

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE EXTRACTOS DE CAFÉ OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Andrés F. Peralta-Bohórquez^{1*}, Jorge A. Pino², Clara E. Quijano-Célis³ y Fabián Parada¹

¹Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Dpto. de Química, Cra. 30
N° 45-03, Bogotá, Colombia

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, Carretera al Guatao,
km 3½, La Habana, C.P. 19 200, Cuba.

³Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Dpto. de Química, Cra. 1ª, Este
N° 18-A-10 Edif. Q (Q-826), Bogotá, Colombia

E-mail: afperaltab@unal.edu.co

RESUMEN

Fueron analizados por microextracción en fase sólida extractos de café colombiano (*Coffea arabica*), obtenidos con dióxido de carbono supercrítico y recolectados sobre propilenglicol. La optimización de las condiciones analíticas se realizó a partir de un diseño de superficie de respuesta. Se evaluaron la temperatura y tiempo de extracción, tomando como variable de respuesta el área cromatográfica total y número de picos cromatográficos. La temperatura y tiempo de extracción resultaron significativas, mientras que la interacción entre estos dos factores resultó no ser significativa para los modelos. Se seleccionaron 60 °C y 25 min como temperatura y tiempo de extracción óptimos para realizar la técnica de HS-SPME con fibras de PDMS/DVB.

Palabras clave: *Coffea arabica*, compuestos volátiles, SPME, SFE, GC.

ABSTRACT

Solid phase microextraction of coffee extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction

Colombian coffee extracts (*Coffea arabica*) obtained with supercritical carbon dioxide and collected on propyleneglycol were analyzed by solid phase microextraction. The analytical parameters were optimized by surface response design. Temperature and extraction time were evaluated as factors, whereas the total chromatographic area and the number of chromatographic peaks were the response variables. The temperature and extraction time were significant, while the interaction between both factors were not significant for the models. Extraction at 60°C for 25 was selected as the optimal parameters for the HS-SPME analysis using a PDMS/DVB fiber.

Key words: *Coffea arabica*, volatile compounds, SPME, SFE, GC.

INTRODUCCIÓN

El café es nativo de Etiopía, perteneciente a la familia *Rubiaceae*. Solo tres de las 70 especies de café son cultivadas: *Coffea arabica*, con 75 % de la producción mundial; *C. canephora*, cerca de 25 % y *C. liberica* y otras con menos de 1 % (1).

***Andrés Felipe Peralta Bohórquez:** *Químico (Universidad Nacional de Colombia, 2007). Profesor de Cátedra de la Universidad de los Andes, Bogotá-Colombia. Desarrolla investigación en el campo de los alimentos, principalmente en diferentes técnicas de extracción e identificación de compuestos volátiles y carotenoides.*

Las características organolépticas y sensoriales del café instantáneo han sido mejoradas por la adición de extracto de café. En patentes recientes se describen muchos métodos para mejorar la técnica de obtención de extractos, incluyendo el uso de fluidos supercríticos (2, 3). Sin embargo, muchas son secretos industriales y por lo tanto no son de dominio público. La extracción con fluidos supercríticos (SFE) puede ser una tecnología potencial para la obtención de extractos aromáticos de café, debido a que no hay calentamiento excesivo. Por lo tanto, se reduce considerablemente la formación de artefactos.

El análisis sensorial, en extractos de café, se ha empleado para comparar técnicas de extracción tales como alto vacío, extracción con destilación simultánea, SFE y compresión, encontrándose diferencias significativas entre los métodos y proponiendo la técnica de alto vacío como la ideal para la obtención de extractos representativos (4). No obstante, también se ha empleado cromatografía de gases para caracterizar y evaluar extractos de café obtenidos por SFE, Soxhlet y microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) (5).

La técnica de HS-SPME permite evaluar los compuestos volátiles de extractos obtenidos por SFE, es relativamente rápida y económica, y no requiere de equipos robustos y complejos. En el análisis de bebidas de café por HS-SPME, la fibra de PDMS/DVB obtuvo la mejor sensibilidad, en especial para moléculas como guayacol, 4-etilguayacol y 4-vinilguayacol (6). Con ésta también se ha logrado obtener mayor porcentaje de recuperación de áreas para compuestos impacto *in situ* de café molido (7).

