



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

---

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

EFFECTO DEL PROCESO DE TOSTADO SOBRE LAS  
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS  
FITOQUÍMICOS PRESENTES EN LOS GRANOS DE  
CAFÉ VARIEDADES *Coffea arabica* Y *Coffea robusta*.

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

Presenta:

LUCIA MARGARITA PEREZ HERNANDEZ

Hermosillo Sonora, México

18 de Enero de 2013

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EFECTO DEL PROCESO DE TOSTADO SOBRE LAS  
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS FITOQUÍMICOS  
PRESENTES EN LOS GRANOS DE CAFÉ VARIEDADES

*Coffea arabica Y Coffea robusta*

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

LUCÍA MARGARITA PÉREZ HERNÁNDEZ

Hermsillo, Sonora

Enero 2013

**EFFECTO DEL PROCESO DE TOSTADO SOBRE LAS  
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS FITOQUÍMICOS  
PRESENTES EN LOS GRANOS DE CAFÉ VARIEDADES**

*Coffea arabica Y Coffea robusta*

**TESIS**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN BIOCENCIAS**

Presenta:

**LUCÍA MARGARITA PÉREZ HERNÁNDEZ**

## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada, Efecto del proceso de tostado sobre las propiedades antioxidantes de los fitoquímicos presentes en los granos de café variedades *Coffea arabica* y *Coffea robusta* presentada por Q.B. Lucía Margarita Pérez Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



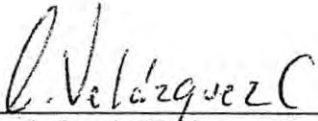
---

Dra. Nohemí Gámez Meza  
Director de tesis



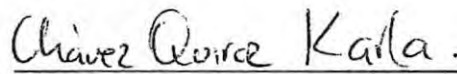
---

Dr. Luis Ángel Medina Juárez  
Co-director de tesis



---

Dr. Carlos A. Velázquez Contreras  
Sinodal



---

M.C. Karla D. Chávez Quiroz  
Sinodal externo

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser la fuerza con que comienzo mis días, gracias por darme una familia, salud, por regalarme la valiosa oportunidad de estudiar y trabajar en lo que me gusta, por todo lo que me ha dado, por no dejarme sola ni un solo momento.

A mis padres por el apoyo que me han brindado siempre, por darme la libertad de escoger el camino que desee seguir, estoy muy orgullosa de tener unos padres que me han enseñado a luchar por mis sueños.

A todos mis familiares, mi abuela, mi hermano, mis tíos, mis primos, que a pesar de que no viven conmigo, siempre me han apoyado y mandado buenas vibras, motivándome siempre a salir adelante.

A mis verdaderos amigos, que siempre han estado a mi lado, animándome con su ejemplo de honestidad y trabajo para poder lograr mi superación.

Muchas gracias a todos los que de alguna manera, directa o indirecta, han influido en mí siempre.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. Nohemí Gámez Meza, por haberme aceptado como alumna, por haber confiado en mí, por su tiempo, por tanta paciencia. Por haberme apoyado y guiado tan satisfactoriamente durante la realización del presente trabajo y sobre todo por hacerme ver que con trabajo y dedicación se puede llegar más lejos de lo que uno puede imaginar. Sin su ayuda habría sido imposible la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Ángel Medina Juárez, por haber hecho todo lo posible por darnos lo necesario para poder desarrollar nuestro trabajo, por su tiempo y disposición, por su importante aportación a éste proyecto, ya que gracias a su interés por mejorar este trabajo, se decidió realizar por primera vez en la Universidad de Sonora la prueba de CAA.

Al Dr. Carlos Velázquez Contreras, por su importante aportación para el desarrollo de la parte biológica de este trabajo. Por haberme enseñado mucho no solo en cuestión académica y trabajo de laboratorio, sino por ayudarme a confiar en mi misma y hacerme ver que puedo lograr lo que quiera, siempre y cuando me lo proponga.

A la M.C. Karla Chávez Quiroz, por haber aportado las muestras de café para este estudio, por su disposición, su tiempo y por habernos ayudado aportando sus amplios conocimientos acerca del café mexicano.

A la maestra Lucila, por su apoyo, por alegrarnos el día con su personalidad, por animarnos los días y por sus consejos.

A la maestra Judith, por su ayuda en el laboratorio, por su paciencia al enseñarme cosas que eran nuevas para mí y por su tiempo.

A Dulce y Claudia, por haberme apoyado en la parte inicial de mis experimentos, por haberme enseñado a trabajar con las técnicas de análisis químicos, y sobre todo por motivarme a ser ordenada en el laboratorio.

A la Dra. Dorita Valencia, por su paciencia, por su tiempo, por su amistad, por sus consejos y enseñanzas en el laboratorio y por el apoyo moral que me brindó.

A Paola y Jael, por haberme ayudado y apoyado cuando recién me integré al laboratorio en Q.B., gracias por sus enseñanzas.

A todos mis compañeros, tanto del DICTUS como de Q.B., por brindarme su ayuda y amistad, por estar a mi lado en las malas y en las buenas, por hacerme reír y por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio. Ustedes siempre fueron una parte vital de esa motivación que sentía en las mañanas antes de ir al laboratorio.



## RESUMEN

Durante el tostado, ciertos compuestos con actividad antioxidante (fenoles) se pueden degradar, sin embargo, otros se pueden formar (melanoidinas). En el presente trabajo, se evaluaron dos cafés procesados de granos Arábica (tueste italiano y francés), un café caracolillo de grano Arábica (caracol) y un café soluble de grano Robusta. Los fenoles fueron identificados, cuantificados y correlacionados con la actividad antioxidante determinada por ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Las melanoidinas fueron determinadas para todas las muestras. Se llevó a cabo una cinética de la actividad antioxidante en células del extracto de café caracolillo y del café soluble en la línea celular C3F.6 (linfocitos B). Para los granos Arabica y sus productos, los resultados sugieren que el tostado disminuye la actividad antioxidante. En el caso del café caracolillo, no se presentaron diferencias en la actividad antioxidante química con su grano verde de origen (Caracol). Por otro lado, el café instantáneo mostró una actividad antioxidante química mayor que los granos verdes (Robusta). Tanto el café caracolillo, como el soluble, mostraron ejercer actividad antioxidante en células C3F.6, lo cual indica que el café puede ser beneficioso para la salud.

## ABSTARCT

During roasting, some components with antioxidant activity are lost (phenols), yet others are formed (melanoidins). Two processes Arabica coffees (french and italian), caracolillo coffee from Arabica coffee (Caracol) and instant coffee from Robusta coffee beans, were evaluated. Phenols were identified, quantified and correlated with antioxidant activity determined by the ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) and DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl radical) assays. Melanoidins (Maillard reaction products) were determined for green and processed coffee. A kinetic evaluation of the cellular antioxidant assay was performed for caracolillo and instant coffee extracts, using C3F.6 cells (lymphocytes). For green Arabica beans and its products, results suggest that roasting decreases antioxidant activity. No significant differences were observed between the antioxidant activity of caracolillo coffee and Caracol coffee. Instant coffee showed greater antioxidant activity than green Robusta beans by both chemical assays. Caracolillo and instant coffee extracts, exhibited antioxidant activity in cells, which might imply that coffee consumption could present beneficial health effects.

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
<b>1.1 Generalidades del Café</b>	3
1.1.1 Producción mundial y nacional del café	4
1.1.2 Compuestos fenólicos presentes en las bebida de café	5
<b>1.2 Estrés oxidativo y antioxidantes biológicos</b>	7
1.2.1 Estrés oxidativo	7
1.2.2. Mecanismo antioxidante en los seres vivos	13
<b>1.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante</b>	17
1.3.1 Métodos químicos	19
1.3.1.1 Método por el Radical ABTS•+	20
1.3.1.2 Método por el radical DPPH•	21

1.3.2 Métodos biológicos	22
1.3.2.1 Método de la determinación de la actividad antioxidante en células (CAA)	23
1.3.2.2 Citometría de flujo	24
<b>1.4 Proceso de Elaboración del Café</b>	<b>26</b>
1.4.1 Efecto del proceso sobre la actividad antioxidante de la bebida de café	28
1.4.1.1 Reacción de Maillard	29
<b>II. HIPOTESIS</b>	<b>32</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo General	33
3.2 Objetivos Específicos	33
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1 Materia Prima	34
4.2 Preparación de la Muestra	34
4.3 Extracción de los Compuestos Fenólicos	34
4.4 Cuantificación de Fenoles Totales	35
4.5 Cuantificación de Flavonoides totales	36
4.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC	36
4.7 Cuantificación de Melanoidinas	38
4.8 Métodos Químicos para Evaluar la Actividad Antioxidante	40
4.8.1 Método por el radical ABTS	40
4.8.2 Método por el radical DPPH	41

<b>4.9 Método Biológico para Evaluar la Actividad Antioxidante</b>	42
4.9.1 Estandarización de la técnica de la determinación de la actividad antioxidante en células	42
4.9.2 Actividad antioxidante en células C3F.6	44
<b>4.10 Análisis Estadístico</b>	46
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	47
<b>5.1 Fenoles Totales</b>	47
<b>5.2 Flavonoides Totales</b>	50
<b>5.3 Contenido de Fenoles por HPLC</b>	52
<b>5.4 Contenido de Melanoidinas</b>	55
<b>5.5 Métodos Químicos para Evaluar la Actividad Antioxidante</b>	57
5.5.1 Método por el radical ABTS <sup>•+</sup>	57
5.5.2 Método por el radical DPPH <sup>•</sup>	59
<b>5.6 Método Biológico para Evaluar la Actividad Antioxidante</b>	60
5.6.1 Estandarización de la técnica de actividad antioxidante celular	60
5.6.2 Actividad antioxidante en células de extractos de café	68
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	71
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	72
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	73
<b>IX. ANEXOS</b>	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Ácidos fenólicos presentes en el café	6
2	Producción de ROS en la mitocondria	10
3	Mecanismo de acción del sistema glutatión peroxidasa	16
4	Esquema general de un citómetro de flujo	25
5	Esquema general de la reacción de Maillard	30
6	Fundamento de la determinación de flavonoides totales	37
7	Metodología de la técnica de la evaluación de melanoidinas en las muestras de café	39
8	Mecanismo de acción de la determinación de CAA	43
9	Metodología de la técnica de la evaluación de la actividad antioxidante en células (CAA)	45
10	Fenoles totales de granos verdes de <i>Coffea arabica</i> (Arábica y Caracol) y <i>Coffea canephora</i> y cafés procesados	48
11	Flavonoides totales de granos verdes de <i>Coffea arabica</i> (Arábica y Caracol) y <i>Coffea canephora</i> y cafés procesados	51
12	Cromatograma de café verde ( <i>Coffea arabica</i> ) a 280 nm	53
13	Contenido de melanoidinas para los granos de café verde <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora</i> y cafés procesados	56
14	Valores de ABTS <sup>+</sup> para granos de café verde <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora</i> y cafés procesados	58

15	Valores de DPPH* para granos de café verde <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora</i> y cafés procesados	61
16	Curva de DCFH-DA	63
17	Cinética con DCFH-DA	64
18	Curva de C3F.6 incubadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 15 min	65
19	Curva de C3F.6 incubadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 30 min	66
20	Curva de C3F.6 incubadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 60 min	67
21	Cinética de 0.5 a 24 h de incubación con dimetilsulfóxido (DMSO), ácido cafeico, café soluble y café caracolillo	70

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Cuantificación de compuestos fenólicos y cafeína encontrados en las muestras de café (mg/g)	54



## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1	Curva de calibración de melanoidinas a 420 nm	86
2	Conversión de DCFH-DA al producto fluorescente DCF	87
3	Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 0.5 h	88
4	Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 1h	89
5	Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 3 h	90
6	Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 6 h	91
7	Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 12 h	92
8	Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 24 h	93

## INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas y populares en todo el mundo. Estudios recientes indican que algunos constituyentes del café, como la cafeína, los ácidos fenólicos (derivados del ácido clorogénico), los compuestos formados durante la reacción de Maillard (melanoidinas) y ligninas, poseen propiedades antioxidantes. (Yanagimoto *et al.*, 2004; Fujioka y Shibamoto, 2006; van Dam, 2006; Votavova *et al.*, 2009). Los antioxidantes evitan que se produzcan daños tisulares por radicales libres, actuando al reducir su formación o eliminarlos una vez originados. De esta forma, se pueden reducir las enfermedades asociadas al estrés oxidativo como la diabetes, la neurodegeneración, las enfermedades hepáticas, cardiovasculares y cáncer (Penckofer *et al.*, 2002; Gandhi y Wood, 2005; Albano, 2006; Butterfield *et al.*, 2006; Davidson y Duchon, 2007; Hwang y Bowen, 2007). En individuos adultos, las bebidas derivadas del café, constituyen el 64% de la ingesta total de antioxidantes. A pesar de que existen otros alimentos con una cantidad mayor de antioxidantes que el café, la frecuencia y volumen del consumo del mismo, lo convierten en la fuente dietaria principal de antioxidantes (Pulido *et al.*, 2003; Svilaas *et al.*, 2004).

El tostado afecta marcadamente la composición del café. Los cambios de la actividad antioxidante del café durante el tostado se asocian con la degradación de ácido clorogénico y otros compuestos fenólicos. Algunos autores atribuyen la actividad antioxidante del café tostado a los productos de la reacción de Maillard, como las melanoidinas (Nebesny, y

Budryn, 2009). Las melanoidinas son compuestos poliméricos de color café formados durante la última etapa de dicha reacción. Éstas influyen en el color, sabor y textura de los alimentos sometidos a temperaturas altas. Algunas actividades biológicas importantes de las melanoidinas son la actividad antioxidante y secuestrante, la actividad antimicrobiana y la actividad antihipertensiva (Tagliazucchi *et. al.*, 2010).

Las dos especies de café más importantes mundialmente son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (sinónimo *Coffea robusta*) ([www.ico.org](http://www.ico.org), 2011). Estas dos variedades no solo se procesan en el Estado de Sonora, sino que se consumen regionalmente, y comercializan en la república mexicana. El café soluble de *Coffea robusta* se exporta a Holanda. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de compuestos antioxidantes y la actividad antioxidante (por métodos químicos y biológicos) de bebidas de café procesado en el Estado de Sonora.

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades del Café

La palabra “café” probablemente se deriva del antiguo reino de Kaffa (hoy Etiopía), donde el café (*Coffea* sp.) fue cultivado por primera vez entre el siglo V y el VIII d.C. Desde el legendario origen de las tierras altas de Etiopía, la bebida fue introducida al mundo árabe a través de Egipto y el Yemen, donde se convirtió en una bebida ampliamente consumida debido a que las bebidas alcohólicas no se permiten en esos países. En Yemen, el café se empezó a cultivar comercialmente alrededor del siglo XIV. Fue introducido a Europa a través de Venecia. A pesar de las críticas que inicialmente recibió en Europa por ser una “bebida Musulmana”, su consumo se esparció lentamente en este continente, en América y Asia (Vieira, 2008). El café es uno de los cultivos de mayor importancia en muchos países del mundo como: México, Colombia, Brasil, El Salvador, Nicaragua, entre otros (Blanco *et al.*, 2003).

La planta de café pertenece al género *Coffea*, miembro de la familia *Rubiaceae*. La producción comercial del café se basa en dos especies *Coffea arabica* (Arábica) y *Coffea canephora* (Robusta). Todas las especies dentro del género *Coffea* son de origen tropical africano. En los países centro y sur americanos principalmente crecen los arábigos, mientras que en los países del sureste asiático y los africanos son productores importantes de la variedad Robusta. Los arábigos son nativos de las tierras altas de Etiopía, así como también de

otras partes de África y Arabia en el Asia. Se cultiva en altitudes medianas y altas que varían entre los 1000 a 2000 m sobre el nivel del mar en regiones ecuatoriales y entre 400 a 1200 m en regiones lejanas al Ecuador (9 – 240 de latitud N y S), donde las temperaturas diarias promedio fluctúan entre los 18 – 22°C (Anzueto *et al.*, 2005).

La información en la literatura acerca del café Caracol es escasa. Las plantas de café, tienen un fruto en forma de cereza. Típicamente, se desarrollan dos granos de café dentro de cada cereza. Sin embargo, en ocasiones se forma solamente un grano por cada cereza. Dicho grano se conoce como café Caracol. Los granos de café Caracol son más pequeños en tamaño que los granos de café típicos. Debido a que se forma sólo un grano y no dos, se dice que este tipo de café tiene un sabor más fuerte y ácido que los cafés Arábica regulares. Los granos de café Caracol son raros en la naturaleza y representan sólo el 5% de los granos cosechados ([www.worldtradercoffee.com](http://www.worldtradercoffee.com)).

#### 1.1.1 Producción mundial y nacional del café

La producción mundial de café en el año 2011 fue de más de 130 millones de sacos. Hasta este año, Brasil era el mayor productor de café en el mundo, ya que se produjeron más de 43 millones de sacos de café de las dos especies comercialmente importantes, es decir, *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Sin. *Coffea robusta*) ([www.ico.org.mx](http://www.ico.org.mx)).

Actualmente, México ocupa el séptimo lugar de la producción mundial de café después de Brasil, Vietnam, Indonesia, Colombia, Etiopía y la India (FAO, 2011). La variedad

genérica que se produce en México es la "arábica" (*Coffea arabica*). Además, México es el primer productor mundial de café orgánico. En México, Chiapas es el productor principal de café, ya que produce el 33% de la producción nacional total de café. Otros Estados productores de importancia son Veracruz (24%), Puebla (19%), Oaxaca (14%), Guerrero (4%), Hidalgo (3%), Nayarit (1%) y San Luis Potosí (1%). Más de la mitad del café que se produce en México está destinado a la exportación, siendo Estados Unidos el principal destino, seguido por Alemania, Bélgica y Japón ([www.cefp.gob.mx](http://www.cefp.gob.mx); [www.aserca.gob.mx](http://www.aserca.gob.mx); [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)).

#### 1.1.2 Compuestos fenólicos presentes en las bebidas de café

Los granos verdes de café son ricos en compuestos fenólicos, tales como el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico (Figura 1) (Richelle *et al.*, 2001). El ácido clorogénico es el antioxidante polifenólico predominante en el café (Johnston *et al.*, 2003; Svilaas *et al.*, 2004). La bebida de café es la fuente más importante de ácido clorogénico en la dieta humana; la ingesta diaria de este ácido por los bebedores de café varía de 0.5 a 1 gramo, mientras que la ingesta diaria de las personas que no consumen café típicamente es < 100 mg/día (Castillo *et al.* 2002).

