizando un extractor Soxhlet de altas presiones (J&W Scientific, Folsom, CA). En la cámara superior del equipo Soxhlet se colocaron 20 g de café tostado y en la cámara de extracción 200 g de hielo seco (CO₂) comercial (fuera del equipo Soxhlet armado) como fuente de fluido supercrítico.²⁰ Una vez armado el equipo se lo colocó en un baño de agua a 40 °C y se mantuvo la presión a 1200 psi. Luego de dos horas de recirculación del CO₂ el sistema se enfrió hasta que la presión descienda a 500 psi, alcanzado este valor se despresurizó muy lentamente y desarmó el sistema. Utilizando 2 mL de diclorometano se extrajo los compuestos impregnados en las paredes del balón. Se inyectó 1 μ L de extracto en el CG-MS.

Destilación y extracción simultánea (DES).

Simultánea destilación con vapor y extracción líquido-líquido se realizó en modo-versión del aparato de Nickerson y Likens²¹ diseñado por Godefroot,²² mediante la metodologías descrita por Stashenko *et al.*^{19,20} En un balón de 100 mL se pesaron 20 g de café tostado y se adicionan 15 mL de agua destilada. En el balón de 5 mL se adicionan 3,5 mL de diclorometano (grado cromatografía, Merck). En la sección media se adiciona con la ayuda de una jeringa 1,5 mL de diclorometano y 1,5 mL de agua destilada.²²

La destilación se realiza por dos horas, manteniendo a 100 °C el

balón de 100 mL y a 45 °C el balón de 5 mL.²³ Finalizado el tiempo de destilación la extracción, se separó por decantación los solventes que se encontrarán en la parte media. Se inyectó 1 μ L de extracto en el CG-MS.

Detección e identificación de compuestos.

La separación de compuestos se realizó en una columna capilar de polímero de fenil arileno equivalente a (5% fenil)-polidimetilsiloxano con un flujo de 1 mL/min de helio con pureza igual o superior a 99,999% (Indura, Ecuador), con las condiciones cromatográficas descritas por Franca:¹⁵ 40 °C (5 min) hasta 180 °C con una pendiente de 3 °C/min, luego a 250 °C (5 min) con pendiente de 10 °C/min, empleando un cromatógrafo de gases (Agilent 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con espectrómetro de masas (Agilent 5973N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

La identificación de compuestos se realizó mediante: a) Biblioteca Wiley, que dispone de 390 mil espectros y 316 mil compuestos.²⁴ Se considera como identificado un compuesto, si el índice de similitud (QM) es mayor a 80 y, b) Mediante el Índice de Kovats (IK),²⁵ utilizando como patrón una mezcla de hidrocarburos (C8 a C22), y se considera como identificado cuando el IK no difiere en \pm 20 con valores de las referencias bibliográficas.

Análisis estadístico

El análisis se realizó en base a los siguientes compuestos marcadores: ácido acético, 2-metil pirazina, furfural, alcohol 2-furfural, 2,6-dimetil pirazina y 5-metil furfural.²⁶ Usando el paquete estadísticos MINITAB versión 14, realizando pruebas de análisis de varianza y análisis de componentes principales (PCA). Se consideró como hipótesis nula: No existe diferencia significativa en la concentración de ácido acético, 2-metil pirazina, furfural, alcohol 2-furfural, 2,6-dimetil pirazina y 5-metil furfural, al utilizar diferentes métodos de extracción. Considerando los diferentes métodos de extracción como variables: Microextracción en fase sólida, CO₂ en condiciones supercríticas y destilación extracción. Diferencias fueron consideradas significativas a $p > 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas en la calidad del café ecuatoriano se da en las etapas de cosecha y post-cosecha, la selección provocó una eliminación del 47% de café cereza (inmaduro). El color más representativo del café cereza seleccionado fue el Orange-Red Group N34-A de acuerdo a las cartas de color,¹⁰ similar al color rojo encontrado por Carvajal Herrera *et al.*²⁷ y Sandoval y Prieto²⁸ para café arábico. El fruto de café seleccionado a pesar de tener una coloración para un café maduro, la acidez encontrada fue de $8,3 \pm 0,4$ mL de NaOH 0,1 N por 100 g y sólidos solubles de $10,7 \pm 0,1\%$, valores menores a los indicados por Marín *et al.*²⁹ de 11,4 mL de NaOH 0,1 N por 100 g y 18% respectivamente para café arábico maduro con 217 días desde la floración (DDF) cultivado a una altitud de 1400 msnm. Se debe tener en cuenta que la acidez del café depende de factores como fertilización, altura, etc. La pulpa de café tuvo una humedad de $84,0 \pm 0,1\%$, superior a la indicada por Marín *et al.*²⁹ de 69,7% para café maduro (217 DDF). La baja productividad del café de Ecuador menor a 5 o 6 quintales/hectáreas por año se puede atribuir a la alta humedad del fruto encontrada.

Resultado del beneficio se obtuvo un café verde con una humedad de $11,3 \pm 0,2\%$, este valor cumple con los requisitos para café verde según normas INEN 285³⁰ y SCCA¹⁷, y similar al valor encontrado de 11,4% por Mazzafera³¹ para café sin defectos. El tostado provocó una

disminución de peso del $15,2 \pm 0,6\%$, este valor se encuentra en el rango indicado por Belitz *et al.*¹³ de 11 a 20%. Los valores de humedad y sólidos solubles del café tostado, cumplen con los requisitos de las normas INEN 1123³² y COVENIN 46³³ con valores de $4,3 \pm 0,2\%$ y $24,1 \pm 1,0\%$ expresado en base seca respectivamente. Se encontró una acidez de $194 \pm 6,2$ mL de NaOH 0,1 N por cada 100 g de café tostado, resultado comprendido en el rango indicado por Parizzi³⁴ de 180 a 220 mL de NaOH 0,1 N por cada 100 g.