La extracción de compuestos volátiles se ve favorecida por un aumento en la temperatura y tiempo de extracción. Los trabajos publicados sobre aroma de café reportan la optimización de la temperatura y tiempo de extracción, pero ninguno considera la interacción que pueden llegar a presentar estos dos factores. El diseño de superficie de respuesta es una herramienta estadística que nos permite evaluar y optimizar los factores al igual que sus interacciones y proporciona una respuesta óptima (8-12).

El objetivo del trabajo fue establecer una metodología versátil, rápida y económica, basada en la microextracción en fase sólida, que permita evaluar extractos de café colombiano obtenidos por SFE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó una muestra comercial de café colombiano en grano con grado de tostado medio, que fue molida por 30 s en un molino de laboratorio hasta un tamaño de partícula de 0,42 a 0,50 mm. Se elaboraron extractos de café en un equipo de SFE a escala de laboratorio. Los extractos fueron recolectados sobre 1 mL de propilenglicol, a partir de 4 g de café molido extraído a 21 MPa y 70 °C con dióxido de carbono.

Para el análisis por HS-SPME se pesaron 0,5 g del extracto en un vial de 15 mL con tapa de rosca y membrana de silicona (protegida con capa de teflón), se adicionaron 0,8 g de NaCl (J.T. Baker, México) y 8 mL de agua Milli-Q. La extracción se hizo con una fibra de PDMS/DVB. Se optimizaron la temperatura y tiempo de extracción, bajo agitación constante (360 min⁻¹) y 20 min de pre-extracción. La fibra fue desorbida térmicamente en el puerto de inyección del GC por 4 min a 250 °C.

El análisis por GC se realizó en un equipo Hewlett-Packard series 6890 acoplado a un detector selectivo de masas HP 5973. La inyección se hizo a modo *splitless* con un tiempo de 4 min. Se utilizó una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) y helio como gas de arrastre a un flujo de 0,9 mL/min. El programa de temperatura fue de 4 min a 50 °C, rampa hasta 250 °C con velocidad de 4 °C/min e isotérmico final por 10 min. Los espectros de masas fueron adquiridos por ionización electrónica a 70 eV en un rango *m/z* de 35 a 400 uma.

La Tabla 1 muestra que la optimización de la técnica de HS-SPME se realizó por la técnica de superficie de respuesta. En cada caso se definió un modelo cuadrático con tres niveles para cada una de las variables (modelo 3²). Las variables de respuesta fueron el logaritmo en base 10 del área total del cromatograma y el número total de picos cromatográficos. Se utilizó el programa Design-Expert ver. 5.0.7 (STAT-EASE Inc., 1996, Minneapolis, EE.UU.).

Tabla 1. Variables empleadas en el diseño de superficie de respuesta

Símbolo	Variable independiente	Niveles codificados		
		-1	0	+1
X ₁	Temperatura (°C)	40	50	60
X ₂	Tiempo (min)	5	15	25

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 refleja que se seleccionó un modelo factorial 3^2 (dos factores y tres niveles: temperatura (X_1) y tiempo de extracción (X_2), que llevó 13 experimentos con cinco réplicas en el centro del modelo. Se seleccionó una fibra PDMS/DVB pues estudios previos en el aroma de café reportaron que tiene mejor sensibilidad (6) y mejores porcentajes de recuperación de áreas para compuestos de impacto (7, 13). Esta es una fibra que se emplea para extraer compuestos medianamente polares y de bajo peso molecular, característicos del aroma de café tostado. Se adicionó sal común para incrementar la concentración de los analitos en la fase vapor (HS).