Los compuestos fenólicos poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos; entre ellos, los fenilpropanoides presentan la estructura básica de los fenoles, más una cadena tricarbonada como grupo lateral (Bhrmental, 1998). Los compuestos fenólicos de

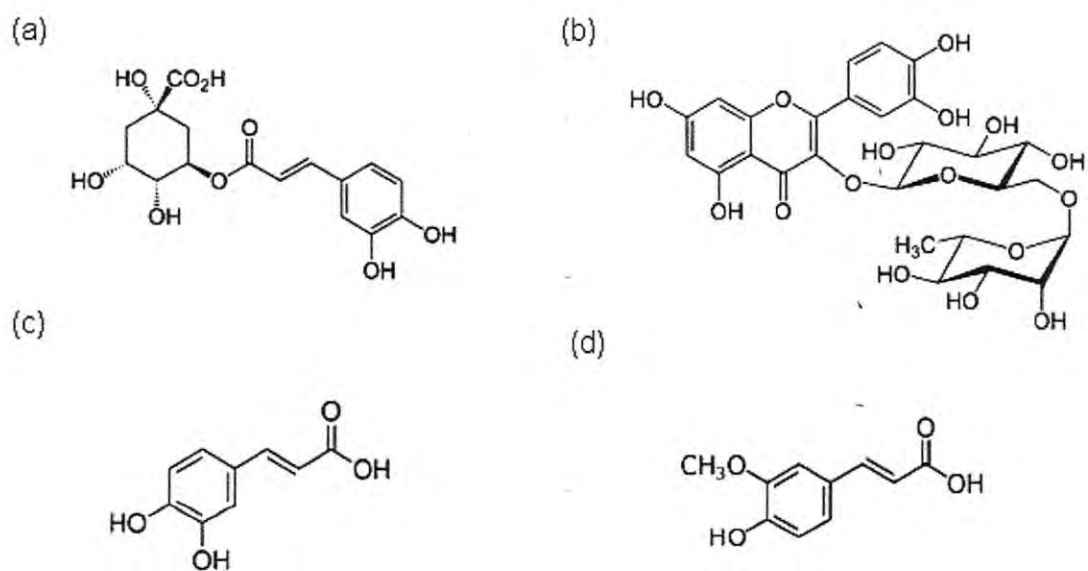


Figura 1. Ácidos fenólicos presentes en el café. (a) ácido clorogénico; (b) rutina; (c) ácido cafeico; (d) ácido ferúlico.

las plantas tienen como propiedades generales las de ser antioxidantes, ejercer efectos y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos, de modo que actúan mayoritariamente en la dieta como elementos que modular la actividad de varios sistemas enzimáticos, de modo que actúan mayoritariamente en la dieta como elementos que promueven salud ante factores químicos y físicos estresantes para el organismo (Gee y Johnson, 2001). La actividad antirradical de los compuestos fenólicos está basada principalmente sobre las propiedades redox de sus grupos hidroxilo y la relación entre las diferentes partes de su estructura química (Rice-Evans *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1997; Burda Y Oleszecz, 2001). Los antioxidantes tienen la capacidad de neutralizar a los radicales libres que son los causantes del estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un factor que puede provocar cáncer y enfermedades cardiovasculares. La actividad de los antioxidantes depende de su estructura química, ya que ella determina que tan fácilmente podrá donar iones  $H^+$  para lograr neutralizar a los radicales libres. Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante de los fitoquímicos presentes en los alimentos de origen vegetal. Las pruebas químicas para la evaluación de la capacidad antioxidante son ampliamente utilizadas para determinar el potencial antioxidante de los productos vegetales y preparaciones nutracéuticas (Blasa *et al.*, 2011).

## 1.2 Estrés Oxidativo y Antioxidantes Biológicos

### 1.2.1 Estrés oxidativo

El oxígeno no es esencial para generar energía; muchos seres vivos (todos ellos procariotas anaerobios) utilizan la glucólisis para cubrir todas sus necesidades energéticas. Sin embargo,

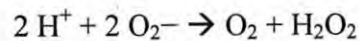


la gran mayoría de los seres vivos utilizan el oxígeno para extraer energía de las moléculas orgánicas. Además de las grandes cantidades de energía que se generan utilizando esta sustancia gaseosa, es de fácil descomposición y se distribuye fácilmente dentro de los organismos. El oxígeno se difunde rápidamente dentro y fuera de las células ya que es soluble en el centro lipídico apolar de las membranas. Sin embargo, las ventajas del uso del oxígeno están ligadas a una propiedad peligrosa que posee. El oxígeno puede aceptar electrones para formar derivados inestables, que se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS). La molécula de oxígeno diatómica es un dirradical. Un radical es un átomo, o un grupo de átomos, que contiene uno o varios electrones no apareados. El dioxígeno es un dirradical debido a que posee dos electrones no apareados. Por ésta y otras razones, el dioxígeno cuando reacciona solo puede aceptar un electrón a la vez (Mckee y Mckee, 2003).

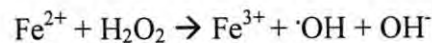
Los ROS son generados constantemente bajo condiciones normales como consecuencia de la respiración. Los electrones inadvertidamente salen de la cadena de transporte de electrones y reaccionan con el  $O_2$  para formar superóxido ( $O_2^-$ ). En presencia de  $Fe^{2+}$ , el superóxido se convierte en El radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El superóxido se convierte también en peróxido de hidrógeno (Figura 2). Los ROS incluyen radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ), varios peróxidos ( $ROOR'$ ), hidroperóxidos ( $ROOH$ ) y por último el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual no es un radical libre. Recuérdese que durante el transporte electrónico mitocondrial se forma  $H_2O$  como consecuencia de la transferencia secuencial de cuatro electrones al  $O_2$ . Durante este proceso se forman varias ROS. La oxidasa del citocromo (y otras proteínas activadoras de oxígeno) atrapa éstos intermediarios reactivos dentro de su sitio activo hasta que se han

transferido los cuatro electrones al oxígeno. A pesar de los múltiples sistemas redox de modulación, cierta cantidad de ROS escapan continuamente de la cadena de transporte de electrones (se cree que aproximadamente 1-2% de electrones “escapan” de la cadena de transporte de electrones) (Eruslanov y Kusmartsev, 2010).

La primera ROS que se forma durante la reducción del oxígeno es el radical superóxido  $O_2^-$ . La mayoría de los radicales superóxidos se producen por electrones que proceden del ciclo Q del complejo III y por la flavoproteína deshidrogenasa de NADH(complejo I). El  $O_2^-$  actúa como nucleófilo y, en circunstancias específicas, como oxidante y como reductor. Debido a sus propiedades de solubilidad, el  $O_2^-$  produce un daño considerable a los componentes fosfolipídicos de las membranas. Cuando se genera en un ambiente acuoso, el  $O_2^-$  reacciona consigo mismo para producir  $O_2$  y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):



Puesto que el  $H_2O_2$  no tiene electrones no apareados, no es un radical. La reactividad limitada del  $H_2O_2$  le permite cruzar las membranas y dispersarse de manera general. La consiguiente reacción del  $H_2O_2$  con  $Fe^{2+}$  (o con otros metales de transición) origina la producción del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), una especie muy reactiva



El radical hidroxilo solo se difunde en una distancia corta antes de reaccionar con cualquier molécula con la que choque. Los radicales como el hidroxilo son especialmente peligrosos debido a que pueden iniciar una reacción autocatalítica de radicales en cadena (peroxidación

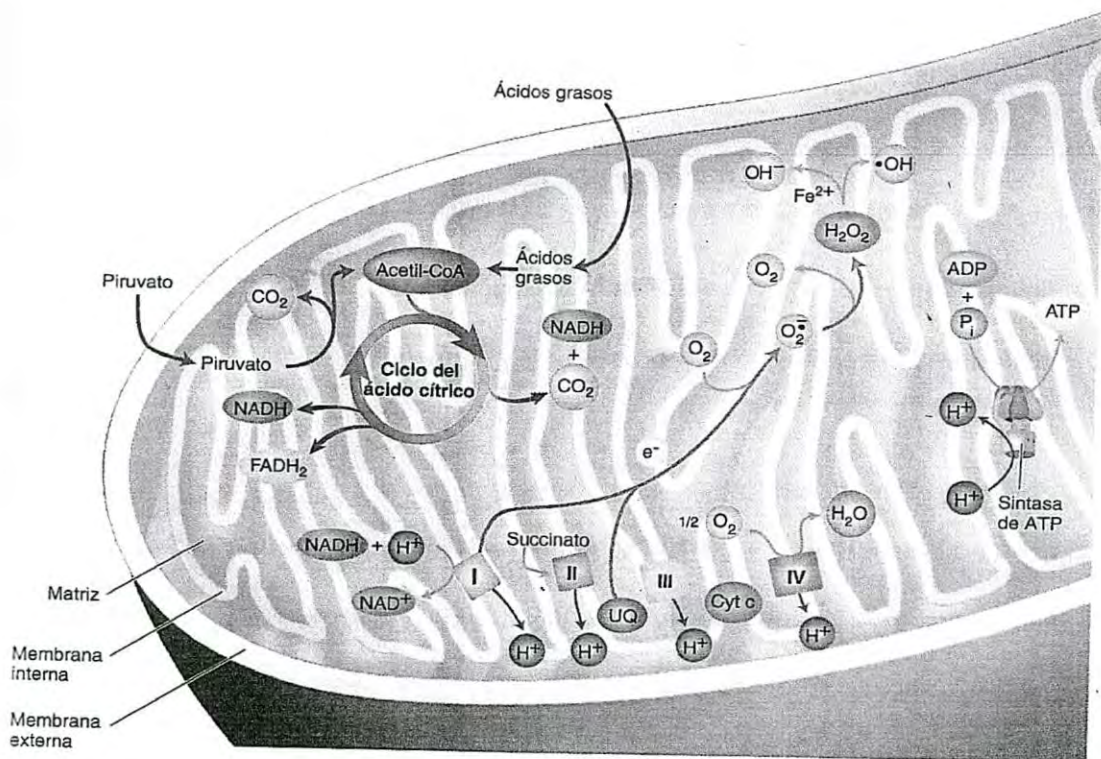
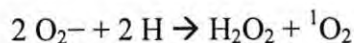
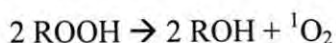


Figura 2. Producción de ROS en la mitocondria (Mckee y Mckee, 2003).

lipídica). El oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), un estado excitado del dioxígeno en el que los electrones apareados se han desapareado, puede formarse a partir de un superóxido:



o a partir de peróxidos:



El oxígeno singlete que se forma en determinadas reacciones del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y durante la captura de luz en la fotosíntesis puede reaccionar con dobles enlaces en biomoléculas. Es especialmente dañino para compuestos aromáticos y para alquenos conjugados.

Las ROS se generan durante varias actividades celulares además de la reducción del  $\text{O}_2$  para formar  $\text{H}_2\text{O}$ . Entre ellas están la biotransformación de los xenobióticos y el estallido respiratorio en los leucocitos. Asimismo, los electrones en ocasiones se escapan de las vías de transporte electrónico del retículo endoplasmático (por ejemplo, el sistema de transporte electrónico del citocromo  $\text{P}_{450}$ ) para formar superóxido mediante su combinación con el  $\text{O}_2$ . Entre las reacciones en que intervienen ROS se incluyen la hidroxilación y la peroxidación. Otras de las reacciones en que intervienen los ROS se incluyen la hidroxilación y la peroxidación. Otra de estas reacciones, la carbonilación, es una modificación proteínica no enzimática que resulta de la oxidación de cadenas laterales de aminoácidos (como Thr, Lys, Arg o Pro) o de la reacción de cadenas laterales de Cys, Lys o His con radicales carbonilo reactivos (Murray *et. al.*, 2003; Nelson *et. al.*, 2006). También existen numerosos radicales que contienen nitrógeno. Debido a que con frecuencia su síntesis está ligada a la de las ROS,

las especies reactivas de nitrógeno (RNS) a menudo se clasifican como ROS. Entre los ejemplos más importantes están el óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) y el peroxinitrilo ( $\text{ONOO}\cdot$ ). El  $\cdot\text{NO}$  es un gas muy reactivo. Entre las funciones fisiológicas en que se piensa que interviene el  $\cdot\text{NO}$  se incluyen la regulación de la presión arterial, la inhibición de la coagulación sanguínea y la destrucción de células extrañas, dañadas o cancerosas por medio de los macrófagos. La pérdida de la precisa regulación normal de la síntesis de  $\cdot\text{NO}$  se ha vinculado con numerosos estados patológicos como la apoplejía, la migraña, la impotencia, el choque séptico y numerosas afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. El  $\cdot\text{NO}$  puede dañar proteínas con grupos sulfhidrilo, como la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato, al convertir grupos SH en derivados nitrosotiol ( $-\text{SNO}$ ). El  $\cdot\text{NO}$  también daña las ferredoxinas. Sin embargo, parte del daño atribuido al  $\cdot\text{NO}$  de hecho es causado por sus productos de oxidación,  $\cdot\text{NO}_2$  ( $2\cdot\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\cdot\text{NO}_2$ ) y peroxinitrito ( $\cdot\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ONOO}\cdot$ ) (Nelson *et. al.*, 2006).

En determinadas condiciones, que en conjunto se denominan agresión oxidativa, los mecanismos antioxidantes se desbordan y puede producirse algún daño. La lesión es consecuencia principalmente de la inactivación enzimática, la despolimerización de polisacáridos, la degradación del DNA y la destrucción de membranas. Entre las circunstancias que pueden producir una lesión oxidativa grave se encuentran determinadas anomalías metabólicas, el consumo excesivo de ciertos fármacos, la exposición a una radiación intensa o el contacto repetido con determinados contaminantes ambientales. Los procesos metabólicos endógenos, especialmente las inflamaciones crónicas, son fuentes importantes de radicales libres. Los radicales libres pueden reaccionar con biomoléculas como

los lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. Si no se logra llevar a cabo la reparación del ADN dañado y la célula mutada obtiene la habilidad de sobrevivir y dividirse en forma aberrante, se puede producir cáncer. Además, debido a que la mitocondria es el sitio de la mayor parte del metabolismo oxidativo de la célula, sus lípidos, DNA y proteínas probablemente sufran el mayor embate del daño relacionado con los radicales. Varias enfermedades degenerativas, incluidas las de Parkinson, Alzheimer y Huntington, están asociadas con el daño oxidativo a las mitocondrias. Esas observaciones condujeron a la teoría del envejecimiento por los radicales libres, que sostiene que las reacciones de los radicales libres que se originan durante el curso del metabolismo oxidativo normal son al menos parcialmente responsables por los procesos de envejecimiento. Los individuos con defectos congénitos en sus DNA mitocondriales sufren una variedad de síntomas típicos de la edad avanzada, incluidas las dificultades neuromotoras, la sordera y la demencia (Mckee y Mckee, 2003; Voet *et al.*, 2007).

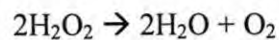
### 1.2.2 Mecanismo antioxidante en los seres vivos

La Tierra tuvo una atmósfera anaerobia durante su primer millardo de años y el oxígeno era muy tóxico para todas las formas de vida que existían en ese tiempo. Con la evolución del oxígeno en nuestra atmosfera, las formas vivas elaboraron defensas, tanto enzimáticas como no enzimáticas contra la agresión oxidativa. La protección no enzimática la proporcionan los compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran el glutatión, las

vitaminas C y E, y el ácido úrico, un producto final del metabolismo de las purinas. Los antioxidantes destruyen los radicales libres oxidantes como  $O_2^-$  y OH. Estos compuestos pueden eliminar las ROS antes de que puedan producir daños, o pueden evitar que se disperse el estrés oxidativo. La vitamina E es una familia de compuestos, de los cuales el más común es el  $\alpha$ -tocoferol, que componen el principal compuesto antioxidante liposoluble que desempeña una función importante en la prevención del daño de las membranas. El  $\beta$ -caroteno y otros compuestos carotenoides relacionados con la vitamina A son antioxidantes liposolubles que también participan en el atrapamiento de radicales libres. El glutatión es abundante dentro de las células y desempeña un cometido particularmente importante en la protección antioxidante celular. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del  $H_2O_2$ . El glutatión (GSH) se convierte a su forma disulfúrica oxidada (GSSG). La glutatión reductasa reduce el GSSG a GSH por medio de una reducción con NADPH. El GSH también dona electrones para reducir los residuos de Cisteína (Cys) oxidados de las enzimas (Figura 3). La vitamina C, o ácido ascórbico, es un antioxidante importante debido a su hidrosolubilidad y su fácil oxidación a ácido deshidroascórbico. En los líquidos extracelulares, las concentraciones de ascorbato son mucho mayores que las de glutatión, y el ascorbato probablemente desempeña el papel predominante en la protección antioxidante extracelular. Los datos más recientes sugieren que el principal cometido antioxidante del ácido úrico está en su capacidad de unirse al peroxinitrato e inactivarlo, además de quelar el radical hidroxilo y el superóxido (McKee y McKee, 2003). El ácido úrico es el antioxidante acuoso más abundante en humanos y contribuye con dos tercios de la actividad antioxidante en el plasma. Además, tiene un papel protector fisiológico ya que previene la peroxidación lipídica (Squadrito *et. al.*, 2000).

Entre los mecanismos enzimáticos, la primera línea de defensa es la superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza una dismutación (una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes). La SOD mitocondrial y bacteriana son tetrameros que contienen Mn; la SOD citosólica de eucariote es un dímero que contiene iones cobre y cinc. La velocidad de degradación no enzimática del superóxido es  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mientras que la velocidad de la reacción catalizada por SOD es  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este aumento de la velocidad, que es cercano al límite de difusión, parece acompañarse por una guía electrostática del sustrato superóxido cargado negativamente dentro del sitio activo de la enzima. El ión  $\text{Cu}^{+2}$  del sitio activo está situado en la parte inferior de un bolsillo profundo en cada subunidad enzimática. Una red de enlaces de hidrógeno de Glu 123, Glu 133, Lys 136 y Thr 137 en la entrada del bolsillo facilita la difusión de  $\text{O}_2^-$  hacia un sitio entre el ión Cu y un residuo Arg (Voet *et al.* 2003).

La SOD se considera una defensa de primera línea contra las especies reactivas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido en la reacción, que puede reaccionar para generar otras especies oxígeno reactivas, se degrada a agua y oxígeno por enzimas como la catalasa, que cataliza la reacción:



y la glutatión peroxidasa, que usa glutatión como agente reductor:



La enzima última también cataliza la degradación de hidroperóxidos orgánicos. Algunos tipos de glutatión peroxidasa requieren el selenio para su actividad; razón por la cual se considera al



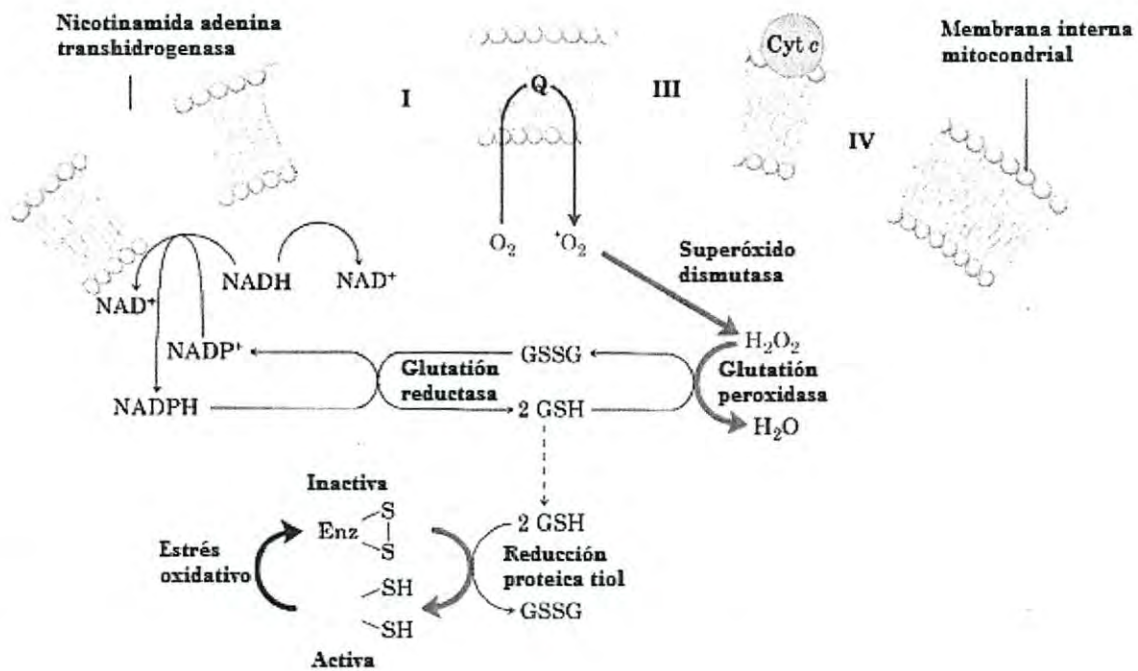
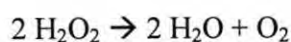


Figura 3. Mecanismo de acción del sistema glutatión peroxidasa en la membrana interna mitocondrial (McKee y McKee, 2003).

selenio como antioxidante (Nelson *et al.*, 2006; Murray *et al.* 2003). La SOD mitocondrial y bacteriana son tetrameros que contienen Mn; la SOD citosólica de eucariote es un dímero que contiene iones cobre y cinc. La velocidad de degradación no enzimática del superóxido es  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mientras que la velocidad de la reacción catalizada por SOD es  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este aumento de la velocidad, que es cercano al límite de difusión, parece acompañarse por unagavía electrostática del sustrato superóxido cargado negativamente dentro del sitio activo de la enzima. El ión  $\text{Cu}^{+2}$  del sitio activo está situado en la parte inferior de un bolsillo profundo en cada subunidad enzimática. Una red de enlaces de hidrógeno de Glu 123, Glu 133, Lys 136 y Thr 137 en la entrada del bolsillo facilita la difusión de  $\text{O}_2^-$  hacia un sitio entre el ión Cu y un residuo Arg (Voet *et al.* 2003). La SOD se considera una defensa de primera línea contra las especies reactivas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido en la reacción, que puede reaccionar para generar otras especies oxígeno reactivas, se degrada a agua y oxígeno por enzimas como la catalasa, que cataliza la reacción:



y la glutatión peroxidasa, que usa glutatión como agente reductor:



Esta enzima también cataliza la degradación de hidroperóxidos orgánicos.