Extracción e identificación de compuestos

La combinación de los tres métodos permitió encontrar 123 compuestos (Figura 1), 17 fueron detectados por todos los métodos, 22 por SPME cuatro fibras y cuatro exclusivamente por las metodologías DES y FSC. El método SPME con fibras DBV/PDMS/CAR y PDMS/DVB que tienen la propiedad de adsorber los compuestos permitieron identificar 44 y 37 compuestos superando a los 30 y 25 encontrados por el método SPME fibras PA y PDMS respectivamente, que tienen el mecanismo de absorber los compuestos.^{35,36} El 1,2-ácido benzenodioxibenzoico-diéster compuesto que proviene de la degradación del septum, fue identificado únicamente por las fibras PDMS/DVB, DVB/PDMS/CAR y PA.³⁷

Se debe tener en cuenta que existen analitos (Tabla 1S) como el 2-metilpirazina que es identificado con IK y QM para todos los métodos menos con el QM con la fibra PDMS, furfural que es identificado con un QM de 83 mediante una extracción FSC, pero no cumple el criterio para DVB/PDMS/CAR y DES con QM de 80 y 64 respectivamente. El 2,5-dimetil-3(2H)-furanona es identificado cuando se extrae con PDMS/DVB, PA y DES, pero no es identificado con PDMS, DVB/PDMS/CAR y no es detectado con FSC. El 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-ona es identificado con IK para PDMS/DVB y con QM para DVB/PDMS/CAR y PA. En la Figura 1 se visualiza el número de compuestos que fueron extraídos pero que no fueron identificados y en la Tabla 1S se muestran el IK de bibliografía, IK práctico y QM para todos los métodos de extracción evaluados.

Rojas³⁸ en su estudio sobre la caracterización de café arábico mediante SPME encuentra 76 compuestos con DVB/CAR/PDMS y 33 con PDMS, a pesar de encontrar un número menor de compuestos, el método SPME fibras DVB/CAR/PDMS y PDMS encuentra todos los compuestos que Korhonová *et al.*²⁶ consideran que presentan la información necesaria para diferenciar cafés provenientes de diferentes localidades.

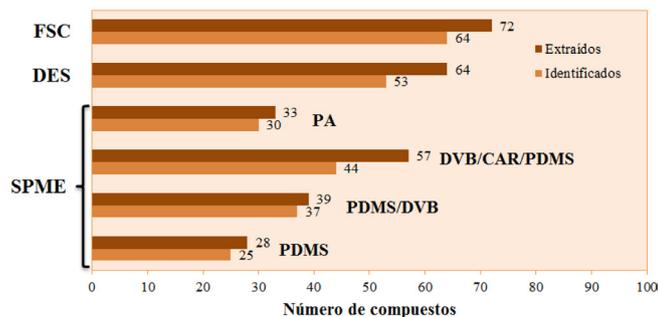


Figura 1. Número de compuestos extraídos e identificados en el café tostado en función del método de extracción

En el método SPME, la fibra PDMS/DVB permitió identificar siete compuestos más que la fibra PA, de los cuales coinciden 28 compuestos, la fibra PA extrajo 4 compuestos diferentes: 1-hidroxi-2-butanona, fenol (identificado), 2-(2-etoxietoxi)-etanol (identificado), alcohol bencílico (identificado). Pero la fibra PA permite una mayor

extracción para 29 compuestos, por ejemplo se obtiene una área 6 veces mayor para el 2-furanocarboxaldehído, 17 veces mayor para el ácido acético y alcohol furfurílico. Los dos compuestos que tienen un área menor para la fibra PA son 2,6-bis(1,1-dimetil)etil-4-metil-fenol y cafeína con un tercio y dos tercios menor respectivamente.

En la Figura 2 se muestra la capacidad de los diferentes métodos para extraer los compuestos en función al peso molecular, se refleja que el mejor método SPME con fibra DVB/CAR/PDMS (que al poseer tres fases), permite extraer compuestos con un amplio rango de pesos molecular (44 a 282 g mol⁻¹), ratificando lo indicado por Mondello *et al.*³⁹

En el método SPME, las fibras PDMS y PA al tener un mecanismo no competitivo de absorción poseen características de extraer compuestos volátiles de menor peso molecular,^{36,40} concordando con los resultados que se muestran en la Figura 2.

Medición y reproducibilidad de compuestos

Los compuestos y sus áreas que tienen las cinco mayores respuestas para cada método de extracción (el área se encuentra entre paréntesis se expresa en unidades arbitrarias y debe multiplicarse por 106): para el método SPME fibra PDMS fueron cafeína (433), alcohol furfurílico (16), ácido acético (15), 2,6-bis(1,1-dimetil)etil-4-metil-fenol (10) y 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona (6), con SPME fibra PDMS/DVB cafeína (1376), ácido acético (61), alcohol furfurílico (44), 3-hidroxi-2-metil-4h-piran-4-ona (42) y 2,6-bis(1,1-dimetil)etil-4-metil-fenol (17), para SPME fibra DVB/CAR/PDMS ácido acético (1235), cafeína (1063), alcohol furfurílico (878), 2-furanocarboxaldehído (716) y 5-metilfurfural (628); para SPME fibra PA fueron ácido acético (1036), alcohol furfurílico (754), cafeína (499), 3-hidroxi-2-metil-4h-piran-4-ona (199) y 2-(2-etoxietoxi)-etanol (135); para el método DES 2-furanocarboxaldehído (2570), 5-metilfurfural (1791), alcohol furfurílico (1293), 2-metilpirazina (916), 2,6-dimetilpirazina (856) y finalmente para el método FSC cafeína (78981), ácido palmítico (16881), ácido *cis*-linoleico (11467), ácido octadecanoico (2702) y alcohol furfurílico (1284). Flament⁴¹ indica que la presencia de ácidos grasos en estado libre se puede atribuir al tostado o la utilización de técnica de extracción. La oxidación del ácido linoleico produce hexanal y compuestos volátiles secundarios que producen olores desagradables.⁴²