La reproducibilidad y sensibilidad de los compuestos volátiles en el HS determinados por SPME está influenciada considerablemente por la presión de vapor de los compuestos. A su vez, el tiempo y la temperatura de extracción son dos de los factores que más afectan la presión de vapor y el equilibrio del sistema. El rango de temperatura seleccionado para el diseño de superficie de respuesta fue de 40 a 60 °C. Se fijó de acuerdo a los resultados de la literatura (14, 15) donde se encontró un valor óptimo de 40 °C para café tostado; otros estudios (16-18) reportaron un óptimo a 60 °C.

Sin embargo, se reportó que a 60 °C disminuyó el área de los picos cromatográficos (14). El rango de tiempo se seleccionó por dos razones fundamentales: (I) se ha reportado una extracción óptima a 15 min y 60 °C (18). Sin embargo, (II) se ha encontrado que después de 5 min de extracción a 60 °C, el área de los picos cromatográficos disminuyó considerablemente (14). El tiempo de equilibrio seleccionado fue de 20 min.

La Fig. 1 muestra la superficie de respuesta para el diseño evaluado. Se encontró una respuesta máxima para el log del área total a 9,589 (Fig. 1a) y 187 picos cromatográficos (Fig. 2b) en los rangos de: (I) 56 a 60 °C; 18 a 25 min, y (II) 53 a 60 °C; 16 a 25 min, respectivamente. En estas zonas se obtuvieron valores con 95 % de confianza para la función de conveniencia (*desirability function*).

Al aumentar la temperatura y tiempo de extracción (Fig. 1) se observa que la respuesta aumentó, debido a que la presión de vapor de los analitos se incrementó y por lo tanto su concentración en el HS. Sin embargo, aumentar demasiado la temperatura desfavorece la extracción debido a que la adsorción sobre la fibra es un proceso exotérmico. No se estudió un tiempo de extracción mayor a 25 min, pues es práctico que el tiempo total (49 min) para efectuar la SPME sea menor que el tiempo total de la corrida cromatográfica (55 min).

Tabla 2. Optimización HS-SPME-GC

N° experimento	X_1	X_2	Área total (\log_{10})	No. picos
1	-1	-1	9,03	137
2	-1	0	9,36	169
3	0	0	9,39	169
4	0	+1	9,46	181
5	0	-1	9,12	154
6	0	0	9,33	153
7	-1	+1	9,35	170
8	0	0	9,39	172
9	+1	0	9,47	185
10	0	0	9,39	171
11	+1	-1	9,17	152
12	+1	+1	9,60	184
13	0	0	9,36	161

* Desviación estándar de la respuesta.