### 1.3 Métodos para Evaluar la Actividad Antioxidante

Se sabe que las dietas ricas en frutas y verduras tienen la facultad de prevenir o retardar

la manifestación de ciertas enfermedades crónicas degenerativas, incluyendo las enfermedades cardiovasculares y los cánceres comunes. Teniendo esto en mente, muchos científicos han investigado las propiedades de los fitonutrientes de éstas fuentes y, específicamente, han determinado su capacidad antioxidante. Los antioxidantes naturales más estudiados de las frutas y las verduras son los flavonoides, los polifenoles, los carotenoides, la fibra, las vitaminas A, B, C y E, tocoferoles, calcio y selenio. Estos compuestos y elementos pueden actuar de forma independiente o en combinación como agentes anticancerígenos o cardioprotectores por medio de diversos mecanismos. Varios métodos se han desarrollado para determinar el potencial antioxidante de los alimentos (Ozgen *et. al.*, 2006).

### 1.3.1 Métodos químicos

En general, existen dos tipos de pruebas químicas que dependen del mecanismo de acción de los antioxidantes. Un tipo de prueba es la que involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y otro tipo de prueba es la que involucra la transferencia de electrones individuales (SET) (Dudonne *et. al.*, 2009).

Las pruebas tipo HAT son más relevantes para evaluar la capacidad de los antioxidantes para romper la reacción de oxidación en cadena de los lípidos. Las reacciones HAT dependen del solvente y del pH y generalmente son rápidas, completándose típicamente en segundos o minutos. La mayoría de las pruebas de tipo HAT monitorean la cinética de una reacción competitiva. La cuantificación se deriva de curvas cinéticas. Éste tipo de métodos

usualmente están compuestas por un generador de radicales libres sintético, una molécula oxidable y un antioxidante (Karadag *et al.*, 2009).

Una prueba tipo HAT es la prueba ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno). Dicha prueba mide la inhibición de la oxidación inducida por los radicales peroxilo y refleja la clásica actividad antioxidante rompedora de la cadena de oxidación llevada a cabo por la transferencia de átomos de hidrógeno (Cao *et al.*, 1993).

Otra prueba es la TRAP (parámetro antioxidante total de captura de radicales), la cual mide la capacidad de un antioxidante para neutralizar a los radicales peroxilo generados mediante la descomposición térmica del compuesto hidrosoluble 2,2'-azobis(2 amidinopropano)dihidrocloruro (ABAP) y un compuesto que al oxidarse se vuelve fluorescente (Guo *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la prueba de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), en la cual se induce la auto-oxidación de las LDL que son aisladas previamente del suero sanguíneo. Dicha auto-oxidación se determina por medio de la formación de dienos conjugados, los cuales se miden espectrofotométricamente a 234 nm. Básicamente, son tres mecanismos los que están involucrados en la capacidad antioxidante determinados por medio de esta prueba: neutralización de los radicales libres, unión a sitios críticos de las LDL y la quelación de metales (El-Saadani *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 2000; Pinchuk y Lichtenberg, 2002).

En los métodos SET, la reactividad relativa se basa en el potencial de desprotonación e ionización del grupo funcional reactivo. Por lo tanto, son dependientes del pH. En general, el potencial de ionización disminuye al aumentar el pH, lo que refleja el incremento de la

capacidad de donación de electrones con la desprotonación. Bajo condiciones ácidas, la capacidad reductora se puede ver restringida debido a la protonación de compuestos antioxidantes. Por otro lado, bajo condiciones ácidas la disociación de protones de los compuestos fenólicos incrementa la capacidad reductora de la muestra. Las reacciones de este tipo de ensayos suelen ser lentas y necesitan de tiempos prolongados para alcanzar su terminación. Por lo anterior, la determinación se basa en la disminución porcentual relativa de reactivo en lugar de la cinética de la reacción o la capacidad antioxidante total. En comparación con los ensayos HAT, el mecanismo de los ensayos SET depende fuertemente del solvente debido a la estabilización de especies cargadas por parte del solvente. Este tipo de ensayos básicamente constan de un antioxidante y una molécula oxidante. El oxidante extrae un electrón del antioxidante, causando un cambio de color que es proporcional a la concentración de antioxidante. La reacción llega a su fin cuando se detiene el cambio de color (Karadag *et. al.*, 2009). Algunas pruebas tipo SET son el método por el radical  $ABTS^{+}$  y el método por el radical DPPH $^{\bullet}$ .

#### 1.3.1.1 Método por el radical $ABTS^{+}$

También se conoce como método TEAC (actividad antioxidante equivalente Trolox). Ésta técnica presenta varias ventajas. Una de ellas es que el radical  $ABTS^{+}$  puede solubilizarse tanto en medios acuosos como en medios orgánicos y no se ve afectado por la fuerza iónica, por lo tanto la capacidad antioxidante se puede medir debido a la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos. Además, si el solvente utilizado se cambia de agua a

etanol, se puede llevar a cabo la medición de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, simultáneamente. Otra ventaja que presenta es que es fácil de llevarla a cabo y es utilizada ampliamente en laboratorios de investigación ya que permite llevar a cabo la evaluación a amplios rangos de pH (Arnao *et al.*, 1999).

A pesar de las múltiples ventajas, el valor TEAC caracteriza la capacidad de la muestra para reaccionar con el ABTS en lugar de la capacidad para inhibir los procesos oxidativos. La reacción con muchos fenoles (provenientes de productos naturales puede llevarse a cabo en un largo período de tiempo. Las lecturas finales se pueden llevar a cabo después de 4 o 6 minutos después de iniciada la reacción, por lo tanto los valores de TEAC determinados pueden ser inferiores al valor real (Karadag *et. al.*, 2009).

#### 1.3.1.2 Método por el radical DPPH<sup>\*</sup>

Esta técnica presenta la ventaja de que es simple, rápida y requiere solamente de un espectrofotómetro UV-Vis. Se puede llevar a cabo el análisis de un gran número de muestras utilizando microplacas. Sin embargo, solo puede solubilizarse en medios orgánicos y no acuosos, por lo que no es útil para evaluar antioxidantes hidrofílicos. Además, la absorbancia a 517 nm se puede disminuir con la luz, oxígeno o el tipo de solvente. Otra desventaja es que el ion DPPH<sup>\*</sup> tiene poca similitud con los radicales encontrados *in vivo*, por lo que los resultados no arrojan resultados completamente concluyentes para predecir la actividad de los antioxidantes en medios biológicos (Fukumoto y Mazza, 2000).

### 1.3.2 Métodos biológicos

La determinación de la actividad antioxidante es un método importante de monitoreo para comparar los potenciales de óxido/reducción de frutas y verduras y sus fitoquímicos en varios sistemas. A pesar del amplio uso de los ensayos químicos para la determinación de la actividad antioxidante, su habilidad para predecir la actividad antioxidante en sistemas *in vivo* es cuestionable por numerosas razones. Algunos se llevan a cabo a pH y temperaturas no fisiológicos. Además, ninguno de ellos toman en cuenta la biodisponibilidad, el consumo y el metabolismo de los compuestos antioxidantes (Liu y Finley, 2005).

Los protocolos normalmente no incluyen a los sustratos biológicos adecuados que deberán ser protegidos por los antioxidantes, los tipos de oxidantes presentes en los sistemas biológicos, la partición de compuestos entre la fase acuosa y lipídica ni la influencia del comportamiento interfacial (Frankel y Meyer, 2000).

Los sistemas biológicos son más complejos que las mezclas químicas empleadas en los ensayos químicos. Además, los compuestos antioxidantes pueden operar por diversos mecanismos (Liu, 2004). La eficiencia de los compuestos puede ser diferente entre los diversos ensayos. La mejor forma para determinar la actividad antioxidante es utilizando modelos animales o humanos; sin embargo, éstos son más caros y requieren de mucho tiempo para llevarse a cabo (Liu y Finley, 2005). Los modelos en cultivos celulares proveen una aproximación fiable que es más económica que los estudios con humanos o animales, son

relativamente rápidos y toman en cuenta algunos factores de consumo, distribución y metabolismo de los antioxidantes (Wolfe y Liu, 2007).

#### 1.3.2.1 Método de la determinación de la actividad antioxidante en células (CAA)

La primera prueba de la evaluación de la actividad antioxidante celular (CAA por sus siglas en inglés) fue llevada a cabo por Wolfe y Liu (2007). En este estudio se utilizaron células tumorales HepG2. Los antioxidantes incorporados al sistema secuestran los radicales peroxil e inhiben la producción de DCF (Figura 2.). La disminución de la fluorescencia, al ser comparada con las células control, es un indicativo de la actividad antioxidante de los compuestos.

En otro estudio realizado por Blasa *et. al.* (2011), se realizó un ensayo similar al realizado por Wolfe y Liu (2007) pero utilizando cultivos celulares de eritrocitos en lugar de utilizar células tumorales HepG2. En este estudio, se comparó el ensayo en cuestión con la prueba química ORAC. Se evaluó la actividad antioxidante de fitoquímicos puros y de extractos herbales. Los resultados obtenidos fueron sumamente interesantes, ya que se demostró una diferencia en algunos de los resultados obtenidos por los dos diferentes ensayos de determinación de actividad antioxidante. Por lo tanto, debido a las diferencias que existen entre las pruebas químicas y biológicas, es posible que los resultados obtenidos por dichos métodos no sigan las mismas tendencias. En los estudios mencionados anteriormente, se utilizó un lector de placas para fluorescencia para la evaluación de la CAA. Sin embargo,



Eruslanov y Kusmartsev (2010) realizaron exitosamente la determinación de la fluorescencia por medio de citometría de flujo.

### 1.3.2.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que simultáneamente mide, y después analiza, múltiples características físicas de partículas, usualmente células, mientras fluyen por un flujo a través de un haz de luz. Las propiedades medidas incluyen el tamaño relativo de las partículas, granularidad o complejidad interna e intensidad de fluorescencia. Estas características son determinadas utilizando un sistema de acoplamiento óptico-electrónico que graba la manera en como la célula o partícula dispersa el haz de luz incidente y como emite fluorescencia. En la Figura 4, se muestra el esquema general de un citómetro de flujo. Las células pasan un conducto, el cual se vuelve cada vez más angosto, permitiendo que vayan pasando las células, una por una, frente a un rayo láser. La magnitud y la forma en como es dispersado el láser después de incidir en la célula, determina la granularidad y el tamaño de la misma. Consta de varios filtros y detectores específicos, los cuales identificarán a la luz que es emitida por el fluorocromo usado en la tinción (Hawley y Hawley, 2004). Un citómetro de flujo consta de tres sistemas principales: sistema de fluidos, sistema óptico y sistema eléctrico. El sistema de fluidos transporta a las partículas en un flujo hacia el haz de luz de un láser para el análisis. El sistema óptico consiste de láseres, que iluminan a las partículas en el flujo de la muestra, y filtros ópticos para dirigir a las señales de luz resultantes a los detectores

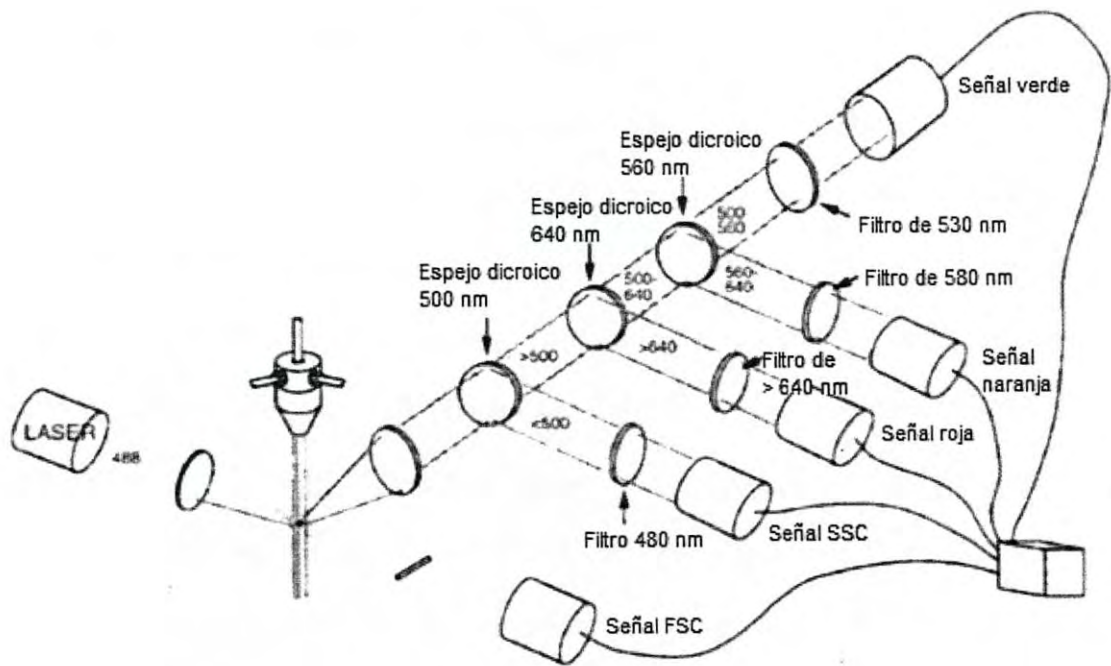


Figura 4. Esquema general de un citómetro de flujo (Hawley y Hawley, 2004).

apropiados. El sistema eléctrico convierte las señales de luz detectadas a señales eléctricas que pueden ser procesadas por un ordenador (BD Biosciences, 2000).

#### 1.4 Proceso de Elaboración del Café

Las cerezas del café son el fruto de la planta de café, las cuales están compuestas por dos granos de café cubiertos por una cascarilla la cual a su vez está cubierta por una pulpa. Las cerezas son cosechadas después de 5 años de haber plantado los árboles de café y cuando la cereza es de color rojo (Arya y Rao 2007). El procesamiento del café inicia con la remoción de la pulpa y la cascarilla. Para lo anterior se puede utilizar tanto el proceso húmedo como el seco (Pandey *et al.*, 2000). El método seco, comúnmente utilizado para el café Robusta, es tecnológicamente más simple en comparación con el método húmedo, el cual se utiliza normalmente para el café arábica. En el proceso húmedo, se elimina la pulpa y la cascarilla cuando la cereza aún está fresca. Este proceso involucra varias etapas en las que se utilizan cantidades considerables de agua e incluye una fermentación microbiana para remover el mucilago que queda unido a los granos (Gonzalez-Rios *et al.* 2007a, b).

El proceso de tostado es otro paso importante en el procesamiento del café, ya que en esta etapa se desarrollan las propiedades específicas del café (Franca *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008; Fujioka y Shibamoto, 2008). Este proceso es dependiente de la temperatura y el tiempo, lo cual conlleva a diversos cambios en la composición química y actividad biológica del café como resultado de las transformaciones de los polifenoles encontrados en forma natural en el café y da como resultado una compleja mezcla de productos de la reacción de Maillard (PRM) (Czerny *et al.*, 1999; Sacchetti *et al.*, 2009), así como la formación de compuestos orgánicos que son resultado de la pirolisis (Daglia *et al.*, 2000). Los compuestos

azufrados también sufren cambios por la oxidación, la degradación térmica y/o la hidrólisis (Kumazawa y Masuda, 2003). El proceso de tostado está conformado por dos fases. La primera fase corresponde al secado (temperatura del grano inferior a 160°C). En la segunda fase comienzan las reacciones pirolíticas a 190°C, produciendo una oxidación, reducción, hidrólisis, polimerización y descarboxilación (Hernández *et al.*, 2007).

Después del tostado, los granos de café deben ser enfriados rápidamente para detener las reacciones exotérmicas y para prevenir el tostado excesivo que podría afectar la calidad del producto (Baggenstoss *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2001). Posteriormente, los granos de café tostados son molidos, usualmente utilizando molinos multipalpas. Algunos cafés tostados son empacados estando enteros. Finalmente, el café molido es envasado al vacío y comercializado (Mussatto *et al.*, 2011).

Si el objetivo es producir café soluble, se lleva a cabo un paso adicional de extracción después del molido. Los sólidos solubles y los compuestos volátiles que le proveen al café su aroma y sabor específicos, son extraídos con agua. El agua se calienta a 175°C bajo presión (para mantener al agua en forma líquida). Los productores utilizan extractores por lote o continuos. Después de la extracción, se utiliza la evaporación o liofilización para aumentar la concentración de los solutos del extracto. Entonces, los extractos concentrados son deshidratados; el secado por congelación y el secado por spray-dryer son los métodos más utilizados para la elaboración del café soluble. En el método de secado por congelación, el extracto de café es primeramente congelado y después molido. A continuación, los gránulos son tamizados antes de ser deshidratados para asegurar que el tamaño de las partículas sea

uniforme. Durante este proceso, los cambios en el aroma provocados por el calentamiento y la oxidación son mínimos, debido a que la humedad se elimina por sublimación en una cámara de vacío. Cuando se utiliza el método de secado por spray-dryer, el extracto de café concentrado es atomizado en una cámara de secado en la cual el agua es eliminada debido a que ésta entra en contacto con aire el cual está a una temperatura de entre 200°C y 300°C. Esta técnica permite una producción a gran escala y provee productos con baja densidad. Las evaluaciones sensoriales de diferentes cafés instantáneos comerciales revelan que el atributo de calidad está asociado con los granos de café, el tiempo de almacenamiento, el proceso de fermentación, el tostado, la extracción de los sólidos solubles y el material en el que es empaquetado (Oliveira *et al.*, 2009).

#### 1.4.1 Efecto del proceso de tostado sobre la actividad antioxidante de la bebida de café

Durante el tostado, las temperaturas altas a las que es sometido el grano de café pueden disminuir la cantidad de antioxidantes presentes naturalmente. Por otro lado, a pesar de que se pueden perder compuestos con propiedades antioxidantes durante el tostado de los granos de café, las propiedades antioxidantes totales del café preparado se pueden mantener o aumentar por el desarrollo de compuestos con actividad antioxidante, como los productos de la reacción de Maillard (Castillo *et al.*, 2002).

Existen diversos estudios en los que se ha evaluado el efecto del tostado sobre la actividad antioxidante total del café. Dichos estudios han arrojado resultados contradictorios. Cämmerer y Kroh (2006) encontraron que se presentaba un máximo de la actividad

antioxidante en el café sometido a un tostado medio. También observaron que después de dicho punto en el proceso, se presentaba una disminución progresiva de la misma. Wen *et al.* (2005) observaron que la actividad antioxidante disminuía progresivamente durante las primeras etapas del tostado, sin embargo, ésta aumentaba en los cafés sometidos a tostados intensos. Borrelli *et al.* (2002) reportó una disminución general de la actividad antioxidante conforme aumentaba el grado de tostado. Sanchez-Gonzales *et al.* (2005) encontraron que la actividad antioxidante aumentaba progresivamente conforme aumentaba el tostado.