El alcohol furfurílico es uno de los compuestos que presenta mayores áreas solo menor que el ácido acético y cafeína para las cuatro fibras en el método SPME. Korhonová *et al.*²⁶ en su estudio sobre aroma del café encuentra que el alcohol furfurílico es el que presenta una mayor área, seguido por ácido acético en café arábico. Resalta que para el método SPME fibras PDMS y PDMS/DVB coinciden los seis primeros compuestos mayoritarios, pero con variaciones en el orden. Únicamente en el método DES la cafeína no se encuentra entre las primeras ocho áreas, debido a la característica de la metodología, que extrae en función a una destilación a 100 °C, la cafeína al tener un punto de ebullición de 237 °C se extrae principalmente por evaporación. La metodología FSC tiene mejor capacidad de extraer compuestos menos volátiles y con pesos moleculares altos. Este se ve demostrado con los cuatro compuestos que presentan las mayores áreas: cafeína, ácido palmítico, ácido *cis*-linoleico y ácido octadecanoico. El alcohol furfurílico, 5-metilfurfural y 2-furanocarboxaldehído coinciden como los compuestos con mayores áreas para DES y FSC.

De los 123 compuestos encontrados 17 compuestos fueron detectados y 15 fueron identificados por los tres métodos de extracción: piridina, 2-miltetrahidrofuran-3-ona, 2-metilpirazina, 2-furanocarboxaldehído, alcohol furfurílico, 1-hidroxi-2-propanona acetato, 1-(2-furanil)-etanol, 2,6-dimetilpirazina, etilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfural acetato, 2-etil-6-metilpirazina,

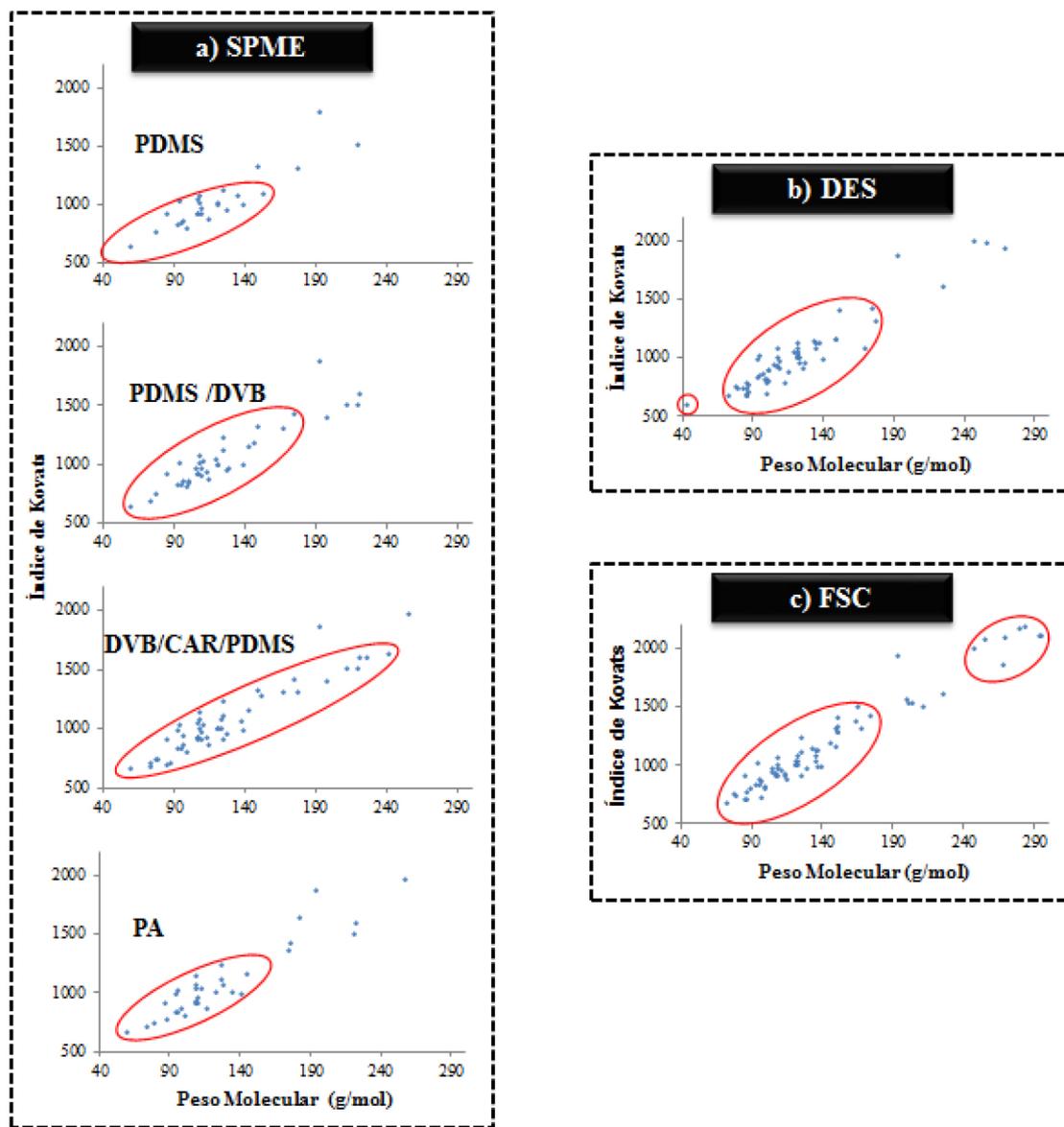


Figura 2. Capacidad de extracción de los diferentes métodos representados en función al Índice de Kovats y peso molecular