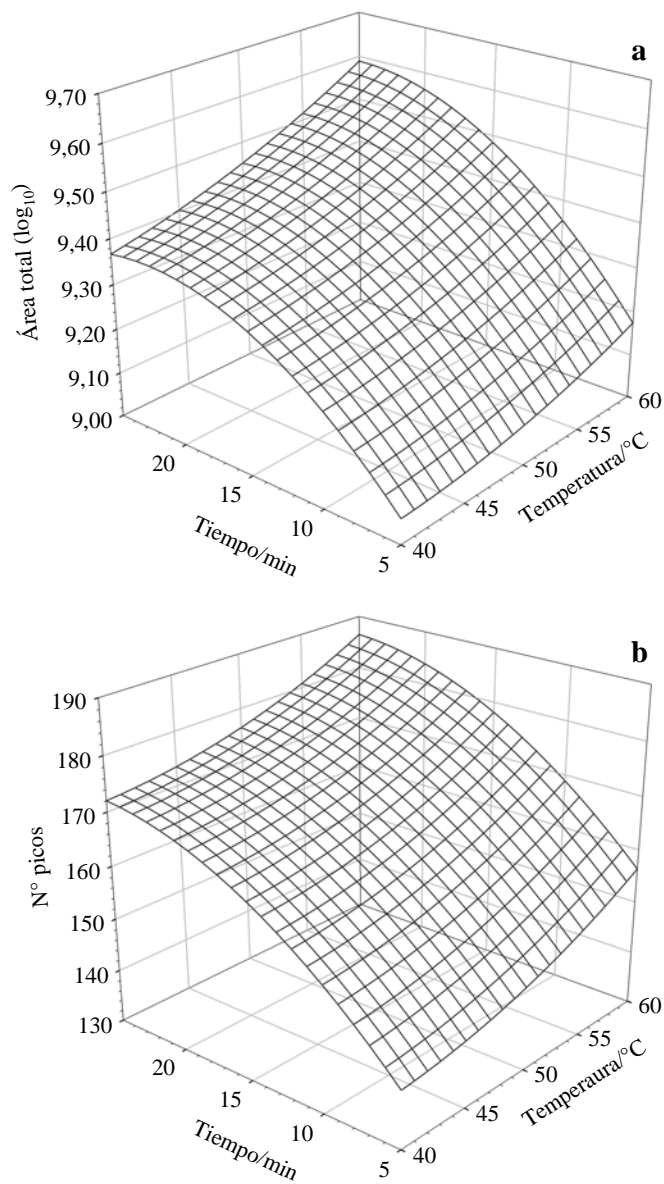


Fig. 1. Superficie de respuesta para el efecto de temperatura y tiempo de extracción SPME. (a) área total, (b) número de picos cromatográficos.

La Tabla 3 presenta que el análisis de varianza para los modelos de regresión cuadrática demuestra que el valor del estadístico *Fischer* (*F*) del modelo fue mayor que el valor *F* teórico; por lo tanto se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que los modelos y las diferencias fueron significativas. La Tabla 3 refleja que la probabilidad de (*P*) que los modelos cuadráticos no expliquen satisfactoriamente las interacciones de las variables es muy bajo a un nivel de 0,05. No obstante, el modelo de la Fig. 1a (respuesta: \log_{10} del área total) fue más significativo que el de Fig. 1b (respuesta: número de picos cromatográficos), pues el valor de la *P* del primer modelo fue menor respecto al segundo modelo.

A partir de las respuestas obtenidas para la optimización de la SPME (Tabla 2) se obtuvo un modelo polinomial de segundo orden:

$$Y = B_0 + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + B_{11} \cdot X_1^2 + B_{22} \cdot X_2^2 + B_{12} \cdot X_1 \cdot X_2$$

donde, *Y* representa la respuesta de los modelos (log área y número de picos cromatográficos), B_0 , B_1 , B_2 , B_{11} , B_{22} y B_{12} son constantes y coeficientes de la regresión del modelo, X_1 y X_2 , son las variables independientes codificadas (Tabla 1).

El cuadrado del tiempo de extracción (X_2^2), para el modelo del área total (Fig. 1a), fue una variable significativa que afectó la respuesta. La Tabla 4 muestra que los valores negativos de X_2^2 para los modelos indican que una disminución en el tiempo de extracción aumentó la respuesta del modelo. Sin embargo, para el modelo del número de picos cromatográficos (Fig. 1b) la variable resultó ser no significativa. Las variables temperatura y tiempo de extracción (X_1 y X_2) dieron significativas para los modelos de la Fig. 2. Un incremento en la temperatura de la muestra aumentó la concentración de volátiles en el HS. No obstante, la SPME involucra un proceso exotérmico y la extracción de los analitos decrece con el aumento de la temperatura. En la Fig. 1 se aprecia un incremento en la respuesta, lo que puede ser debido a un incremento en los compuestos menos volátiles en el HS que se puede compensar por la disminución en la adsorción inducido por la alta temperatura.

Tabla 3. ANOVA para el modelo cuadrático HS-SPME-GC

Fuente de variación	Suma de cuadrados		Grados de libertad		Valor <i>F</i>		<i>P</i> > <i>F</i>	
	Área total	No. picos	Área total	No. picos	Área total	No. picos	Área total	No. picos
Modelo	0,27	1 871	5	5	55,64	5,15	< 0,0001	0,0267
Residuos (error)	0,0069	509	7	7	-	-	-	-
Error puro	0,0031	261	4	4	-	-	-	-
Total	0,28	2 380	12	12	-	-	-	-