#### 1.4.1.1 Reacción de Maillard

Éstas son un grupo de transformaciones que dan origen a los colores y algunos sabores típicos de muchos alimentos cuando se someten a tratamiento térmico. La reacción de Maillard se origina entre el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de un azúcar reductor o un lípido oxidado que sufren una serie de complejas reacciones químicas, originando los denominados compuestos de la reacción de Maillard (PRM). La reacción se puede efectuar en diferentes condiciones, pero se favorece a pH alcalino, elevadas temperaturas, en alimentos con actividad de agua intermedia, la presencia de más de un grupo amino en un aminoácido, el tipo de carbohidrato (siendo las pentosas y aldosas las más reactivas) y la presencia de metales como el cobre o el hierro que tienen un efecto catalizador (Figura 5) (Badui, 2006).

Una característica de algunos compuestos generados por el oscurecimiento enzimático de Maillard es la habilidad antioxidante, principalmente de las melanoidinas, que actúan

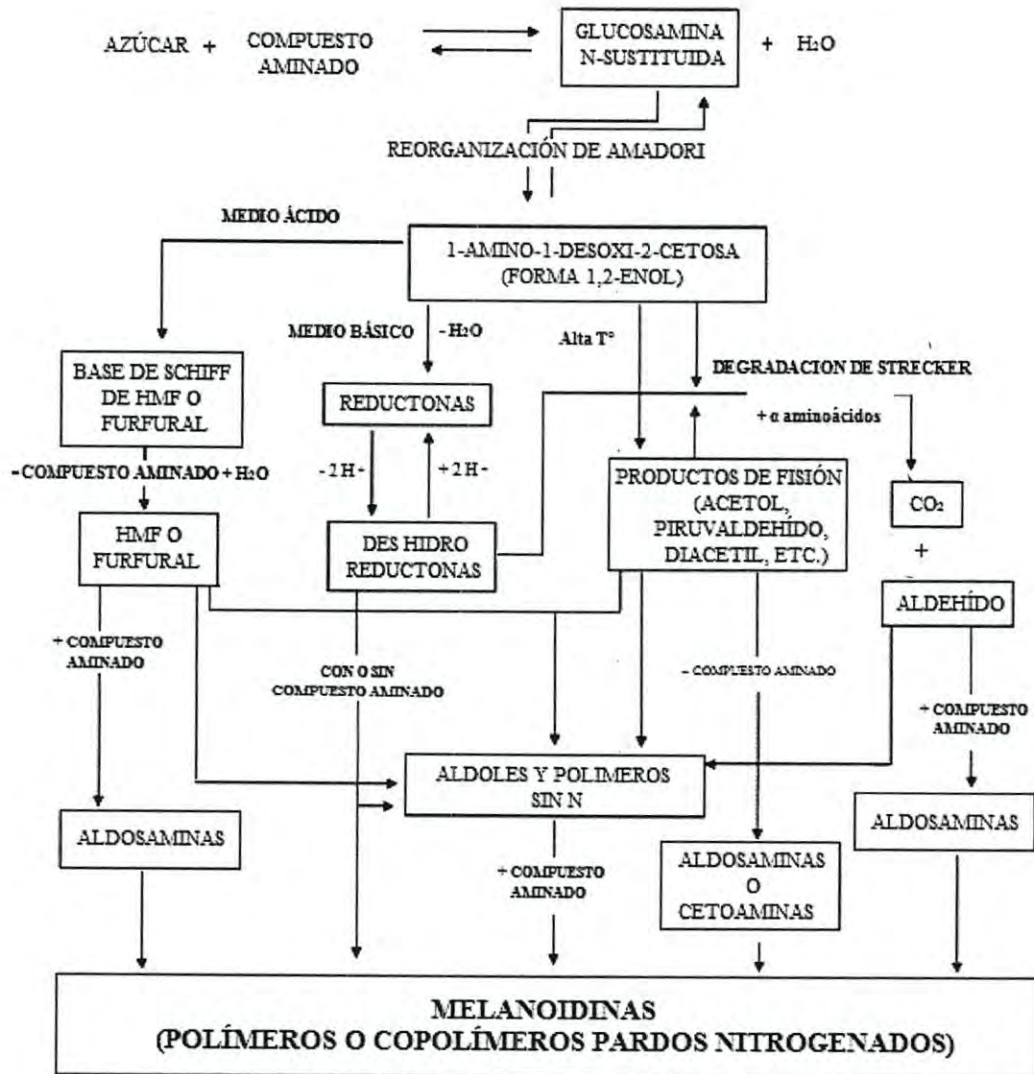


Figura 5. Esquema general de la reacción de Maillard (Badui, 2006).

realizado diversos estudios sobre la reacción de Maillard, no se ha podido establecer una estructura química para las mismas. Actualmente, se establecen 3 propuestas acerca de la estructura de las melanoidinas, las cuales pueden ser: (1) polímeros que consisten de unidades repetitivas de furanos y/o pirroles, los cuales se forman durante las etapas avanzadas básicamente como quelantes y eliminadores de oxígeno radicales peróxidos e hidroxilos compuestos presentes en la mayoría de los alimentos que se consumen diariamente en la dieta habitual (Baxter, 1995; Badui, 2006).

Las melanoidinas son los productos finales de la reacción de Maillard. Son responsables del color formado durante los procesos térmicos a los cuales son sometidos los alimentos como el café, el pan, la malta y la carne. Son polímeros de alto peso molecular con una estructura polidispersa que contienen nitrógeno. A pesar de que se han de la reacción de Maillard y que se unen por medio de reacciones de poli-condensación; (2) proteínas modificadas que contienen arginina; (3) un esqueleto formado por productos de la degradación de azúcar que se polimerizan por medio de una condensación aldólica, que se forma durante las etapas tempranas de la reacción de Maillard (Nuñez y Coimbra, 2010).

Dicha complejidad de la estructura química de las melanoidinas se debe a la presencia de una amplia gama de reactantes que se encuentran en un alimento. En los granos de café, diferentes azúcares reductores están presentes, los cuales se pueden presentar en diversas formas (mono-, di-, oligo- y polisacáridos); lo anterior también sucede con los aminoácidos (Bekedam *et. al.*, 2008). Además, se ha demostrado que otros compuestos como el ácido clorogénico está involucrado en la formación de las melanoidinas (Montavon *et. al.*, 2003; Bekedam *et. al.*, 2008).



## **II HIPÓTESIS**

Las propiedades antioxidantes del café producido en Sonora, no son alteradas significativamente por el proceso de tostado, debido al contenido de compuestos fenólicos presentes y a la formación de los productos de la reacción de Maillard durante el tostado.

### III OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del proceso de tostado sobre las propiedades antioxidantes de los extractos de café variedades *Coffea arabica* y *Coffea robusta*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en el grano de café verde (*Coffea arabica* y *Coffea robusta*) y cafés procesados e identificarlos por HPLC.
2. Cuantificar las melanoidinas presentes en los granos de café procesados de ambas variedades (*Coffea arabica* y *Coffea robusta*).
3. Determinar la capacidad antioxidante por métodos químicos de los extractos de grano de café verde (*Coffea arabica* y *Coffea robusta*) y café sujetos a distintos procesos.
4. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de café (*Coffea arabica* y *Coffea robusta*) por un método biológico.

## IV MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materia Prima

El grano de café, así como el café procesado, fueron proporcionados por Café del Pacífico S.A. de C.V. (Caffenio). Se analizaron tres tipos de cafés verdes (no procesados), café Arábica (*Coffea arabica*), café Caracol (*Coffea arabica*) y café Robusta (*Coffea canephora*). Se analizaron también cuatro cafés procesados: café tipo francés y café tipo italiano, ambos elaborados a partir de granos verdes de café Arábica; café Caracolillo (café tostado con azúcar) elaborado a partir de granos verdes de café Caracol; café soluble, elaborado a partir de granos verdes de café Robusta.

### 4.2 Preparación de la Muestra

El grano se pulverizó mecánicamente a un tamaño de partícula de 20 mesh (1 mm a tamaño de partícula) en un molino Thomas Wiley Laboratory Mill (Modelo 4). Los polvos de café verde y procesado se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta el momento de su análisis.

### 4.3 Extracción de los Compuestos Fenólicos

Se pesaron 0.2 g de muestra (café verde y procesado) y fueron homogenizados con 20 mL de agua a 75°C (Budryna *et. al.*, 2009). Posteriormente, el homogenizado fue sometido a

movimientos ultrasónicos (Sonicador marca Branson 1510) por 30 min y centrifugado a 17 900 g (IEC L31 Thermo electrón) a temperatura ambiente por 15 min. La extracción acuosa se repitió dos veces para asegurar la máxima extracción de los compuestos. Los sobrenadantes fueron mezclados y filtrados en papel Whatman No. 2. Los extractos acuosos fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (Chitindingu *et al.*, 2006).

#### 4.4 Cuantificación de Fenoles Totales

Las determinaciones se realizaron espectrofotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Molina-Quijada *et al.*, 2010). Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de cada extracto acuoso con 3 mL de agua deionizada y 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N (Merck). El extracto se oxidó por 5 min, después la reacción se neutralizó con 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y 950  $\mu\text{L}$  de agua deionizada. Después de 30 minutos, se leyó la absorbancia a 765 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian, modelo Cary 100). Se utilizó ácido clorogénico como estándar (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). El contenido de fenoles totales fue expresado en mg equivalentes de ácido clorogénico/100g (mg EAC/100 g) de peso de la muestra y fue el resultado de tres repeticiones.

Este ensayo se fundamenta en una reacción de oxidación/reducción que es el mecanismo básico, gracias al carácter reductivo del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) (Singleton y Rossi, 1965).

#### 4.5 Cuantificación de Flavonoides Totales

Los flavonoides fueron determinados siguiendo la técnica de Molina-Quijada y col. (2010). A 1 mL de extracto metanólico con 4 mL agua destilada se añadieron 0.3 mL de  $\text{NaNO}_2$  (5 g/100 mL) y 0.3 mL de una solución de  $\text{AlCl}_3$  (10 g/100 mL). Como se muestra en la Figura 6, el  $\text{AlCl}_3$  anhidro forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados. En el caso de los orto-dihidroxiados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxiados son estables (Mabry y Markham, 1968). Se dejó reposar por 1 min, se añadieron 2 mL de NaOH 1 M, y se aforó a 10 mL con agua destilada. Se mezcló y se leyó espectrofotométricamente a 352 nm. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de catequina (EC)/100 g.

#### 4.6 Identificación de Compuestos Fenólicos y Cafeína por HPLC

El procedimiento para la identificación de los compuestos fenólicos se realizó de acuerdo al método descrito por Cantos *et al.* (2000). Se introdujeron 20  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso a una columna Supelcosil<sup>TM</sup> LC18 (30 x 0.4 cm x 5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula, Supelco, Bellefonte, PA, USA), en un equipo de cromatografía HPLC (Varian, modelo ProStar 230), equipado con un detector de luz ultravioleta (Varian, modelo 9050). Los solventes utilizados fueron: ácido fórmico al 2% como solvente A y metanol puro como solvente B. La elusión del análisis se programó siguiendo el gradiente del solvente de 10 a 100% de B y A con un flujo de 0.7 mL/min durante 35 minutos. La identificación de los diferentes compuestos fenólicos se llevó a cabo comparándolos con los tiempos de retención de sus estándares correspondientes.

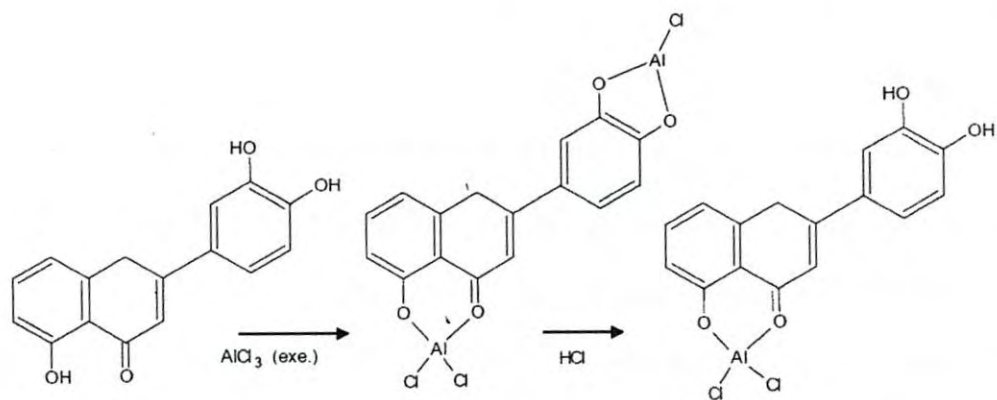


Figura 6. Fundamento de la determinación de flavonoides totales (Mabry y Markham, 1968).

Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración (0-0.2 mg/mL) para cada uno de los compuestos fenólicos identificados.

#### 4.7 Cuantificación de Melanoidinas

Las melanoidinas fueron cuantificadas espectrofotométricamente (Figura 7). Primeramente, se estableció la longitud de onda de máxima absorción (420 nm) para las melanoidinas mediante un barrido espectral en las regiones del UV-VIS (Del Castillo *et. al.*, 2002). Debido a que la estructura molecular de las melanoidinas no se ha determinado hasta la fecha, no existe un estándar de melanoidinas disponible. Por lo tanto, las curvas de absorción y de calibración fueron elaboradas utilizando un extracto de café tostado como fuente de melanoidinas. Previamente, se preparó una dilución 2:1 del extracto de café tostado, la cual fue considerada como una solución stock de melanoidinas. Posteriormente, se elaboraron 5 diluciones seriadas de la solución stock. Después de determinar la absorbancia de cada dilución, se determinó la concentración de las melanoidinas con la fórmula de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A}{ba}$$

donde "C" es la concentración de melanoidinas, "A" es la absorbancia de la dilución, "b" es la longitud de la celda del espectrofotómetro (1 cm) y "a" es el coeficiente de extinción específico de las melanoidinas expresado en L/ g x cm. El valor de "a" utilizado en este ). La curva de calibración fue elaborada al graficar los valores de absorbancia obtenidos para cada dilución contra la concentración de las mismas. Para determinar la concentración de melanoidinas en las muestras, primeramente se preparó una dilución 1:9 de cada extracto. La

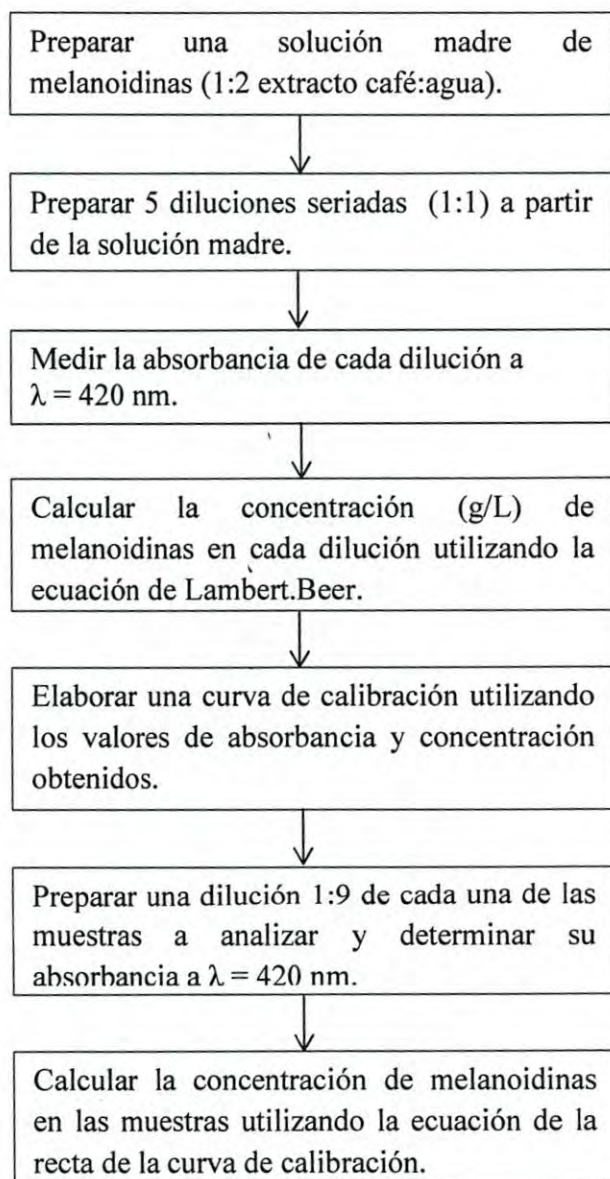


Figura 7. Metodología de la técnica de la evaluación de melanoidinas en las muestras de café.



determinación se realizó a una longitud de onda de 420 nm. El contenido de melanoidinas fue expresado como g de melanoidinas/100 g de muestra (Tagliazucchi *et. al.*, 2010).

#### 4.8 Métodos Químicos para Evaluar la Actividad Antioxidante

##### 4.8.1 Método por el radical ABTS<sup>•+</sup>

Este método se basa en la habilidad de los antioxidantes para disminuir la absorbancia del radical ABTS<sup>•+</sup> (*ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico*) al donar un electrón para estabilizar al catión. El radical ABTS<sup>•+</sup> es de un color azul intenso y su absorbancia se lee en un rango de longitudes de onda desde los 415 hasta los 734 nm. En este rango, la inhibición de la oxidación es evidente ya que ésta se monitorea con la reducción de la coloración azul hasta volverse transparente cuando se encuentra en contacto con el antioxidante (Leong y Shui, 2002; Arnao *et al.*, 1999; Lemanska *et al.*, 2001).

Para generar el radical catión ABTS<sup>•+</sup> se pesaron 19.2 mg del 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Posteriormente se agregaron 88 mL de una solución de persulfato de potasio (0.0378 mg/mL). La solución se homogenizó y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup>, éste se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia alrededor de  $0.70 \pm 0.1$  a 754 nm (espectrofotómetro UV-VIS Varian, modelo Cary 100). Los extractos filtrados (0.1 mL de extracto) se colocaron cada uno en una

celda y se mezclaron con 3.9 mL del radical recién generado. Se leyó la absorbancia al inicio ( $Abs_i$ ) y a cada minuto hasta los 7 minutos de reacción ( $Abs_f$ ). El diferencial de absorbancia ( $Abs_i - Abs_f$ ) se transformó a porcentaje de inhibición y se calculó la actividad antioxidante en milimoles equivalentes Trolox (mmoles ET) /gramo peso fresco (g pf), mediante una curva de calibración (0-0.25 mg/mL) de Trolox (análogo soluble de la vitamina E) (Kuskoski *et al.*, 2005).

#### 4.8.2 Método por el radical DPPH•

La técnica se basa en la medición de la habilidad reductora de los antioxidantes hacia el DPPH•. La habilidad puede ser evaluada por resonancia del giro del electrón o midiendo la disminución de la absorbancia (517 nm), al igual como se hace en la técnica del ABTS. La solución es de un color púrpura intenso, el cual disminuye al neutralizarse el radical para formar una solución transparente (Brand-Williams *et al.*, 1995; Sripriya *et al.*, 1996; Bondet *et al.*, 1997; Mahinda y Shahidi, 2000; Peyrat-Maillard *et al.*, 2000).

Se mezclaron 3.9 mL del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (0.025 mg/mL metanol) con 0.1 mL de cada uno de las diluciones de los extractos (concentración 0.25 g/mL). La reacción se llevó a cabo por 30 min y posteriormente se leyó a 515 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian, modelo Cary 100). La absorbancia de las muestras se midió en función del tiempo hasta que las diferencias fueron menores a 0.003. Los cambios en la absorbancia al inicio y final de la reacción fueron transformados a porcentaje de inhibición (Materska y Perucka, 2005).

#### 4.9 Método Biológico para Evaluar la Actividad Antioxidante

Esta técnica se basa en la oxidación del diacetato de 2'-7'-diclorofluoreína (DCFH-DA) al compuesto fluorescente DCF (Anexo 2). Debido a que el DCFH no es permeable para las células, se utiliza su éster diacetilado (DCFH-DA) el cual es más permeable. El DCFH-DA pierde sus grupos acetato por la acción de esterasas intracelulares para formar el DCFH. La oxidación de DCFH produce el DCF, el cual puede ser fácilmente detectado debido a la elevada fluorescencia emitida por dicho compuesto, la cual se lee a 525 nm (Wang, 2008). Des esta forma, la fluorescencia medida es inversamente proporcional a la eficiencia del extracto o del antioxidante (Figura 8). Para esta evaluación, se utilizó la línea celular M12.A<sup>K</sup>.C3F.6 (linfocitos B de ratón).