1-(1H-pirrol-2-yl)-etanona y cafeína. Los IK encontrados para estos compuestos están entre 749 a 1073 y los pesos moleculares (PM) entre 79,0999 a 140,1366 g/mol a excepción de la cafeína con IK de 1866 y PM 194,1906 g mol⁻¹. Resalta que en este rango las mayores áreas se encuentran con DES, únicamente para la cafeína se obtiene una mayor área con FSC. Las áreas obtenidas para 2-metil tetrahydrofuran-3-ona, 2-metilpirazina, 1-hidroxi-2-propanona acetato, 2,6-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina y 2-etil-6-metilpirazina con el método de extracción DES son significativas diferentes comparadas con los otros dos métodos.

Para el método SPME se detectaron 5 e identificaron 4 compuestos con todas las cuatro fibras: ácido acético, dihidro-2(3h)-furanona, 3-hidroxi-2-metil-4h-piran-4-ona y 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol. Con la fibra DVB/CAR/PDMS se obtuvieron áreas mayores si se comparan con las otras fibras utilizadas en SPME, a excepción de los compuestos 1-hidroxi-2-propanona acetato, 2,6-dimetilpirazina, dihidro-2(3H)-furanona, 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona y 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol que presentaron mayor área con la fibra PA.

La piridina a pesar de tener un IK de 749 y PM de 79,0999 g/mol presenta un área con FSC que no tienen diferencia significativa con el método DES y SPME fibra DVB/CAR/PDMS, de los cuales

se esperaría tener un área mayor por la afinidad a este compuesto, por su punto de ebullición bajo de 115,2 °C.

La reproducibilidad de tres repeticiones para el método SPME con las cuatro fibras, es igual o inferior al 11%, resultado similar al indicado por Mestres⁴³ al realizar inyección manual con fibras PDMS y PA para el análisis de volátiles en vino y al reportado por Hayasaka⁴⁴ de 10% al analizar diacetil en vino, con fibra PDMS y Carbowax/DBV (CW/DVB), menor al valor obtenido por Miller⁴⁵ de 11,3% al analizar jugo de frutas con las fibras PDMS, PA, Carboxen, PDMS, PDMS/DVB y CW/DVB y mayores a los reportados por Costa *et al.*⁴⁰ de 6,8%, al utilizar fibra de PDMS y CW/DBV.

Eficiencia de los métodos de extracción

Los resultados en función a la sumatorias de área de pico para los compuestos identificados se muestran en la Figura 3. En SPME al comparar los resultados encontrados con las cuatro fibras, se evidencia un mayor potencial para la fibra DBV/CAR/PDMS obteniendo una sumatoria de áreas aproximadamente igual al doble que para la fibra PA, cuatro y doce veces mayor comprada con las fibras PDMS/DVB y PDMS respectivamente. Esto es debido a que su composición le

confiere la posibilidad de extraer compuestos con diferente estructura y polaridad.⁴⁶ Los resultados encontrados ratifica lo mencionado por Majcher y Jeleń³⁶ en su estudio de extracción de componentes volátiles de extruidos de papa, donde indica que la fibra que permite la mayor extracción de compuestos en función a las áreas es la DVB/CAR/PDMS seguida por la PDMS/DVB y siendo la menos efectiva la PDMS, en el estudio no evalúa la fibra de PA.

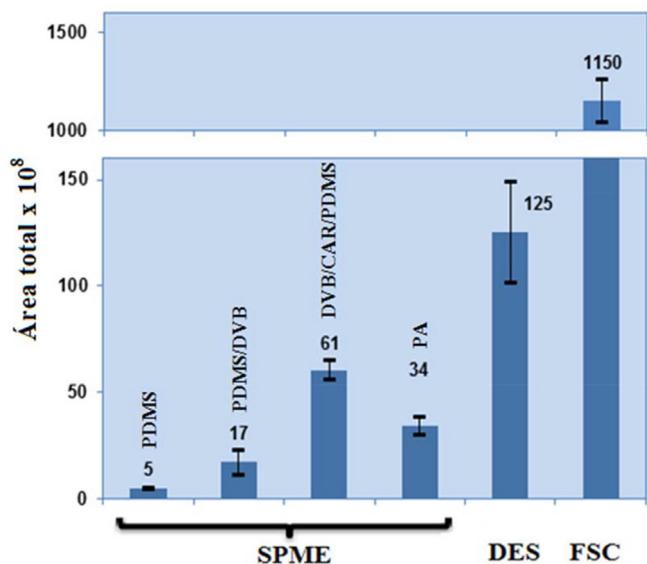


Figura 3. Área total de los picos obtenidos del café tostado en función del método de extracción

Pero comparando el método SPME fibra DVB/CAR/PDMS con las metodologías DES y FSC se evidencia una gran diferencia, siendo las áreas obtenidas por FSC aproximadamente diez veces mayor que con SPME; esto debido a la alta concentración de cafeína (789×10^8); y respecto a DES un poco más que el doble que SPME. Pero si se compara en función de los tipos de compuestos disminuye la diferencia (Figura 4), por ejemplo con los furanos que es el grupo funcional orgánico con mayor presencia se tiene áreas de 24×10^8 SPME fibra DVB/CAR/PDMS, 25×10^8 para FSC y 68×10^8 para DES. De manera global los métodos FSC y SPME fibra DVB/CAR/PDMS son los que nos permiten tener mayores área para todos los tipos de compuestos.