Tabla 4. Resultados del diseño de superficie de respuesta para HS-SPME-GC

Factor	Coeficiente estimado		Desviación estándar		<i>t</i> †		<i>P</i> †	
	Área total	No. picos	Área total	No. picos	Área total	No. picos	Área total	No. picos
Intercepto	9,37	167,76	0,013	3,54	-	-	-	-
X_1-temperatura	0,085	7,50	0,013	3,48	6,64	2,15	0,0003	0,0682
X_2-tiempo	0,18	15,33	0,013	3,48	14,17	4,40	<0,0001	0,0031
X_1^2	0,025	2,84	0,019	5,13	1,31	0,55	0,2307	0,5965
X_2^2	-0,10	-6,66	0,019	5,13	-5,46	-1,30	0,0009	0,2357
$X_1 \cdot X_2$	0,026	-0,25	0,016	4,26	1,66	-0,059	0,1403	0,9549

† valor *t* de Student; † probabilidad.

Asumiendo los coeficientes significativos del modelo de regresión múltiple, se obtuvieron las siguientes ecuaciones descodificadas:

$$Y_1 = 9,26 - 0,020 \cdot X_1 + 0,036 \cdot X_2 - 1,031E-03 \cdot X_2^2$$

$$Y_2 = 167,76 + 7,50 \cdot X_1 + 15,33 \cdot X_2$$

donde, Y_1 representa \log_{10} del área total y Y_2 el número de picos cromatográficos.

La Fig. 2 refleja que la precisión del ajuste de los modelos fue evaluada por la determinación del coeficiente ajustado de determinación R^2 . Para el \log_{10} área total (Fig. 2a) se encontró que R^2 fue de 0,975 y 0,786 para el número picos cromatográficos (Fig. 2b), lo que indica que el modelo ajustado explica 98 y 79 % de la variabilidad en la respuesta, respectivamente. Por lo tanto, el ajuste del \log_{10} área total representó un mayor ajuste estadísticamente significativo entre las respuestas predichas y experimentales, con respecto al número picos cromatográficos.

La Tabla 5 presenta que los valores de t y F se emplearon para evaluar la linealidad (Fig. 2.). (I) El intercepto de los modelos no fue diferente de cero con una diferencia significativa de 0,05; (II) la pendiente evaluada demostró que fue significativamente diferente de cero a un nivel de 0,05; (III) no hubo desvío significativo de la linealidad entre los valores de las respuestas predichas y obtenidas experimentalmente. Se comprobó que la falta de ajuste fue no significativa y que el modelo explica satisfactoriamente las interacciones significativas entre temperatura y tiempo de extracción para SPME.

No se encontró una regresión significativa ($F_{\text{regresión}} < F_{1,4}$) entre los valores predichos y experimentales con una probabilidad $P > 0,05$ (Fig. 2). Se demostró que existe correlación entre los valores predichos y los obtenidos experimentalmente a un nivel de confianza de 0,05.

La suficiencia del modelo de regresión y las suposiciones del mismo se estudiaron a partir de un análisis residual. Se pudo apreciar que los residuos no tuvieron relación con los valores predichos, pues no se observó ninguna tendencia de los datos. En general, los modelos propuestos fueron adecuados y no existieron factores no considerados. Además se pudo apreciar: (I) distribución uniforme de todos los puntos; (II) no hubo ningún dato fuera del límite de advertencia; (III) no hubo más de cuatro datos seguidos y (IV) no hubo una tendencia al aumento o disminución de los residuos. No existió ningún tipo de tendencia, por tanto, el error es una variable aleatoria independiente y la respuesta se puede explicar satisfactoriamente por los modelos propuestos.

Se seleccionaron 60 °C y 25 min como temperatura y tiempo de extracción para realizar el análisis por HS-SPME con fibra de PDMS/DVB.