##### 4.9.1 Estandarización de la técnica de la determinación de la actividad antioxidante en células

Inicialmente, se estandarizó la concentración de DCFH-DA más adecuada a utilizar. De acuerdo a lo recomendado por Eruslanov y Kusmartsev (2010), se evaluaron concentraciones que oscilaban entre 1 y 20  $\mu$ M.

En una placa de 6 pozos, se colocaron 200 000 células por pozo en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido con 5% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas por 12 h (37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente, se agregaron diferentes concentraciones de DCFH-DA (1, 5, 10 y 20  $\mu$ M). Con el fin de determinar el

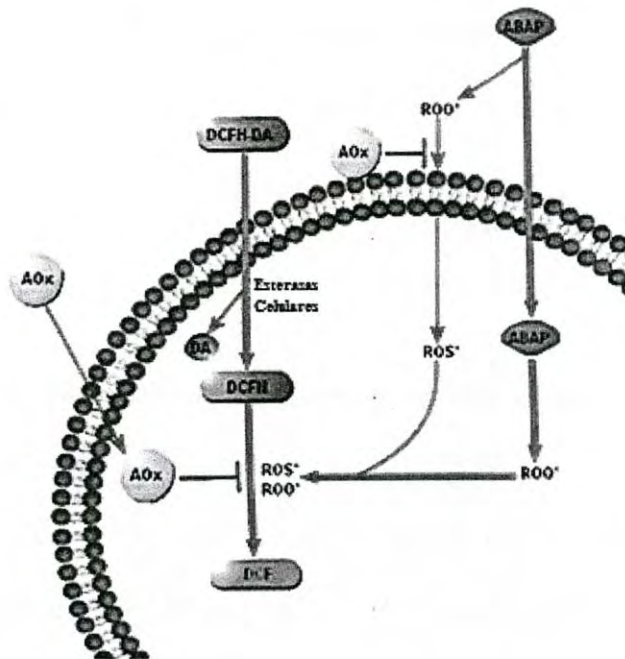


Figura 8. Mecanismo de acción de la determinación de CAA.

tiempo más adecuado de incubación de las células con el DCFH-DA, se realizó una cinética de incubación de 15, 30 y 60 minutos. La fluorescencia fue determinada por medio de citometría de flujo.

Una vez establecidas la concentración de DCFH-DA y el tiempo de incubación a utilizar, se evaluaron diferentes condiciones para inducir estrés con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se evaluaron concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tiempos de incubación de 15, 30 y 60 minutos.

#### 4.9.2 Actividad antioxidante en células C3F.6

La actividad antioxidante de los extractos se determinó basándose en el método descrito por Wolfe y Liu (2007) y por Eruslanov y Kusmartsev (2010), con unas modificaciones (Figura 9). En una placa de 6 pozos, se colocaron 200 000 células por pozo en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido con 5% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas por 12 h (37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Después de la incubación, se agregaron 100 µg/mL de extracto de café caracolillo y café soluble. Los extractos acuosos fueron previamente liofilizados y disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Se utilizó ácido cafeico (100 µM) como control positivo, y DMSO (5%) como control negativo. Una vez agregado el extracto de café, el ácido cafeico o el DMSO, se llevó a cabo una incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se evaluaron diferentes tiempos de incubación (0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 horas). Posteriormente, se realizó un lavado con PBS 1X. Después, se agregó 1 µM DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluorescina) y se incubó por un lapso de 30 minutos bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente, se agregó un inductor de

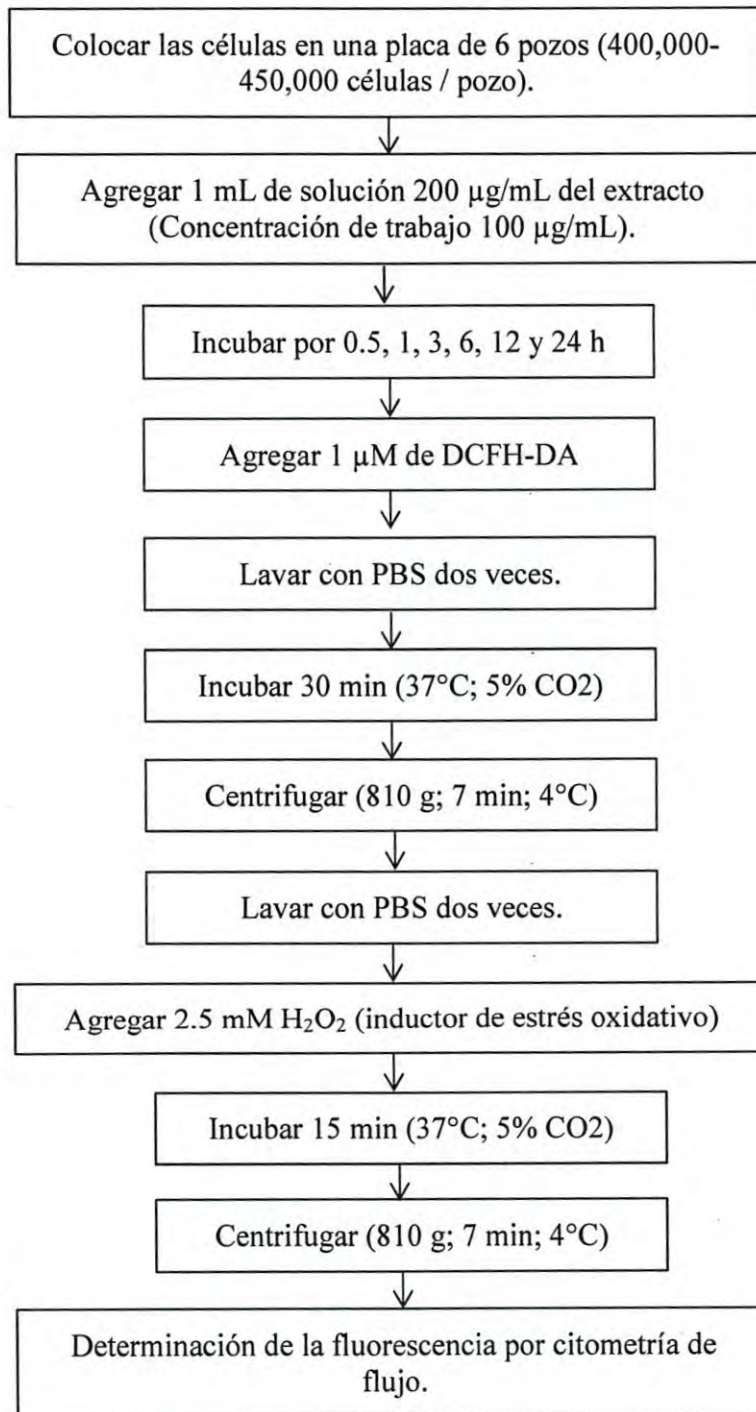


Figura 9. Metodología de la técnica de la evaluación de la actividad antioxidante en células (CAA).

estrés oxidativo. En este estudio, se evaluó al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con una concentración de 1 mM. A diferencia de la técnica utilizada por Wolfe y Liu (2007), las células utilizadas en este estudio fueron las C3F.6 en lugar de las células HepG2. En el estudio de Wolfe y Liu (2007), el DCFH-DA se incubó junto con el extracto evaluado, mientras que en el presente estudio se incuban por separado para evitar una posible interacción química entre el DCFH-DA con algún componente presente en el extracto. Además, en este estudio se utilizó  $H_2O_2$  como inductor de estrés en lugar del 2,2'-azobis dihidrocloruro (2-amidinopropano) (ABAP) utilizado por Wolfe y Liu (2007).

Después de agregar el inductor, se realizó una tercera incubación por un lapso de 15 min bajo las mismas condiciones de temperatura y concentración de  $CO_2$ . Después de la incubación, se determinó la fluorescencia por medio de citometría de flujo. Los resultados se reportaron en porcentaje de fluorescencia.

#### 4.10 Análisis Estadístico

Los datos son la media de tres determinaciones  $\pm$  desviación estándar (DE). Estos fueron analizados por un análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de LSD ( $P < 0,05$ ). Se correlacionaron los niveles de fenoles totales con la capacidad antioxidante medida por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico Sigmastat 3.5 (Point Richmond, CA, USA).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

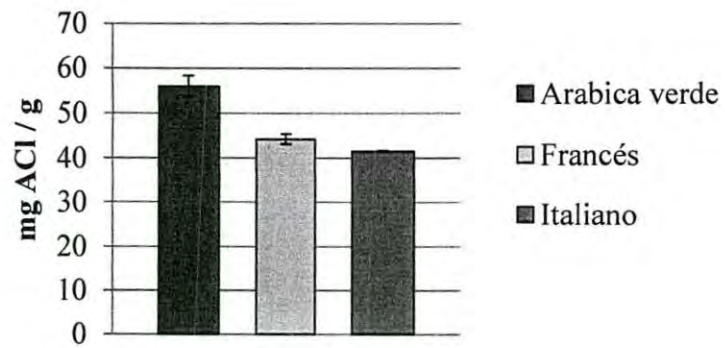
### 5.1 Fenoles Totales

Los resultados mostraron que el grano de café verde Caracol presentó un contenido de fenoles significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en comparación con los granos de Arábica y Robusta verdes, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los granos de café verde Arábica y café verde Robusta (Figura 10). Por lo anterior, en este estudio se demuestra que dicho grano podría representar una buena fuente de compuestos fenólicos, en especial, de ácido clorogénico como se discutirá más adelante. En el caso del café francés e italiano, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de los fenoles totales (disminución de 20 – 25% del contenido fenólico total), en comparación a su grano de café verde de origen, es decir el café verde Arábica. El café italiano y el francés son tostados a una temperatura de 280°C por un lapso de 20 y 18 minutos, respectivamente. Por lo tanto, la disminución del contenido fenólico se puede deber al proceso de tostado (Joon-Kwan *et al.*, 2009; Vignoli *et al.*, 2011; Votavová *et al.*, 2009).

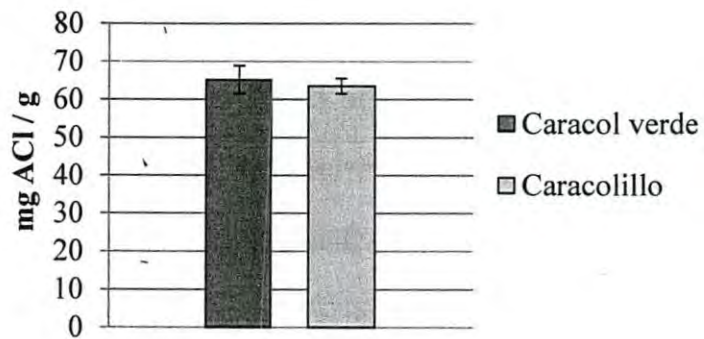
El contenido de fenoles totales encontrados para los cafés tostados Arabica osciló entre 4 100 y 6 300 equivalentes de ácido clorogénico/100 g. (Figura 8). Afify *et al.* (2011) reportaron un contenido de compuestos fenólicos para café tostado Arábica menor a lo



(a)



(b)



(c)

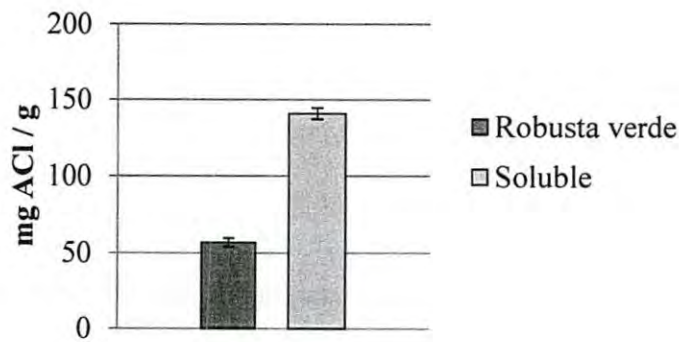


Figura 10. Fenoles totales de granos verdes de *Coffea arabica* (Arábica y Caracol) y *Coffea canephora* y cafés procesados. (a) muestras de café Arábica; (b) muestras de café Caracol; (c) muestras de café Robusta.

reportado en este estudio. Alves *et al.* (2010) encontraron que el contenido fenólico variaba entre los cafés Arábica tostados de diferentes países (Honduras, Brasil y Kenia). La síntesis de compuestos fenólicos se induce cuando las plantas padecen de alguna infección o herida (los compuestos fenólicos poseen actividad antimicrobiana), al estar sometidas a temperaturas bajas, cuando son expuestas a una reducción de nutrientes o con la presencia de metales pesados. Las plantas acumulan flavonoides y otros compuestos fenólicos en las vacuolas de las células epidérmicas, ya que estos compuestos pueden absorber los rayos UV, evitando que los rayos UV penetren a los tejidos profundos de las plantas (Michalak, 2006). En otras palabras, el contenido fenólico depende de las condiciones ambientales a las cuales están expuestas las plantas, las cuales varían de una región a otra. Esto puede explicar la variación en el contenido fenólico que se presenta entre las muestras evaluadas en este estudio (Alves *et al.*, 2010; Afify *et al.*, 2011).

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la cantidad de fenoles totales encontradas en el café caracolillo y su grano de origen (café verde Caracol). Es de suponerse que debido al proceso de tostado, la cantidad de fenoles totales en el café caracolillo debe ser menor que en el café verde. Como se mencionará más adelante, el café caracolillo mostró una cantidad considerable de melanoidinas. Se ha encontrado que las melanoidinas, al igual que los compuestos fenólicos, reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Perez-Martínez *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible que estas hayan reaccionado con el reactivo de Folin-Ciocalteu y como resultado, la absorbancia registrada fue equivalente a la obtenida con el café verde, obteniendo así un falso positivo. El contenido de fenoles totales encontrados para café soluble fue de 14 078 mg EAC/100 g (Figura 10). Vignoli *et al.* (2011) reportaron valores de fenoles

totales en café soluble similares a los encontrados en este estudio. El café soluble analizado en el presente estudio, fue preparado a partir de granos de café verde Robusta. La cantidad de compuestos fenólicos encontrados en el café soluble fue tres veces mayor que el encontrado en el grano de café verde ( $p < 0.05$ ). El aumento en los compuestos fenólicos se debe al proceso de elaboración del café soluble (descrito en materiales y métodos), el cual consiste en la evaporación o liofilización (Mussatto *et al.*, 2011). Los componentes solubles que son concentrados durante el proceso incluyen a todos los compuestos presentes, razón por la cual aumenta la concentración global de los fenoles como se puede observar en el presente estudio.

## 5.2 Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides determinados en los granos de café francés e italiano fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a la de los del café Arábica verde. No se presentaron diferencias significativas entre el café Caracol y el café tostado caracolillo ( $p > 0.05$ ) (Figura 11). En el caso del café Robusta, se presentaron diferencias significativas entre el café Robusta y el café soluble ( $p < 0.05$ ) (Figura 11). Como se mencionó anteriormente, las temperaturas altas utilizadas durante el proceso de tostado, provoca la disminución de los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

El flavonoide identificado en las muestras utilizadas en este estudio fue la rutina. Dicho flavonoide sólo pudo ser identificado en los granos de café verde. Sin embargo, con este ensayo, se detectaron flavonoides en las muestras de café tostados. El  $\text{AlCl}_3$  utilizado para la determinación de flavonoides en este estudio, no reacciona únicamente con estos compuestos

T-160190

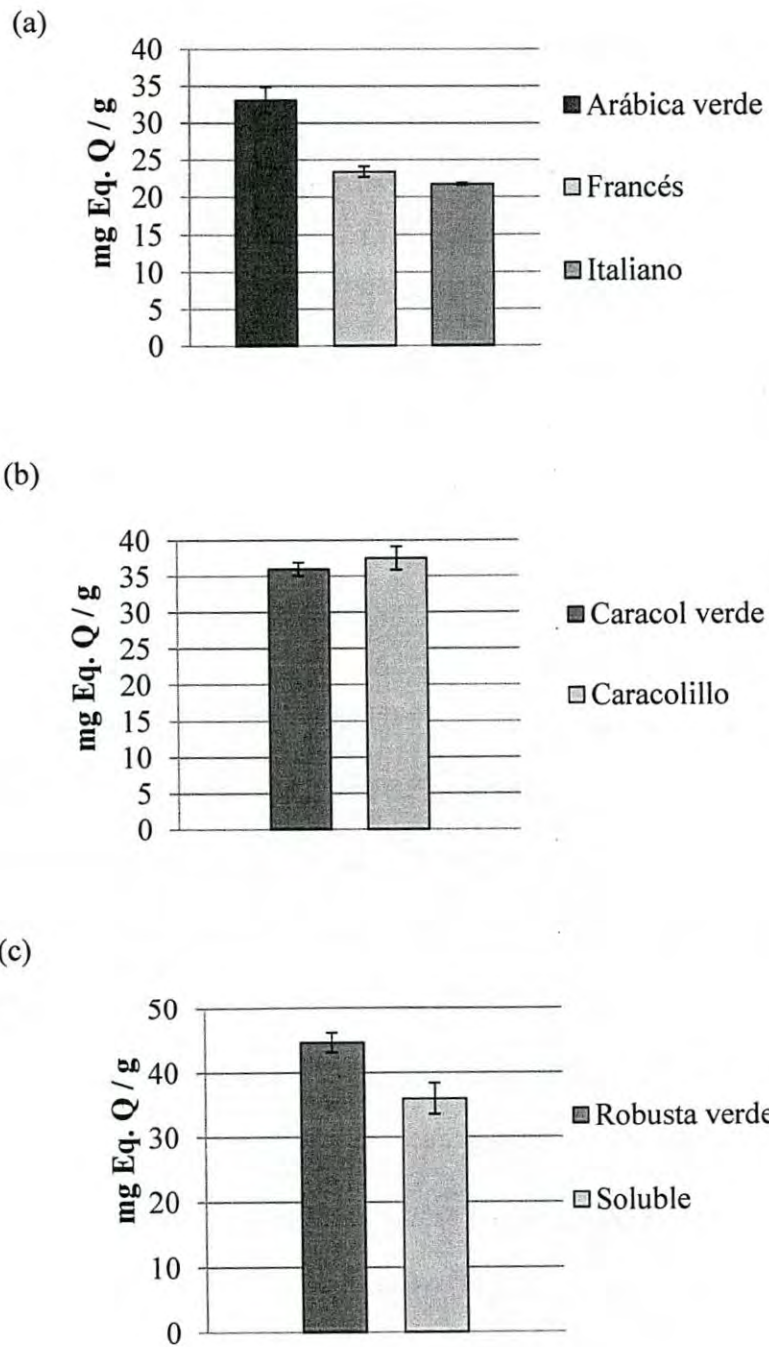


Figura 11. Flavonoides totales de granos verdes de *Coffea arabica* (Arábica y Caracol) y *Coffea canephora* y cafés procesados. (a) muestras de café Arábica; (b) muestras de café Caracol; (c) muestras de café Robusta.

fenólicos. El  $\text{AlCl}_3$  es un agente quelante que se utiliza para el tratamiento de aguas residuales producidas por la industria alimentaria, específicamente, para la remoción de melanoidinas (Kalyuzhnyi *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible que el  $\text{AlCl}_3$  haya reaccionado con las melanoidinas que

están presentes en el café tostado, formando un complejo que pudo haber sido determinado espectrofotométricamente, dando así, un falso positivo de contenido de flavonoides en las muestras tostadas.

### 5.3 Identificación de Fenoles por HPLC

Los compuestos identificados en las muestras se muestran en la Figura 12 y la Tabla 1. Para café Arábica, Dupas *et al.* (2006), reportaron una concentración de ácido clorogénico inferior al reportado en este estudio. Además, en el mismo estudio también se encontraron cantidades menores de ácido cafeico y ácido ferúlico. Sin embargo, se reportó la presencia de ácido *p*-coumárico, el cual no fue identificado en el café soluble analizado en este estudio. Según Materska y Perucka, (2005), los compuestos fenólicos producidos por las plantas son el resultado de la adaptación a las condiciones de estrés biótico y abiótico (infección, heridas, estrés por agua, estrés por frío, elevada luz visible). Por lo tanto, las diferencias en la composición fenólica y la actividad antioxidante de los cafés de diferentes orígenes se puede deber a los factores ambientales a los que está sometida la planta de café.