Análisis de varianza

Korhonová *et al.*²⁶ en su estudio sobre el aroma del café concluyen que los siguientes compuestos: ácido acético, 2-metilpirazina, 2-furano carboxaldehído, alcohol furfurfílico, 2,6-dimetilpirazina y 5-metilfurfural (2, 26, 27, 28, 39 y 47), proveen suficiente información para diferenciar 30 muestras de café, por lo cual se escogió estos compuestos como marcadores para determinar que método

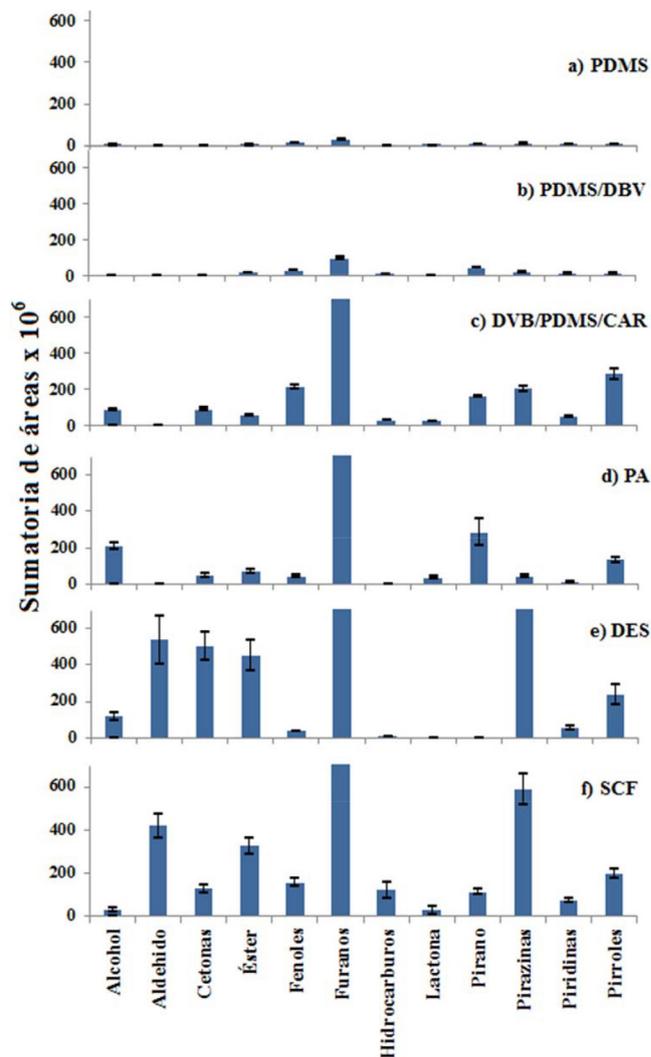


Figura 4. Sumatoria de áreas para los diferentes grupos funcionales encontrados

permite la mejor extracción. En la Tabla 1 se presentan los resultados encontrados al realizar un análisis de varianza simple para cada compuesto versus las fibras utilizadas en el método SPME (resultados expresados como áreas de los picos). De éste análisis resulta que la fibra PDMS/DVB/CAR nos permite extraer una mayor cantidad para los compuestos analizados, no existiendo diferencia significativa ($p > 0,05$) con la fibra PA para los compuestos ácido acético, alcohol furfurfílico y 2,6-dimetilpirazina, los cuales son compuestos polares; para el 2-furano carboxaldehído y 5-metilfurfural que no son polares se evidencia una gran diferencia entre las fibras PDMS/DVB/CAR y PA, debido a la propiedad que tiene la fibra de tres fases de extraer compuestos polares y apolares.

Tabla 1. Análisis de varianza en función a las fibras de microextracción utilizadas en el método SPME

Fibra	Ácido acético	2-metilpirazina	2-furano carboxaldehído	Alcohol furfurfílico	2,6-dimetilpirazina	5-metilfurfural
PDMS	150 ± 13 ^b	9 ± 1 ^c	8 ± 1 ^b	155 ± 3 ^b	24 ± 3 ^b	41 ± 5 ^b
PDMS/DVB	609 ± 55 ^b	79 ± 5 ^{bc}	69 ± 9 ^b	439 ± 10 ^b	57 ± 3 ^b	154 ± 8 ^b
DVB/CAR/PDMS	12345 ± 315 ^a	786 ± 72 ^a	7156 ± 585 ^a	8776 ± 232 ^a	153 ± 18 ^a	6276 ± 418 ^a
PA	12689 ± 4518 ^a	144 ± 21 ^b	470 ± 55 ^b	7544 ± 1063 ^a	190 ± 22 ^a	678 ± 135 ^a

Valores expresados en abundancia del área $\times 10^5$. Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas experimentales. Las medias que no comparten una letra en una misma columna, son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 2. Análisis de varianza en función a los diferentes métodos

Método	2-metilpirazina	2-furano carboxaldehído	Alcohol furfurfúrico	2,6-dimetilpirazina	5-metilfurfural
SPME (DVB/CAR/PDMS)	789 ± 72 ^b	7156 ± 785 ^b	876 ± 232 ^a	153 ± 18 ^b	6276 ± 418 ^b
DES	9162 ± 597 ^a	25695 ± 4093 ^a	12926 ± 2994 ^a	8561 ± 1435 ^a	17913 ± 2995 ^a
SCF	1180 ± 98 ^b	2910 ± 264 ^b	12840 ± 339 ^a	1637 ± 313 ^b	3266 ± 409 ^b