Tabla 5. ANOVA respuesta predicha en función de respuesta observada para HS-SPME-GC

Fuente de variación	Suma de cuadrados		Grados de libertad		Valor F		Valor t	
	Área total	No. picos	Área total	No. picos	Área total	No. picos	Área total	No. picos
Regresión	0,27	1470,94	1	1	0,003013	0,01789	106,46	10,97
Residual (error)	0,0067	400,14	11	11	-	-	-	-
Linealidad	-354,27	-328 969,59	7	7	-0,5714	-0,5707	0,5259	1,72 ‡
Error puro	-	-	-	-	-	-	20,90	6,36 †
	354,28	328 969,73	4	4	-	-	-	-

‡ valor t intercepto; † valor t pendiente.

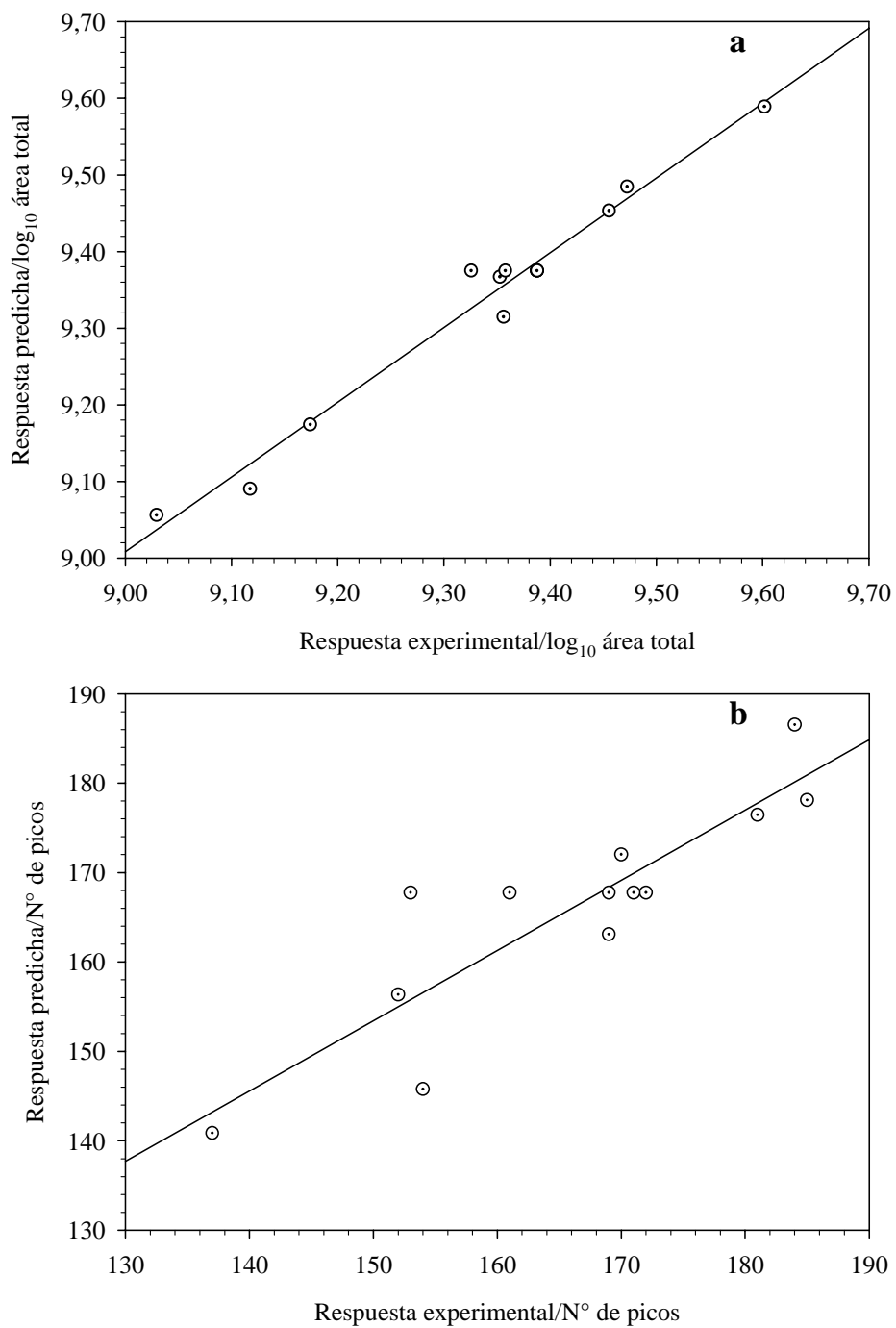


Fig. 2. Respuesta predicha en función de la respuesta obtenida experimentalmente para evaluar la linealidad por ANOVA. (a) área total, (b) número de picos cromatográficos.