El café caracolillo tostado presentó un contenido fenólico menor ( $p < 0.05$ ) que su grano verde de origen, es decir, el café Caracol. Budryn *et al.* (2009) reportaron valores de

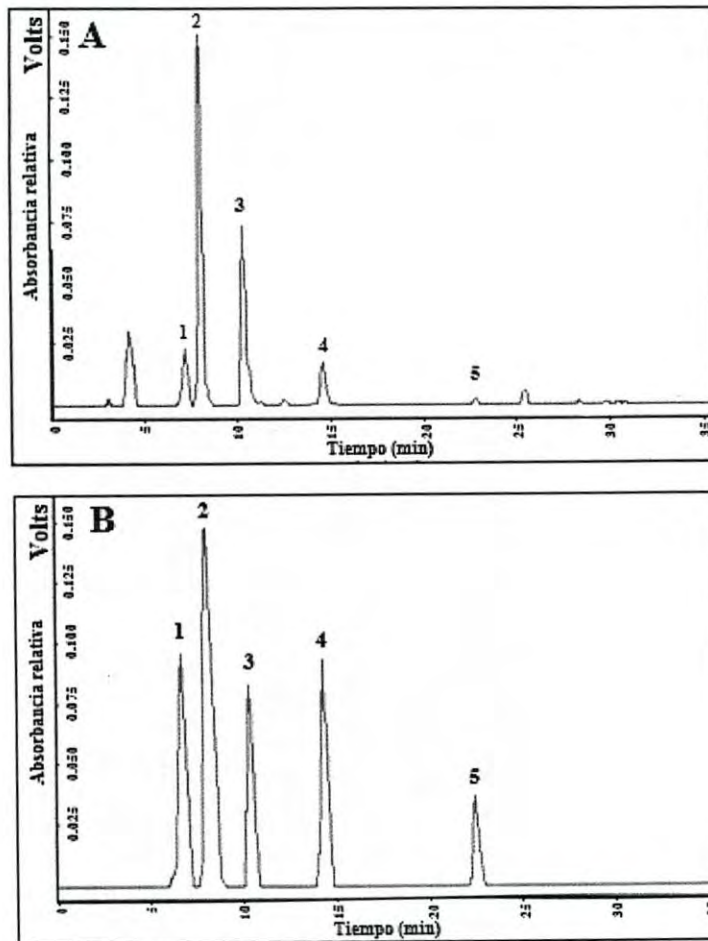


Figura 12. (A) Cromatograma de café verde (*Coffea arabica*) a 280 nm. (B) Cromatograma de estándares de referencia a 280 nm. Los picos corresponden a ácido cafeico (1), ácido clorogénico (2), cafeína (3), ácido ferúlico (4) y rutina (5).

**Tabla 1. Cuantificación de compuestos fenólicos y cafeína encontrados en las muestras de café (mg/g).**

Muestra	Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Ácido ferúlico	Rutina	Cafeína
Arabica Verde	127.16 ± 6.69 <sup>c</sup>	4.65 ± 0.24 <sup>c</sup>	5.58 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.24 ± 0.08 <sup>a</sup>	12.88 ± 0.56 <sup>a</sup>
Tostado francés	11.40 ± 0.58 <sup>a</sup>	2.30 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>	ND	15.28 ± 0.91 <sup>b</sup>
Tostado italiano	11.31 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	ND	17.39 ± 0.58 <sup>c</sup>
Caracol Verde (Arabica)	174.39 ± 16.5 <sup>e</sup>	6.65 ± 0.8 <sup>d</sup>	5.17 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.62 ± 0.14 <sup>b</sup>	15.64 ± 0.72 <sup>b</sup>
Tostado caracolillo	43.86 ± 1.80 <sup>b</sup>	7.01 ± 0.22 <sup>d</sup>	1.66 ± 0.03 <sup>b</sup>	ND	15.21 ± 0.39 <sup>b</sup>
Robusta Verde	90.81 ± 4.22 <sup>c</sup>	3.71 ± 0.08 <sup>b</sup>	6.18 ± 0.16 <sup>d</sup>	1.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	15.68 ± 0.10 <sup>b</sup>
Soluble	143.99 ± 9.92 <sup>d</sup>	33.77 ± 2.74 <sup>e</sup>	7.28 ± 0.36 <sup>e</sup>	ND	55.19 ± 2.30 <sup>d</sup>

Los valores son la media y ± desviación estándar de triplicados. Los valores en cada columna con diferentes letras (a-e) indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). ND = no detectado (índice de detección = 4.55 µg/mL).

valores de 165.60 mg/g de ácido clorogénico para grano de verde Arábica y valores de 2.62 a 7.20 mg/g de ácido clorogénico para granos de café tostados de la variedad arábica. El contenido de cafeína en el café francés e italiano fue de 15.21 a 17.38 mg/g, respectivamente, cantidad significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que el contenido de cafeína del grano verde Arábica (12.88 mg/g). En el caso del café verde Caracol y su café procesado (caracolillo), no se presentaron diferencias significativas en el contenido de cafeína de ambos ( $p > 0.05$ ) es decir el proceso de tostado (280°C) no afectó el nivel de cafeína. Casal *et al.* (2000), reportaron valores similares de cafeína para cafés Arábica tostados y una ligera reducción debido al proceso de tostado. Es decir, el tratamiento térmico no disminuye la cantidad de cafeína del café de la misma forma en como disminuye el contenido fenólico.

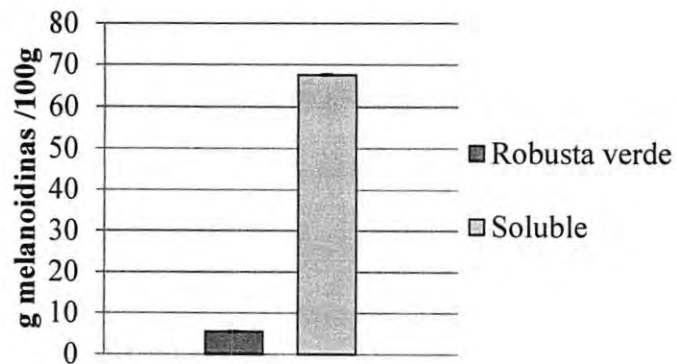
La cantidad de ácido clorogénico, ácido cafeico y cafeína en los cafés *Coffea robusta* fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las muestras de café soluble que en la de café verde sin procesar (Tabla 1). Esto es debido al efecto que tiene el proceso de secado en la elaboración del café soluble sobre la concentración de los compuestos. Al igual que con los cafés Arabica, los resultados obtenidos por la técnica de Folin-Ciocalteu siguieron la misma tendencia que éstos resultados.

#### 5.4 Contenido de Melanoidinas

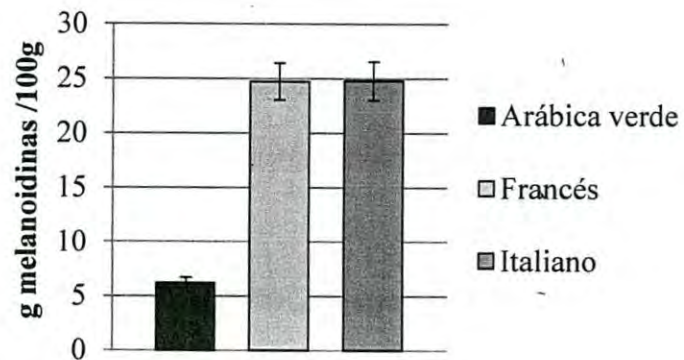
La cantidad de melanoidinas encontradas en el café tostado tipo italiano, tipo francés y caracolillo oscilaron de 24.75 a 30.52 g/100g (Figura 13). Bekedam *et al.* (2008)



(a)



(b)



(c)

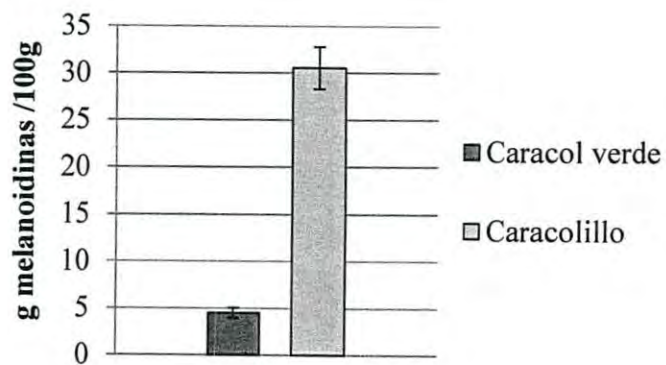


Figura 13. Contenido de melanoidinas para los granos de café verde *Coffea arabica* y *Coffea canephora* y cafés procesados. (a) muestras de café Arábica; (b) muestras de café Caracol; (c) muestras de café Robusta.

encontraron alrededor de 25 g de melanoidinas/100 g de café tostado. Sin embargo, otros autores (Tagliazucchi *et al.*, 2010) han reportado cantidades mayores (37.87 g/100 g) que las encontradas en el presente estudio. El café caracolillo presentó una concentración de melanoidinas significativamente mayor ( $p>0.05$ ) que el café tipo francés y el tipo italiano, lo cual se debe principalmente a la adición de azúcar durante la elaboración del mismo (López-Galilea *et al.*, 2007).

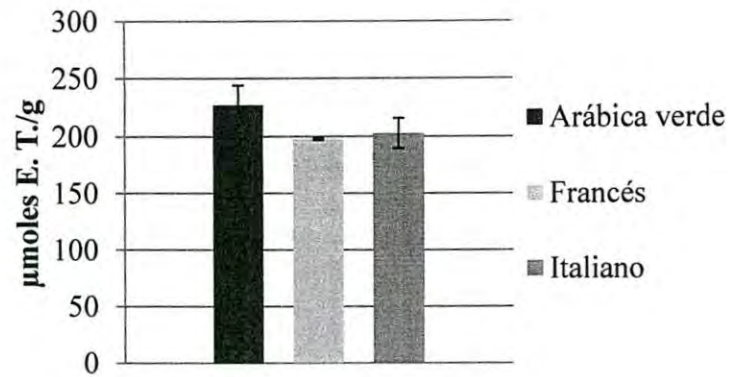
El café soluble no solo presentó una concentración de melanoidinas mayor que el café verde Robusta, sino que también presentó un contenido de melanoidinas mayor que todos los cafés analizados en este estudio ( $p>0.05$ ). Esto se debe a que durante el proceso de elaboración del café soluble, se concentran los componentes solubles presentes en los granos de café, incluyendo las melanoidinas (Mussatto *et al.*, 2011).

## 5.5 Métodos Químicos para Evaluar la Actividad Antioxidante

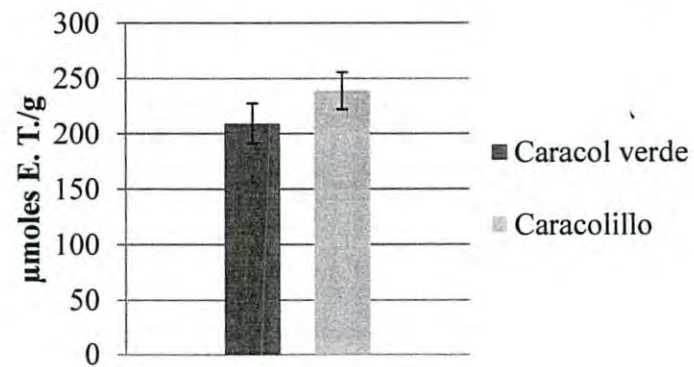
### 5.5.1 Método por el radical ABTS<sup>•+</sup>

Para los cafés procesados provenientes de los granos verdes Arabica, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el café tostado francés y el café tostado italiano (Figura 14) en la actividad antioxidante determinada por este método. Sin embargo, si se presentaron diferencias significativas entre el grano de café francés y el grano de café verde Arábica ( $p<0.05$ ). Los resultados de la actividad antioxidante

(a)



(b)



(c)

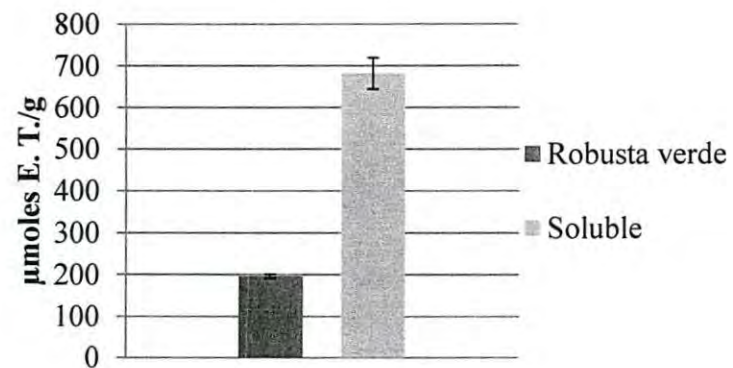


Figura 14. Valores de ABTS para granos de café verde *Coffea arabica* y *Coffea canephora* y cafés procesados expresados como µmol ET/g. (a) muestras de café Arábica; (b) muestras de café Caracol; (c) muestras de café Robusta.

antioxidante por ABTS para los cafés provenientes del grano verde Arábica y del grano Caracol verde, fueron mayores que los reportados por Pulido *et al.* (2003) (164.73  $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$ ) y menores que los encontrados por Pérez-Martínez *et al.* (2010) (296 - 445  $\mu\text{mol equivalentes Trolox/g}$ ). No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en la actividad antioxidante ejercida por el grano verde Caracol y el café caracolillo tostado. El mantenimiento de la capacidad antioxidante del café después del tostado se puede deber a que a pesar de que se pierden compuestos con capacidad antioxidante durante el proceso, la capacidad antioxidante de las infusiones de café se pueden mantener, o en algunos casos, mejorar, debido al desarrollo de compuestos con actividad antioxidante, incluyendo los productos de la reacción de Maillard (Votavova *et al.*, 2009). El café soluble presentó la actividad antioxidante más alta ( $p<0.05$ ) (Figura 14). En un estudio realizado por Vignoli *et al.* (2011), se encontró que los valores de ABTS para el café soluble osciló entre 1 110.27 y 1 310.03  $\mu\text{mol equivalentes ET/g}$ , lo cual es mayor a lo encontrado en las muestras analizadas en este estudio. Dicha diferencia se puede deber las diferencias geográficas como el clima y otros factores que pueden provocar estrés en las plantas. En el estudio de Vignoli *et al.* (2011), la cantidad de fenoles fue ligeramente mayor (18.54 g ácido gálico/100 g) que los reportados en este estudio.

#### 5.5.2 Método por el radical DPPH\*

No se presentaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) de la actividad determinada por este método entre los tres tipos de granos de café no procesados (Arábica verde,

Caracol verde y Robusta verde). Se encontró que la actividad antioxidante del café tostado francés determinada por éste método, fue mayor a la que presentó el café tipo italiano ( $p < 0.05$ ). El café caracolillo tostado y el café verde variedad arábica presentaron una actividad antioxidante mayor que el café tipo francés y el tipo italiano (Figura 15). El café caracolillo es diferente del resto de los cafés convencionales. La elaboración de café caracolillo implica la adición de azúcar antes de llevar a cabo el tostado. Como resultado, la actividad antioxidante alta observada para dicho café se puede deber a la adición de azúcar, la cual estimula la formación de melanoidinas, las cuales poseen actividad antioxidante (López-Galilea *et al.*, 2007).

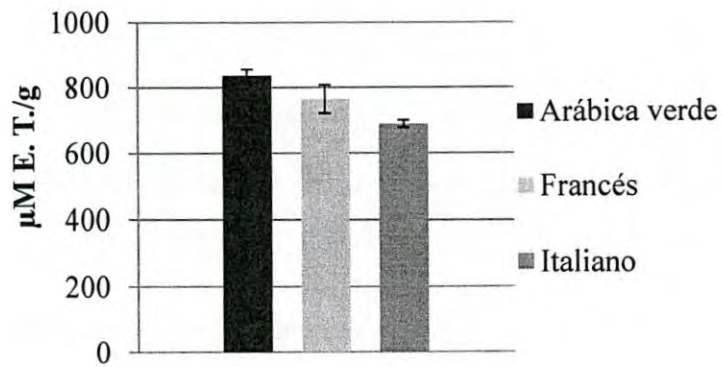
En el caso de los cafés variedad Robusta, se observó que el café soluble presentó una actividad antioxidante significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la exhibida por su grano verde correspondiente. Como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de elaboración del café soluble se concentran los compuestos solubles del café tostado Robusta, incluyendo aquellos que poseen actividad antioxidante. Como resultado, la actividad antioxidante puede aumentar

## 5.6 Método Biológico para Evaluar la Actividad Antioxidante

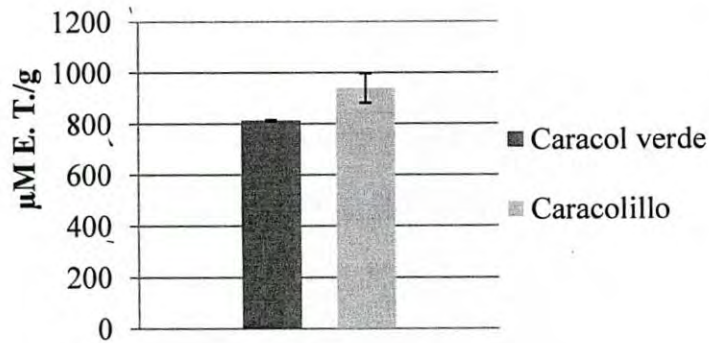
### 5.6.1 Estandarización de la Técnica de Actividad Antioxidante Celular

Como se mencionó anteriormente, el proceso de estandarización de la técnica consistió en determinar la concentración de DCFH-DA y  $H_2O_2$  a utilizar, así como el

(a)



(b)



(c)

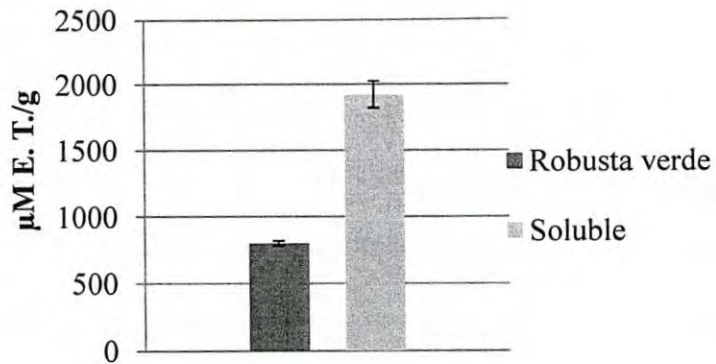


Figura 15. Valores de DPPH\* para granos de café verde *Coffea arabica* y *Coffea canephora* y cafés procesados (a) muestras de café Arábica; (b) muestras de café Caracol; (c) muestras de café Robusta.

tiempo de incubación de las células después de la adición de dichos compuestos. Como se puede observar en la Figura 16, la fluorescencia más baja se presentó con la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de DCFH-DA. Por otro lado, a la concentración de 5  $\mu\text{M}$  de DCFH-DA, se presentó la máxima fluorescencia. A las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ , no se observó un aumento de la fluorescencia. Debido a que con las concentraciones altas de DCFH-DA, no se detectó un aumento en la fluorescencia y esta permaneció estable, dichas concentraciones se descartaron.

En este experimento, no se utilizó ningún inductor de estrés oxidativo. Al emplear un inductor de estrés (como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la fluorescencia aumenta, ya que se producen más radicales libres que oxidan al DCFH, formando de esta forma un mayor número de moléculas del compuesto fluorescente DCF (Takanashi *et al.*, 1997). La concentración de DCFH-DA más adecuada a utilizar, sería aquella lo suficientemente baja para mostrar un aumento apreciable de la fluorescencia al utilizar un inductor de estrés oxidativo. Por lo anterior, se seleccionó la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de DCFH-DA Hui y Liu (2007), pioneros en esta técnica, utilizaron un tiempo de incubación de 60 minutos con células HepG2. Sin embargo, se desconocía si este tiempo sería el más adecuado para las células C3F.6. Con la cinética, se pudo determinar que el mejor tiempo de incubación fue de 30 minutos, debido a que fue en donde se presentó mayor fluorescencia (Figura 17).