Valores expresados en abundancia del área x 10⁵. Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas experimentales. Las medias que no comparten una letra en una misma columna, son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

No existe diferencia significativa ($p > 0,05$) para los 6 compuestos, cuando se utilizó las fibras PDMS y PDMS/DVB al evaluar simultáneamente todas las fibras. Pero al analizar solo las dos fibras existe diferencia significativa para todos los compuestos, siendo siempre mayor para la fibra con dos fases. Akiyama *et al.*⁴⁷ en su estudio sobre café tostado encuentra la misma proporción, por ejemplo el alcohol furfurfúrico obtuvo para la fibra PDMS/DVB 5,8 veces mayor que para la fibra PDMS, resultado similar al encontrado de 8,6 veces, para 5-metilfurfural la proporción es 4,4 similar a la encontrada de 3,8, para el 2,6-dimetilpirazina la proporción es 1,4 similar a la encontrada de 2,4 veces mayor y en el compuesto 2-metilpirazina se mantiene la tendencia, en el estudio mencionado no evalúa al ácido acético.

En la Tabla 2 se comparan los tres métodos de extracción (SPME fibra DVB/CAR/PDMS, FSC y DES) con los cinco compuestos marcadores; no se incluye en el análisis el ácido acético debido a que se solapa con la elución del diclorometano utilizado como solvente en las metodologías DES y FSC, para los compuestos marcadores analizados no se presenta diferencia significativa ($p > 0,05$) con los métodos SPME fibra DVB/CAR/PDMS y FSC. Para estos compuestos que tienen pesos moleculares inferiores a 112 g mol⁻¹ el método que permite una mayor extracción es el DES.

Análisis de componentes principales

Para determinar la capacidad de extracción de los diferentes métodos (para SPME se incluye los resultados encontrados con las cuatro fibras), se realizó un análisis de componentes principales (ACP) mediante tres variables: a) utilizando los compuestos que se identificaron con todos los métodos, b) todos los compuestos utilizados en a) menos cafeína y c) los compuestos que indica Korhonová *et al.*²⁶ como aquellos que brindan suficiente información para distinguir muestras de café de distintas localidades.

ACP con 15 compuestos identificados en todas las metodologías.

Al realizar el ACP con los 15 compuestos identificados (1H-pirrol-2-carboxaldehído y 2-formil-1-metilpirrol fueron extraídos por todos los métodos pero no fue comprobada su identificación por lo cual no se incluyen en éste análisis), obtenemos que dos componentes nos proporcionan el 94,4% de la información del comportamiento de las metodologías (Figura 5). El primer componente nos aporta el 82,1% de la información y tiene correlación positiva con todos los compuestos menos la cafeína. El segundo componente nos brinda el 12,4% de la información y resalta su alta correlación con la cafeína, alcohol furfurfúrico, piridina (nombrados en orden descendente en función a su correlación). En la Figura 5 se puede observar que la composición obtenida con el método FSC es muy diferente al resto debido principalmente a la cafeína, el método de extracción DES también presenta un comportamiento diferente pero debido a que tiene mayor afinidad por el grupo de compuestos resaltado. El método SPME con las fibras PDMS y PDMS/DBV tienen un comportamiento

muy similar entre sí. Finalmente el método SPME con fibras PA y DVB/CAR/PDMS obtuvieron una composición similar, pero con la diferencia de que el método SPME fibra DVB/CAR/PDMS tiene mayor afinidad por la cafeína.

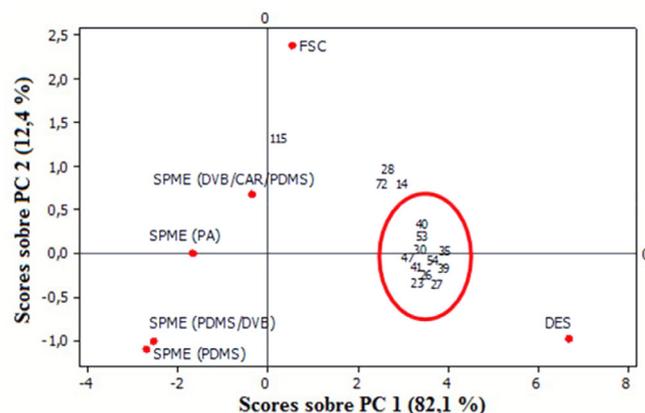


Figura 5. Representación de la composición final obtenida con los 15 compuestos identificados, en el sistema de coordenadas formado por los dos primeros componentes

ACP con 14 compuestos identificados (sin cafeína) en todas las metodologías

Al excluir la cafeína del ACP, el resultado para el método FSC cambia notoriamente como era de esperar (Figura 6), al ser un método con mayor afinidad por compuestos con pesos moleculares mayores, ahora presenta un comportamiento muy similar a SPME fibra DVB/CAR/PDMS con afinidad a los compuestos piridina, alcohol furfurfúrico y 1-(1H-pirrol-2-yl)-etanona (14, 28 y 72). El comportamiento de SPME fibras PDMS y PDMS/DVB se repite comparado con la evaluación anterior, este debido principalmente a sus piores