CONCLUSIONES

La temperatura y tiempo de extracción resultaron significativas, mientras que la interacción entre estos dos factores resultó no ser significativa para los modelos. Se seleccionaron 60 °C y 25 min como temperatura y tiempo de extracción óptimos para realizar la técnica de HS-SPME con fibras de PDMS/DVB.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las Facultades de Ciencias de la Universidad Nacional y Universidad de los Andes por el apoyo financiero para poder realizar este trabajo.

REFERENCIAS

1. Belitz, H.-D.; Grosch, W. y Schieberle, P. Food Chemistry. Germany, Springer, 3rd ed., 2004, pp. 939-951.
2. Jimenez, J. y Liou, R. US Patent 5736182. Aroma concentration process, 1998.
3. Furrer, M. y Gretsche, C.; US Patent 6445093. Coffee aroma recovery process and resultant products, 2002.
4. Sarrazin, C.; Le Quére, J.; Gretsche, C. y Liardon, R. Food Chem. 70:99-106, 2000.
5. Ramos, E.; Valero, E.; Ibanez, E.; Reglero, G. y Tabera, J. J. Agr. Food Chem. 46:4011-4016, 1998.
6. Roberts, D.; Pollien, P. y Milo, C. J. Agr. Food Chem. 48:2430-2437, 2000.
7. Akiyama, M.; Murakami, K.; Ohtani, N.; Iwatsuki, K.; Sotoyama, K.; Wada, A.; Tokuno, K.; Iwabuchi, H. y Tanaka, K. J. Agr. Food Chem. 51:1961-1969, 2003.
8. Liu, T. y Yang, T. J. Agr. Food Chem. 50:653-657, 2002.
9. Diaz, P.; Señoráns, F.; Reglero, G. e Ibanez, E. J. Agr. Food Chem. 50:6468-6472, 2002.
10. Pellati, F.; Benvenuti, S.; Yoshizaki, F.; Bertelli, D. y Rossi, M. C. J. Chrom. A 1087 (1-2):265-273, 2005.
11. Sousa, E.; de M. Rodrigues, F.; Martins, C.; de Oliveira, F.; de P. Pereira, P. y de Andrade, J. Microchem. J. 82 (2):142-149, 2006.
12. Carasek, E. y Pawliszyn, J. J. Agr. Food Chem. 54:8688-8696, 2006.
13. Akiyama, M.; Murakami, K.; Ikeda, M.; Iwatsuki, K.; Kokubo, S.; Wada, A.; Tokuno, K.; Onishi, M.; Iwabuchi, H. y Tanaka, K. Food. Sci. Tech. Res. 11 (3):298-307, 2005.
14. González-Ríos, O.; Suárez-Quiroz, M.; Boulanger, R.; Barel, M.; Guyot, B.; Guiraud, J.-P. y Schorr-Galindo, S. J. Food Compos. Anal. 20 (3-4):297-307, 2007.
15. Baggenstoss, J.; Poisson, L.; Luethi, R.; Perren, R. y Escher, F. J. Agr. Food Chem. 55:6685-6691, 2007.
16. Ryan, D.; Shellie, R.; Tranchida, P.; Casilli, A.; Mondello, L. y Marriott, P. J. Chrom. A 1054 (1-2):57-65, 2004.
17. Maeztu, L.; Sanz, C.; Andueza, S.; Paz de Pena, M.; Bello, J. y Cid, C. J. Agr. Food Chem. 49:5437-5444, 2001.
18. Lopez-Galilea, I.; Fournier, N.; Cid, C. y Guichard, E. J. Agr. Food Chem. 54:8560-8566, 2006.