En las Figuras 18, 19 y 20, se presentan los histogramas obtenidos en la cinética de incubación de las células con diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM). En cada uno de los histogramas, se presentan dos picos, uno de color verde y otro de color azul. El pico verde, representa la fluorescencia producida por las células muertas,

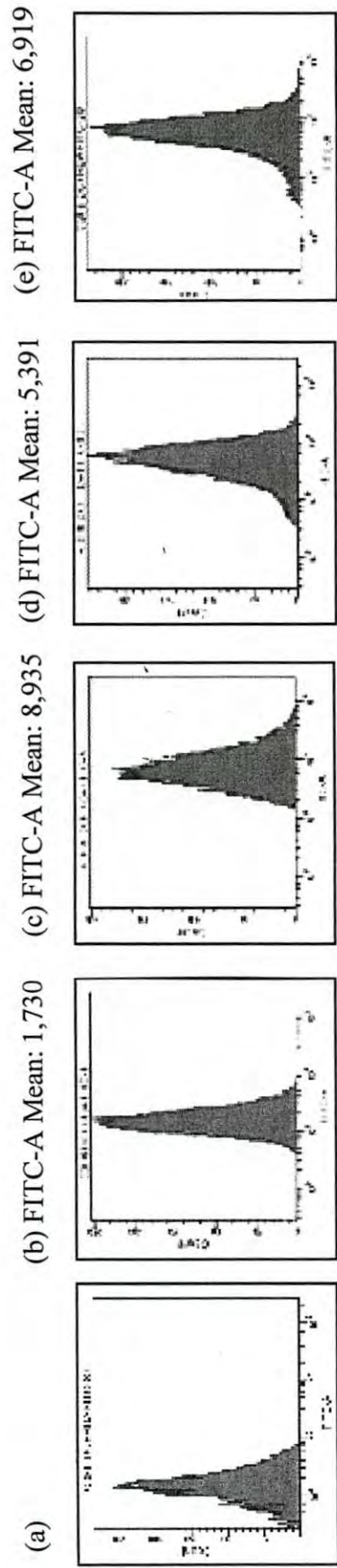


Figura 16. Curva de DCFH-DA. (a) Células sin teñir; (b) células con 1  $\mu\text{M}$  de DCFH-DA; (c) células con 5  $\mu\text{M}$  de DEFH-DA; (d) células con 10  $\mu\text{M}$  de DEFH-DA; (e) células con 20  $\mu\text{M}$  de DEFH-DA.



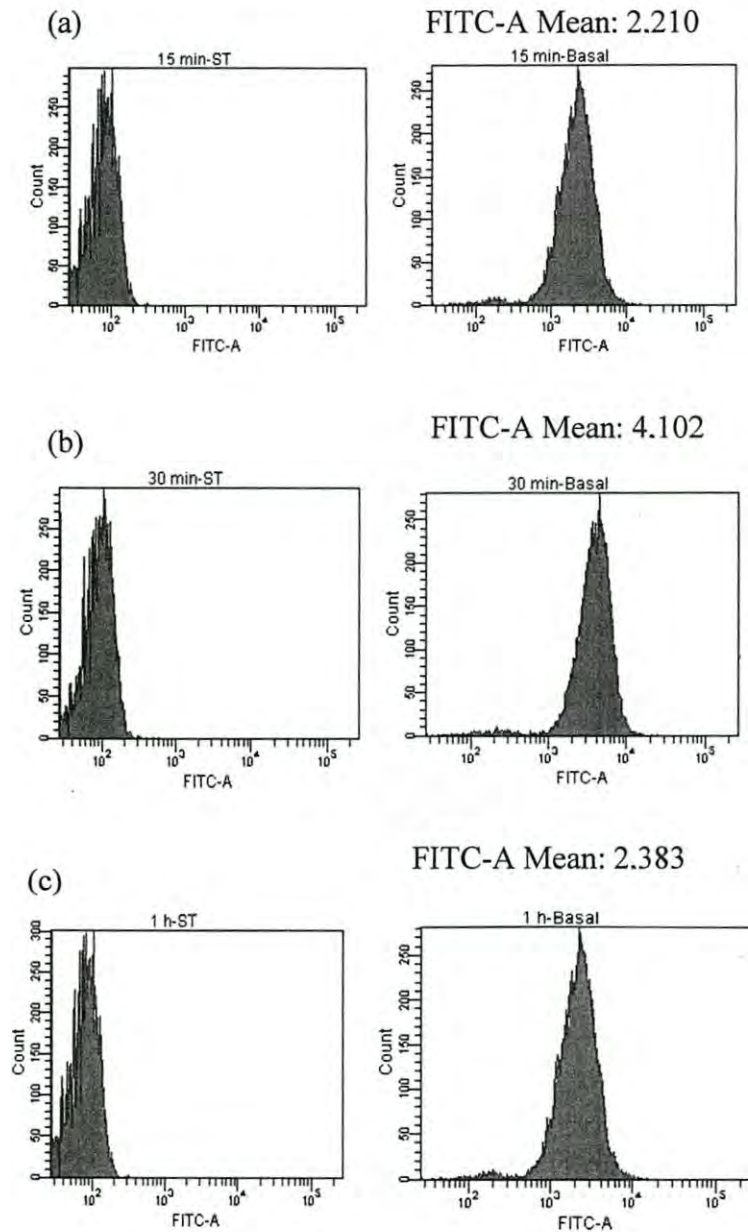


Figura 17. Cinética con DCFH-DA. (a) células sin teñir y células con DCFH-DA  $1 \mu\text{M}$  incubadas por 15 min; (b) células sin teñir y células con DCFH-DA  $1 \mu\text{M}$  incubadas por 30 min; (c) células sin teñir y células con DCFH-DA  $1 \mu\text{M}$  incubadas por 60 min.

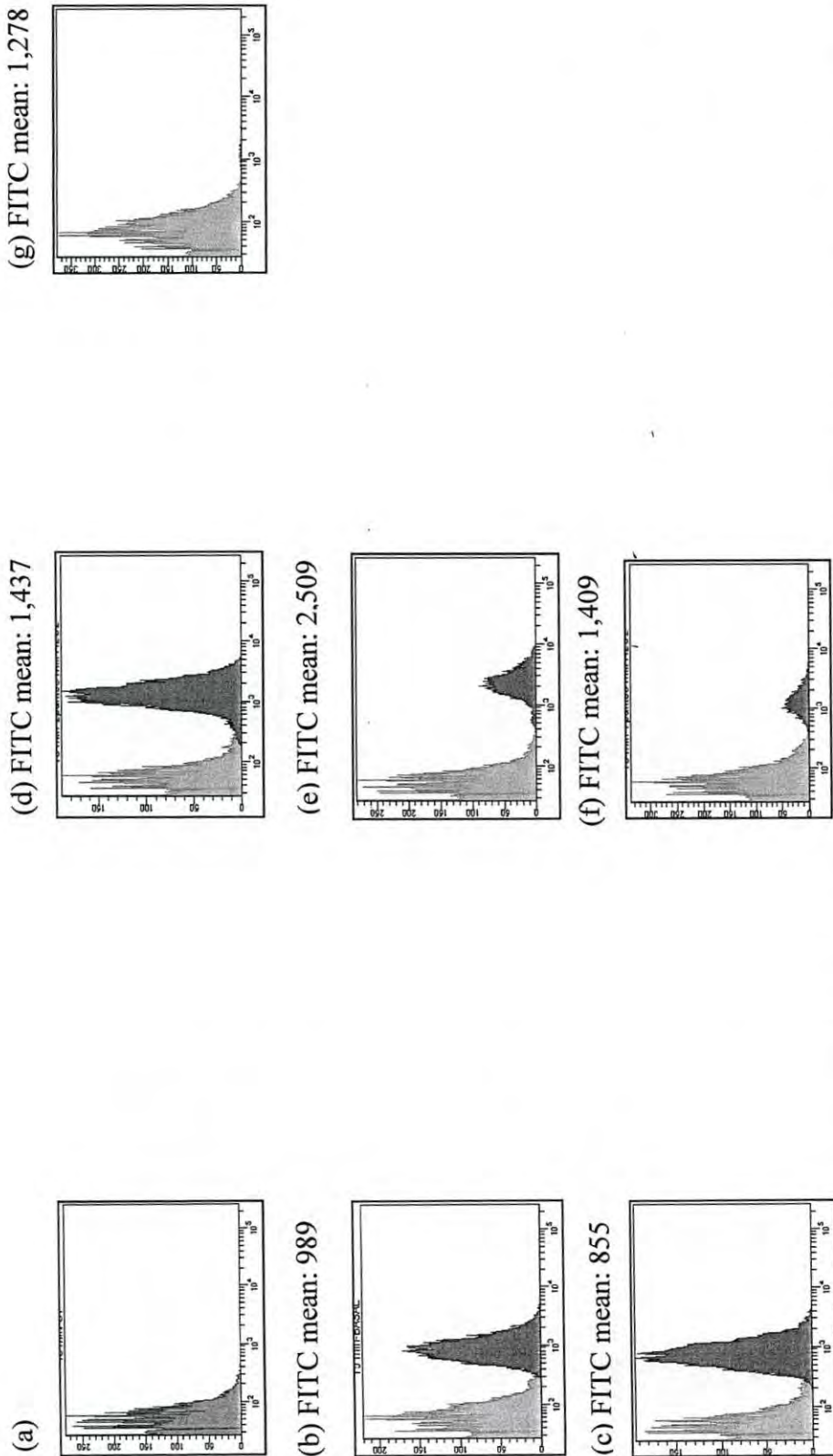


Figura 18. Curva de C3F.6 incubadas con  $H_2O_2$  por 15 min. (a) células sin teñir; (b) células con DCFH-DA y sin  $H_2O_2$ ; (c) células con DCFH-DA con  $H_2O_2$ ; (d) células con DCFH-DA con 2.5 mM  $H_2O_2$ ; (e) células con DCFH-DA con 5 mM  $H_2O_2$ ; (f) células con DCFH-DA con 7.5 mM  $H_2O_2$ ; (g) células con DCFH-DA con 10 mM  $H_2O_2$ .

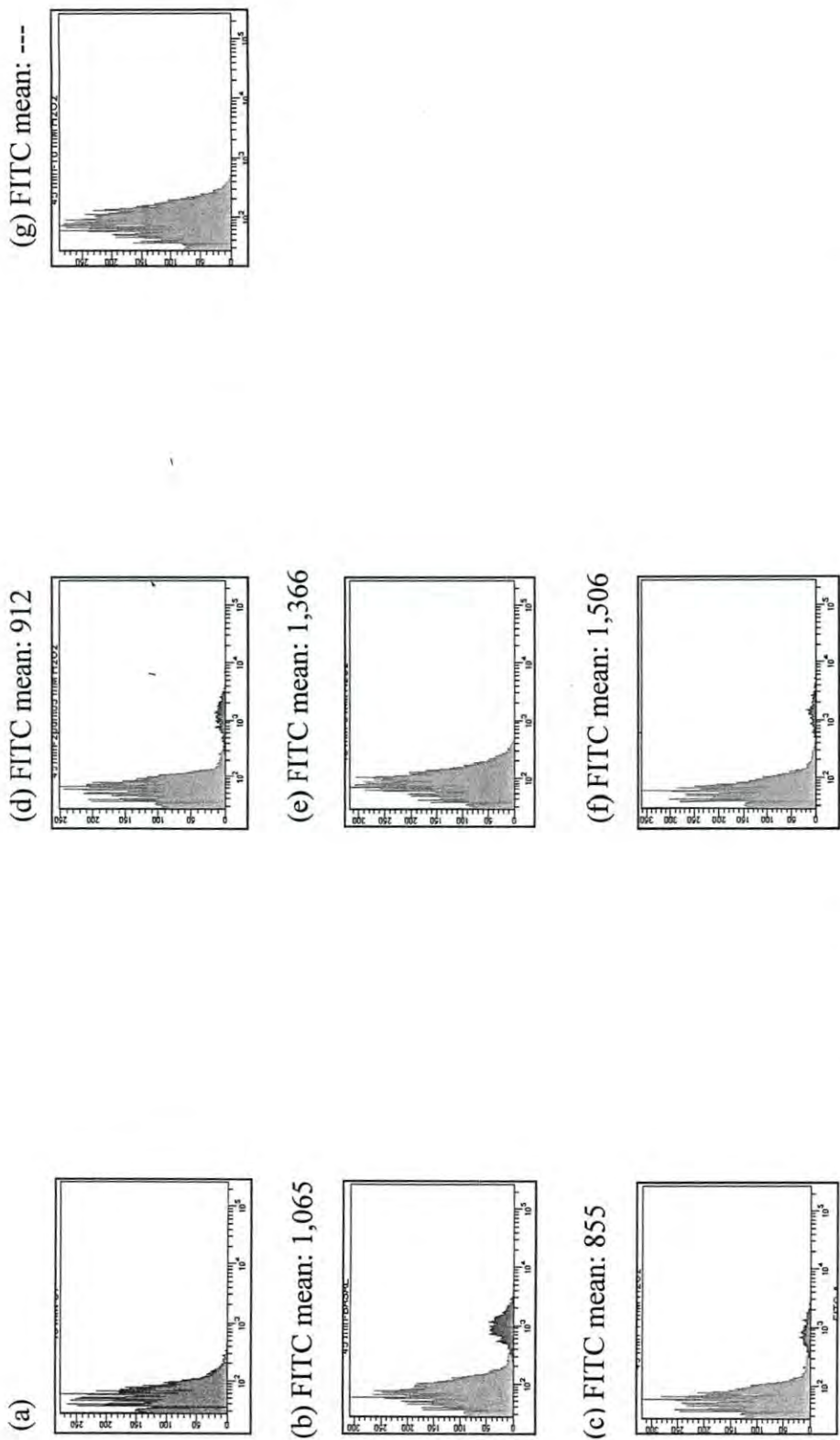


Figura 19. Curva de C3F.6 incubadas con  $H_2O_2$  por 30 min. (a) células sin teñir; (b) células con DCFH-DA y sin  $H_2O_2$ ; (c) células con DCFH-DA con 2.5 mM  $H_2O_2$ ; (d) células con DCFH-DA con 5 mM  $H_2O_2$ ; (e) células con DCFH-DA con 7.5 mM  $H_2O_2$ ; (f) células con DCFH-DA con 10 mM  $H_2O_2$ ; (g) células con DCFH-DA con 10 mM  $H_2O_2$ .

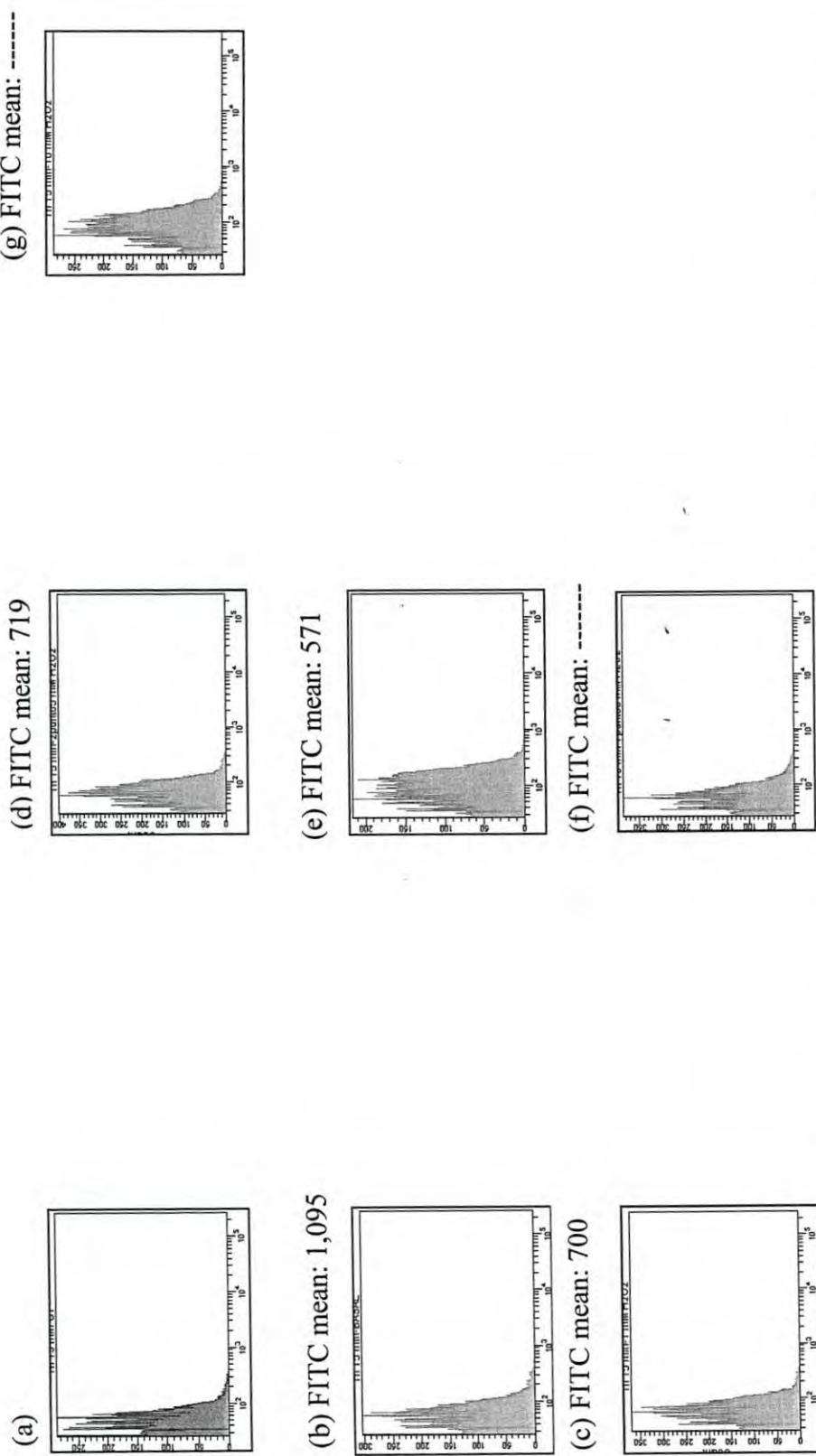


Figura 20. Curva de C3F.6 incubadas con  $H_2O_2$  por 60 min. (a) células sin tefir; (b) células con DCFH-DA y sin  $H_2O_2$ ; (c) células con DCFH-DA con 1 mM de  $H_2O_2$ ; (d) células con DCFH-DA con 2.5 mM  $H_2O_2$ ; (e) células con DCFH-DA con 5 mM  $H_2O_2$ ; (f) células con DCFH-DA con 7.5 mM  $H_2O_2$ ; (g) células con DCFH-DA con 10 mM  $H_2O_2$ .

mientras que el pico azul representa la de las células vivas. La altura de los picos es directamente proporcional al número de células evaluadas. Por lo tanto, entre más alto sea el pico, mayor es el número de células evaluadas.

Como se puede observar en la Figura 17, a los 15 minutos de incubación se observa una disminución de la altura del pico azul a partir de la concentración de 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lo anterior indica que con las concentraciones más altas evaluadas, disminuye el número de células vivas, lo que indica que se presenta mayor muerte celular. En la misma figura, se observa también que las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con las cuales se presentó mayor fluorescencia fue la de 2.5, 5 y 7.5 mM. En las Figuras 18 y 19, se observa que con todas las concentraciones evaluadas, se presenta una muerte celular considerable. Por todo lo anterior, se encontró que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el tiempo de incubación más adecuado a utilizar, fueron 2.5 mM por 15 minutos, debido a que con estas condiciones, se presenta una fluorescencia elevada y al mismo tiempo, se produce menos daño celular.