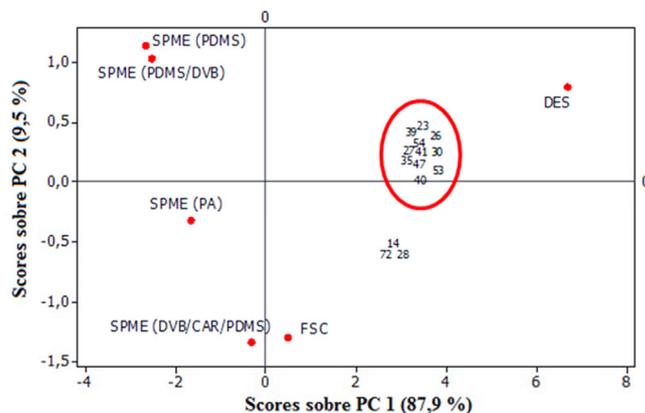


Figura 6. Representación de la composición final obtenida con los 14 compuestos identificados (sin cafeína), en el sistema de coordenadas formado por los dos primeros componentes

capacidades de extraer compuestos. En éste análisis los dos primeros componentes aportan el 97,4% de la información aproximadamente 3% más que al incluir cafeína en el análisis, también aumenta la información del primer componente obteniendo el 87,9%, teniendo correlación positiva con todos los 14 compuestos. El segundo componente aporta el 9,5% de la información resaltando su correlación negativa con los compuestos 14, 28 y 72 brindando la información relacionada con los métodos FSC y SPME fibra DVB/CAR/PDMS. El método DES mantiene su afinidad por los mismos 11 compuestos resaltados en la Figura 5.

ACP con 6 compuestos marcadores

Korhonová *et al.*²⁶ en su análisis del aroma del café indica que los compuestos 2, 26, 27, 28, 39 y 47, proveen suficiente información para diferenciar 30 muestras de café, en las Tablas 1 y 2 se realizó un análisis de varianza con estos compuestos. Los dos componentes principales encontrados brindan el 92,7% de la información, existe aproximadamente 5% menos información si se compara con la obtenida con 14 compuestos. No se evidencia mayor diferencia en el comportamiento de las metodologías y composición final obtenida al realizar el ACP con 6 o 14 compuestos (Figura 6 y Figura 7).

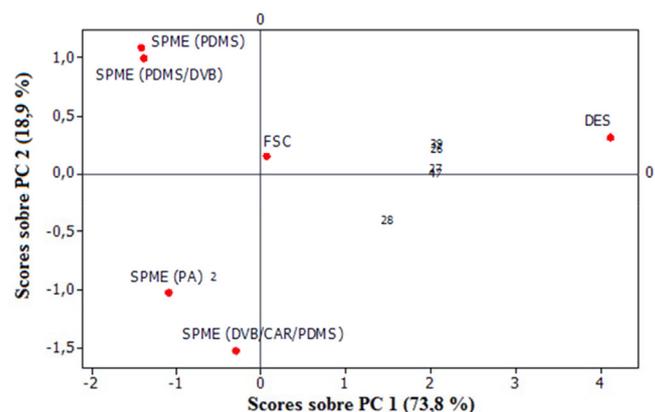


Figura 7. Representación de la composición final obtenida con los 6 compuestos marcadores, en el sistema de coordenadas formado por los dos primeros componentes

Al incluir el ácido acético, compuesto que no fue identificado con los métodos DES y FSC debido a que coeluye con el solvente, modifica el comportamiento del método FSC con los dos primeros componentes. El primero componente tiene únicamente correlación negativa con el ácido acético y el segundo componente tiene correlación positiva con 2,6-dimetilpirazina (39) y marcada correlación negativa con el ácido acético.

CONCLUSIONES

Para el método SPME el material de empaque de las fibras de microextracción tuvo efecto sobre el número y tipo de compuestos que se pueden extraer e identificar. En orden creciente las fibras PDMS, PDMS/DVB, PA y DVB/CAR/PDMS permiten extraer la mayor cantidad de compuestos. La fibra de tres fases DVB/CAR/PDMS permitió obtener el perfil aromático más representativo extrayendo 57 compuestos e identificando 44 de ellos con puntos de ebullición bajo, medio y alto.

La combinación de los tres métodos (seis tratamientos) nos permitió obtener un perfil aromático con 123 compuestos diferentes. En función del área encontrada los furanos y pirazinas fueron los grupos funcionales orgánicos que presentaron mayores resultados en el café tostado de Vilcabamba, siendo el ácido acético, cafeína, alcohol

furfurílico, 2-furanocarboxaldehído, 5-metilfurfural, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol y 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona los compuestos mayoritarios encontrados con los diferentes métodos a excepción del método FSC donde predominan los compuestos con pesos moleculares mayores.

El método de extracción DES es un método muy efectivo para determinar compuestos con pesos moleculares inferiores a 140 g/mol, principalmente compuestos de grupos funcionales como aldehídos, cetonas, ésteres, furanos, pirazinas y pirroles.

Los compuestos ácido acético, 2-metilpirazina, 2-furano carboxaldehído, alcohol furfurílico, 2,6-dimetilpirazina y 5-metilfurfural proporcionan suficiente información para distinguir el comportamiento de los métodos de extracción evaluados.

Al comparar los diferentes métodos se evidencia que el método SPME con fibra de tres fases DVB/CAR/PDMS, permite de forma rápida, reproducible y sin la utilización de reactivos la obtención de un perfil representativo del aroma de café de Vilcabamba.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

La Tabla 1S que contiene la identificación de compuestos mediante Índice de Kovats e Índice de coincidencia, está disponible en <http://quimicanova.s bq.org.br>, en archivo PDF, con acceso libre.

REFERENCIAS

- Parliament, T. In *Caffeinated Beverages*, Parliament, T., ed.; American Chemical Society: Washington, 2000, chap. 20.
- Printz, C.; *Cancer* **2015**, *121*, 4102.
- <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>, accessed November 2015.
- Risticvic, S.; Carasek, E.; Pawlisyzy, J.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *617*, 72.
- Mazess, R.B.; *Am. J. Roentgenol.* **1978**, *130*, 671; Mazess, R.B.; Mathisen, R.W.; *Hum. Biol.* **1982**, *517*; Young, R.D.; Desjardins, B.; McLaughlin, K.; Poulain, M.; Perls, T.T.; *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* **2011**, *2010*.
- http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/05/PROEC_AS2013_CAFE.pdf, accessed September 2015.
- Freitas, A.C.; Mosca, A.; *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 565; Mehari, B.; Redi-Abshiro, M.; Chandravanshi, B.S.; Combrinck, S.; Atlabachew, M.; McCrindle, R.; *J. Food Compos. Anal.* **2016**, *45*, 16; Yener, S.; Romano, A.; Cappellin, L.; Märk, T.D.; Sánchez del Pulgar, J.; Gasperi, F.; Navarini, L.; Biasioli, F.; *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 929; Peres, B.; Barlet, N.; Loiseau, G.; Montet, D.; *Food Control* **2007**, *18*, 228; Luykx, D.M.; Van Ruth, S.M.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 897.
- Sberveglieri, V.; Concina, I.; Falasconi, M.; Pulvirenti, A.; Fava, P. In *Sensors and Microsystems*, D'Amico, A.; Di Natale, C.; Mosiello, L.; Zappa, G., eds.; Springer: Roma, 2012, chap. 25.
- Brando, C. H. J. In *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*, Wintgens, J. N., ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2008, chap. 2.
- Royal Horticultural Society colour chart*, Royal Horticultural Society: Reino Unido, 1986.
- Official Methods of Analysis of AOAC International*; Horwitz, W., ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, 2005, chap. 30 and 37.
- Castañeda, E.; *Manual Técnico Cafetalero*, Asociación de Exportadores y USAID: Perú, 1997.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.; *Food Chemistry*, Springer: Berlin Heidelberg, 2009, chap. 21.
- Cupping Specialty Coffee*, Specialty Coffee Association of America: 2009.

15. Franca, A.; Oliveira, L.; Oliveira, R.; Mancha, P.; Augusti, R.; *J. Food Eng.* **2009**, *92*, 345.
16. Staub, C.; *Roast Color Classification System*, Agtrom/Specialty Coffee Association of America, 1995.
17. *Green Coffee Quality*, Specialty Coffee Association of America: 2009.
18. Stashenko, E.; Ordóñez, S. A.; Marín, N. A.; Martínez, J. R.; *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 817; Stashenko, E.E.; Acosta, R.; Martínez, J.R.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *43*, 379.
19. Stashenko, E. E.; Prada, N. Q.; Martínez, J. R.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1996**, *19*, 353.
20. Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martínez, J. R.; *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas, Fis. Nat.* **2003**, *27*, 579.
21. Nickerson, G.; Likens, S.; *J. Chromatogr.* **1965**, *21*.
22. Godefroot, M.; Sandra, P.; Verzele, M.; *J. Chromatogr. A* **1981**, *203*, 325.
23. Solís, H.; Caldero, M.; Schorr, S.; Luna, G.; Ragazzo, J.; *Food Chem.* **2007**, *105*, 829.
24. Agilent Technologies; *GC/MSD Libraries for the MSD ChemStation*, USA, 2000.
25. Skoog, D.; Holler, J.; Nieman, T., In *Principios de Análisis Instrumental*; Fernández Madrid, C., ed.; McGraw Hill: Madrid, 2005, chap. 27.
26. Korhonová, M.; Hron, K.; Klimčíkova, D.; Müller, L.; Bednár, P.; Barták, P.; *Talanta* **2009**, *80*, 710.
27. Carvajal Herrera, J. J.; Aristizábal Torres, I. D.; Oliveros Tascón, C. E.; Mejía Montoya, J. W.; *Rev. Fac. Nac. Agron., Univ. Antioquia* **2011**, *64*, 6229.
28. Sandoval, Z.; Prieto, F.; *Rev. Fac. Nac. Agron., Univ. Antioquia* **2007**, *60*, 4105.
29. Marín, S.; Arcila, J.; Montoya, E.; Oliveros, C.; *Cenicafé* **2003**, *54*, 208.
30. Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización; *Café verde en grano: clasificación y requisitos*, Ecuador, 2006.
31. Mazzafera, P.; *Food Chem.* **1999**, *64*, 547.
32. Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización; *Café tostado y molido: requisitos*, Ecuador, 2006.
33. Comisión Venezolana de Normas Industriales; *Café tostado o molido*, Venezuela, 1995.
34. Parizzi, F. C.; *Tesis doctoral*, Universidade Federal de Viçosa, Brazil, 2005.
35. Vas, G.; Vékey, K.; *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 233.
36. Majcher, M.; Jeleń, H. H.; *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 606.
37. Dey, G.; Das, T. N.; *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *51*, 117.
38. Rojas, G.; *Tesis de Maestría*, Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, 2005.
39. Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Costa, R.; Festa, S.; Dugo, G.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 442.
40. Costa, A.; Parreira, C.; Vilas, L.; *Chromatographia* **2001**, *54*, 647.
41. Flament, I.; *Coffee Flavor Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, 2001.
42. Marin, K.; Požrl, T.; Zlatić, E.; Plestenjak, A.; *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, *46*, 442.
43. Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *808*, 211.
44. Hayasaka, Y.; Bartowsky, E. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 612.
45. Miller, M. E.; Stuart, J. D.; *Anal. Chem.* **1998**, *71*, 23.
46. Bicchi, C.; Drigo, S.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *892*, 469.
47. Akiyama, M.; Murakami, K.; Ikeda, M.; Iwatsuki, K.; Kokubo, S.; Wada, A.; Tokuno, K.; Onishi, M.; Iwabuchi, H.; Tanaka, K.; *Food Sci. Technol. Res.* **2005**, *11*, 298.