### 5.6.2 Actividad Antioxidante en Células de Extractos de Café

Con la finalidad de evaluar la actividad antioxidante de los extractos de café, se utilizaron las condiciones establecidas anteriormente. En la Figura 20, se observan los resultados obtenidos para esta cinética. Como se puede observar, se presentó una variabilidad en la actividad de los extractos a los diferentes tiempos evaluados. Sin embargo, para los dos extractos y para el control positivo (ácido cafeico), se observó un efecto máximo a las 3 h. En los tiempos de 12 y 24 h, se observó que las poblaciones celulares sufrían cambios, lo cual indica que se produce daño de las células. Lo anterior, no se presentó al incubar por tiempos cortos. A los 30 minutos de incubación, el

extracto de café tostado caracolillo presentó actividad antioxidante en células significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que el ácido cafeico y que el café soluble. El café soluble y el ácido cafeico mostraron tener efecto hasta la hora de incubación. La actividad antioxidante del café caracolillo tostado se mantuvo constante hasta las 3 h de incubación. El café soluble comenzó a mostrar actividad antioxidante a la hora de incubación, manteniéndola constante hasta las 3 h y disminuyendo posteriormente. Basándose en que el café caracolillo mostró actividad en menor tiempo que el café soluble, se podría considerar que, en un sistema celular, el café caracolillo mostró ser un mejor antioxidante que el café soluble, contrario a lo encontrado con las técnicas de ABTS y DPPH, es decir, la actividad antioxidante del extracto de café soluble fue mayor que la del café caracolillo. Los ensayos químicos realizados arrojaron resultados diferentes. Este comportamiento se ha reportado en otros estudios al comparar los resultados de la CAA con otra prueba química, el ensayo la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Wolfe y Lui, 2007; Song *et al.*, 2010; Blasa, 2011). Como se mencionó anteriormente, la limitante de las pruebas químicas reside en que no toman en cuenta el pH y las temperaturas fisiológicas, ni otros aspectos como la biodisponibilidad, el consumo y el metabolismo de los compuestos antioxidantes (Liu y Finley, 2005). Por lo tanto, dichas desventajas que tienen las pruebas químicas, pueden hacer que se presenten diferencias en los resultados con las pruebas biológicas, resultando estas últimas con mayor validez.

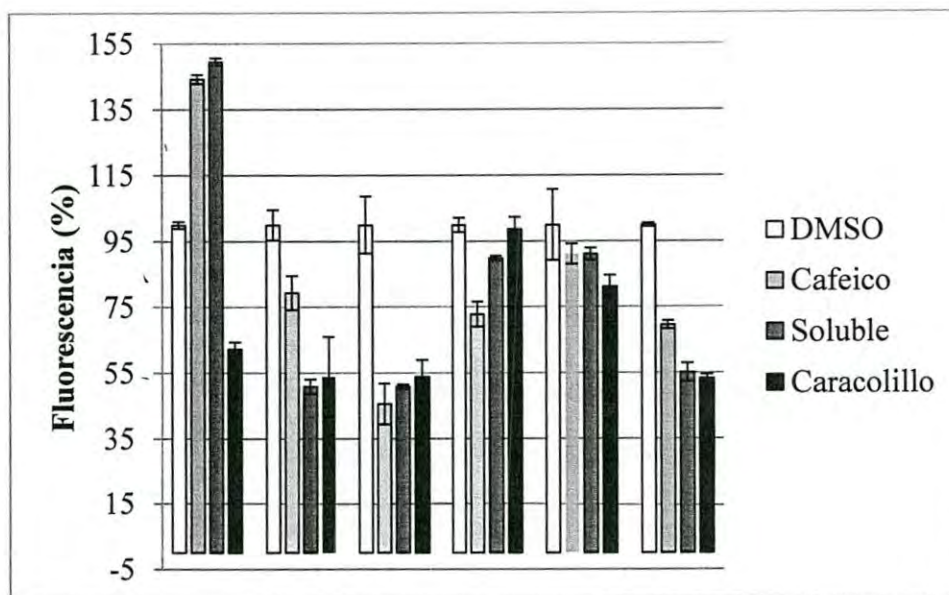


Figura 21. Cinética de 0.5 a 24 h de incubación con dimetilsulfóxido (DMSO), ácido cafeico, café soluble y café caracolillo.

## VI. CONCLUSIONES

La concentración de fenoles fue menor en los cafés tostados en comparación con sus correspondientes granos verdes. La cafeína, el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido clorogénico, fueron los principales compuestos fenólicos que se encontraron en los cafés verdes y procesados. La rutina se encontró solamente en los granos de café verde.

El contenido de melanoidinas fue superior en los granos de cafés tostados que en los granos de café verde, siendo el café soluble el que presentó el mayor contenido. El café caracolillo presentó el contenido mayor de melanoidinas en comparación con los cafés tostados francés e italiano.

En la mayoría de los casos, se observó que el proceso de tostado no afectó negativamente a la actividad antioxidante.

Se estableció un método antioxidante celular utilizando la línea celular C3F.6, con el cual se logró determinar la actividad antioxidante biológica de los extractos de café procesados. Los cafés caracolillo y soluble, mostraron reducir la formación de ROS en las células.

Los resultados del presente trabajo indican que las propiedades antioxidantes de los fitoquímicos presentes en los cafés estudiados de *Coffea arabica* y *Coffea robusta* no fueron afectadas por el proceso.



## VII. RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad antioxidante individual química y biológica de los principales compuestos fenólicos presentes en los cafés *Coffea arabica* y *Coffea robusta*.

Evaluar la actividad antioxidante química y biológica de otros tipos cafés procesados y comercialmente importantes. Además, se recomienda utilizar diferentes líneas celulares en el estudio de la evaluación de la actividad antioxidante biológica.

## VIII. REFERENCIAS

- Agarwal, R., Lata, S., Gupta, M. y Singh P. 2010. Removal of melanoidin present in distillery effluent as a major colorant: A Review. *Journal of Environmental Biology*, 31: 521-528.
- Albano, E. 2006. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65: 278–290.
- Alves, R.C., Costa, A.S.G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Nuñez, M. J. y Oliveira, B. 2010. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 12221-12229.
- Anzueto, F., Baumann, T.W., Graziosi, G., Piccin, C.R., Söndahl, M.R. y Van der Vossen, H.A.M. 2005. The Plant. In: *Espresso Coffee. The Science of Quality*. Elsevier Academic Press. California, USA. 21-86 p.
- Arnao, M.B., Cano, A. y Acosta, M. 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research*, 31: 89-96.
- Arya, M. y Rao, J.M. 2007. An impression of coffee carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 51–67.
- Badui-Dergal, S. 2006. “Química de los Alimentos”. Editorial Pearson. Naucalpan de Juárez, México. 289-293 p.

- Baggenstoss, J., Poisson, L., Luethi, R., Perren, R. y Escher, F. 2007. Influence of water quench cooling on degassing and aroma stability of roasted coffee. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 6685–6691.
- Baxter, J.H. 1995. Free amino acid stability in reducing sugar systems. *Journal of Food Science*, 60: 405–407.
- Bekedam, E.K., Schols, H.A., Caemmerer, B., Kroh, L.W., Van Boekel, M.A.J.S. y Smit, G. 2008. Electron Spin Resonance (ESR) Studies on the Formation of Roasting-Induced Antioxidative Structures in Coffee Brews at Different Degrees of Roast. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 4597–4604.
- Bekedam, E.K., Schols, H.A., Van Boekel, M.A.J.S. y Smit, G. 2008. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 2055–2063.
- Bekedam, E.K., Roos, E., Schols, H.A., Van Boekel, M.A.J.S. y Smit, G. 2008. Low Molecular Weight Melanoidins in Coffee Brew. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 4060–4067.
- Bhrmental, M. Special Expert I of the German Federal Institute for Drugs and Medical Advice. En: *Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Washington, USA; 1998. P:489.
- Blanco, M., Hagggar, J., Moraga, P., Madriz, J.C. y Pavón, G. 2003. Morfología del café (*coffea arabica* l.), en lotes comerciales. *Nicaragua Agronomía Mesoamericana*, 14: 97-103.

- Blasa, M., Angelino, D., Gennari, L. y Ninfali, P. 2011. The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): A new approach to bioavailability and synergy of phytochemicals and botanical extracts. *Food Chemistry*, 125: 685–691.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. y Berset, C. 1997. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30: 609-615.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28: 25-30.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsddek, A., Zyzelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S. y Janda, B. 2009. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *European Food Research and Technology*, 228: 913–922.
- Burda, S. y Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2774-2779.
- Butterfield, D.A., Perluigi, M. y Sultana, R. 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *European Journal of Pharmacology*, 545: 39–50.
- Cantos, E., García-Viguera, C., Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F.A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4606–4612.
- Cao, G., Alessio, H.M. y Culter, R.G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 14: 303-311.

- Casal, S., Oliveira B. y Ferreira M.A. 2000. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*. 68: 481-485.
- Castillo, M.D., Ames J.M. y Gordon M. 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3698-3703.
- Chitindingu, K., Ndhlala, A.R., Chapano, C., Benhyura, M.A. y Muchuweti, M. 2006. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *amaranthus hybridus* (pigweed), *brachiaria brizantha* (upright brachiaria) and *panicum maximum* (guinea grass). *Journal of Food Biochemistry*, 31: 206–216.
- Czerny, M., Mayer, F. y Grosch, W. 1999. Sensory study on the character impact odorants of roasted 76inifer coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 695–699.
- Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berté, F. y Gazzani, G. 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 1449–1454.
- Davidson, S.M. y Duchon, M.R. 2007. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circulation Research*, 100: 1128–1141.
- Del Castillo, M.D., Ames, J.M. y Gordon, M.H. 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. . *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 3698-3703.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. y Mérillon, J.M. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 1768–1774.

- Dutra, E.R., Oliveira, L.S., Franca, A.S., Ferraz, V.P. y Afonso, R.J.C. 2001. A preliminary study on the feasibility of using the composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast. *Journal of Food Engineering*, 47: 241–246.
- Dupas, C.J., Marsset-Baglieri, A.C., Ordonaud, C.S., Ducept, F.M.G. y Maillard, M.N. 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *Journal of Food Science*, 71: S253–S258.
- El-Saadani, M., Esterbauer, H., El-Sayed, M., Goher, M., Nassar, A.Y. y Jurgens, G.A. 1989. Spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *Journal of Lipid Research*, 30: 627-630.
- Eruslanov, E. y Kusmartsev, S. 2010. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry; *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, a part of Springer Science Business Media, LLC. 57-69 p.
- Franca, A.S., Mendonça, J.C.F. y Oliveira, S.D. 2005. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *Food Science and Technology*, 38: 709–715.
- Frankel E.N. y Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 80: 1925-1941.
- Fujioka, K. y Shibamoto, T. 2006. Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 6054–6058.
- Fujioka, K. y Shibamoto, T. 2008. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, 106: 217–221.

- Fukumoto, L.R. y Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
- Gandhi, S. y Wood, N.W. 2005. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 14: 2749–2755.
- Gee, J.M. y Johnson I.T. 2001. Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1245-1255.
- Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroza, M.L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B. y Guiraud, J.P. 2007<sup>a</sup>. Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 289–296.
- Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroza, M.L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B. y Guiraud, J.P. 2007<sup>b</sup>. Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 297–307.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. y Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23: 1719–1726.
- Hawley T. S. y Hawley R. G. 2004. *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology*, Volume 263. 13 p.
- Hernandez J.A., Heyd B., Irlles C., Valdovinos B. y Trystram G. 2007: Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting. *Journal of Food Engineering*, 78: 1141–1144.
- Hernández, J.A., Heyd, B. y Trystram, G. 2008. On-line assessment of brightness and surface kinetics during coffee roasting. *Journal of Food Engineering*, 87: 314–322.
- Hu, C., Zhang, Y. y Kitts, D. 2000 Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *Henonis* leaf extract in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3170- 3176.

- Hwang, E.S. y Bowen, P.E. 2007. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 27–50.
- Johnston, K.L., Clifford, M.N. y Morgan, L.M. 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 728–733.
- Joon-Kwan, M. y Shibamoto, T.J. 2009. Role of Roasting Conditions in the Profile of Volatile Flavor Chemicals Formed from Coffee Beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 5365-5369.
- Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Starostina, E., Shcherbakov, S. y Versprille, B. 2005. Integrated biological (anaerobic–aerobic) and 79inife-chemical treatment of baker’s yeast wastewater. *Water Science & Technology*, 52: 273–280.
- Karadag, A. Ozcelik, B. y Saner S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41–60.
- Kumazawa, K. y Masuda, H. (2003). Investigation of the change in the flavor of a coffee drink during heat processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2674–2678.
- Kuskoski, M.E., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini- Filho, J. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Revista Brasileña Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 25: 726–732.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer, A.E.M.F. y Rietjens, I.M.C.M. 2001. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 31: 869-881.



- Leong, L.P. y Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76: 69–75.
- Liang, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Liu, H. y Wu, Z. 2009. Variables affecting melanoidins removal from molasses wastewater by coagulation/flocculation. *Separation and Purification Technology*, 68: 382–389.
- Liu, R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134: 3479S– 3485S.
- Liu, R.H. y Finley, J. 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4311–4314.
- López-Galilea, I., Paz de Peña, M. y Cid, C. 2007 Correlation of Selected Constituents with the Total Antioxidant Capacity of Coffee Beverages: Influence of the Brewing Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6110-6117.
- Mabry, T. J. y Markham, K. R. 1968. Flavonoids from Bauhinia species. *Tetrahedron* 24: 823-826
- Mahinda, W. y Shahidi, F. 2000. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70: 17-26.
- Materska, M. y Perucka, I. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1750–1756.
- Mckee, T. y Mckee, J.R. 2003. *Bioquímica: la base molecular de la vida*. Editorial McGraw Hill. México D.F. 319-329 p.

- Michalak, A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 523-530.
- Molina-Quijada, D.M.A., Medina-Juárez, L.A., González-Aguilar, G.A., Robles-Sánchez, R.M. y Gámez-Meza N. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis 8linífera L.*) de mesa cultivada en el noroeste de México. *CyTA – Journal of Food*, 8:57–63.
- Montavon, P., Mauron, A.F., Duruz, E. 2003. Changes in green coffee protein profiles during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2335–2343.
- Murray, R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell, V. W. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Twenty-sixth edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill. 92-102.
- Mussatto, S.I., Machado, E. M. S., Martins, S. y Teixeira, J. S. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technology*. 4:661–672.
- Nelson, S. K., Bose, S. K. Grunwald, G. K., Myhill, P., McCord, J. M. 2006. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine* 40; 341 – 347.
- Oliveira, A. L., Cabral, F. A., Eberlin, M. N. y Cordello, H. M. A. B. 2009. Sensory evaluation of black instant coffee beverage with some volatile compounds present in aromatic oil from roasted coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29:76–80.
- Ozgen M. Reese, R.N. Tulio, A.Z. Scheerens J.C. y Miller A.R. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant

- Power (FRAP) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1151-1157.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R. y Roussos, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6: 153–162.
- Penckofer, S., Schwertz, D. y Florczak, K. 2002. Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 16: 68–85.
- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., Paz de Peña, M., Cid, C. y Kroh, L.W. 2010. Influence of Brewing Method and Acidity Regulators on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 2958–2965.
- Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 2003. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 80: 1007-1012.
- Pinchuk, I. y Lichtenberg, D. 2002. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progress in Lipid Research*, 41: 279-314.
- Pulido, R., Hernandez-Garcia, M. y Saura-Calixto, F. 2003. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57: 1275–1282.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. y Pridham, J.B. 1995. The relative antioxidant activities of plantderived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22: 375–383.
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- Richelle, M., Tavazzi, I. y Offord, E. 2001. Comparison of the antioxidant activity of comunly consumed polyphenolic beverages prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3438-42.
- Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P. y Mastrocola, D. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, 90: 74–80.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* , 16: 144-158.
- Song W., Derito C.M., Liu M.K., He X., Dong M. y Liu R.H. 2010. Cellular Antioxidant Activity of Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6621–6629.
- Squadrito, G.L.,Cueto, R., Splenser, A.E.,Valavanidis, A., Zhang, H.,Uppu,y Pryor W.A. 2000. Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the Mechanism of Neuroprotection by Uric Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376: 333–337.

- Sripriya, G., Chandrasekharan, K., Murty, V.S. y Chandra, T.S. 1996. ESR spectroscopic studies on free radical quenching action of finger millet (*Eleusine coracana*). Food Chemistry, 47: 537- 540.
- Svilaas A., Sakhi A.K., Andersen L.F., Svilaas, T.E.C., Ström E.C. y Jacobs, D.R. 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. Journal of Nutrition, 134: 562–567.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A. 2010. Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 2513–2519.
- Takanashi, T., Ogura, Y., Taguchi, H., Hashizoe, M. y Honda, Y. 1997. Fluorophotometric Quantitation of Oxidative Stress in the Retina In Vivo. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 38: 2721-2728.
- Van Dam, R.M. 2006. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 16: 69–77.
- Vieira, H.D. 2006. Plant-Parasitic Nematodes of Coffee; Coffee: The Plant and its Cultivation. Springer Science Business Media B.V. 3-18 p.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G., Benassi, M.T. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidines in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. Food Chemistry, 124: 863-868.
- Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C. W. 2007. Fundamentos de bioquímica. Editorial Médica Panamericana. México D.F. 585- 587 p.

Votavová, L., Voldrich, M., Sevcik, R., Cizcova, H., Mlejnecka, J., Stolar, M. y Fleisman, T. 2009. Changes on the antioxidant capacity of robusta coffee during roasting. *Czech Journal of Food Science*, 27: S49-S52.

Wang, G., Gong, Y., Burczynski F.J. y Hasinoff B.B. 2008. Cell lysis with dimethyl sulphoxide produces stable homogeneous solutions in the dichlorofluorescein oxidative stress assay. *Free Radical Research*, 42: 435-441

Wolfe K.L. y Liu R.H. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 8896-8907.

[www.aserca.gob.mx](http://www.aserca.gob.mx)

[www.cefp.gob.mx](http://www.cefp.gob.mx)

[www.ico.org](http://www.ico.org)

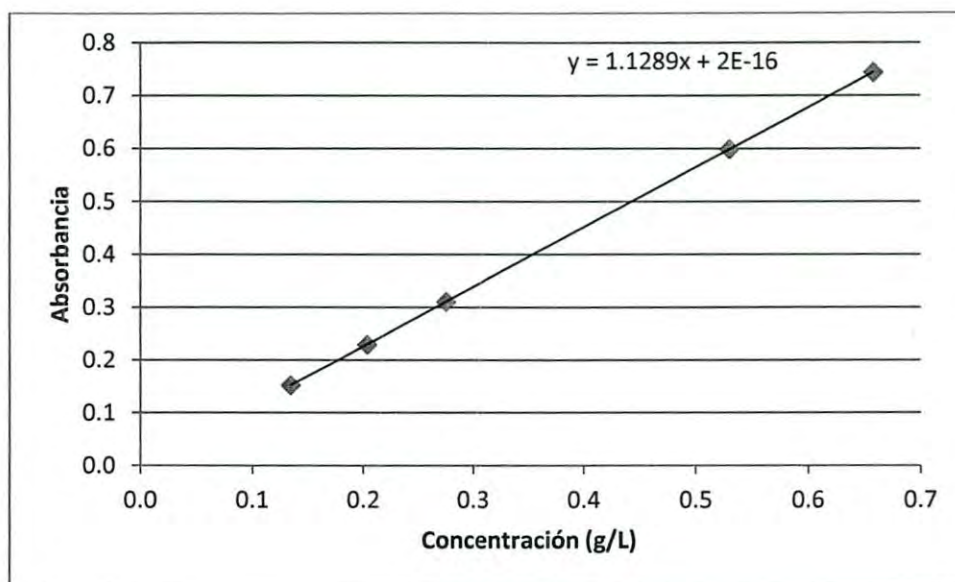
[www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)

[www.worldtradercoffee.com](http://www.worldtradercoffee.com)

Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, K.G. y Shibamoto, T. 2004. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 592–596.

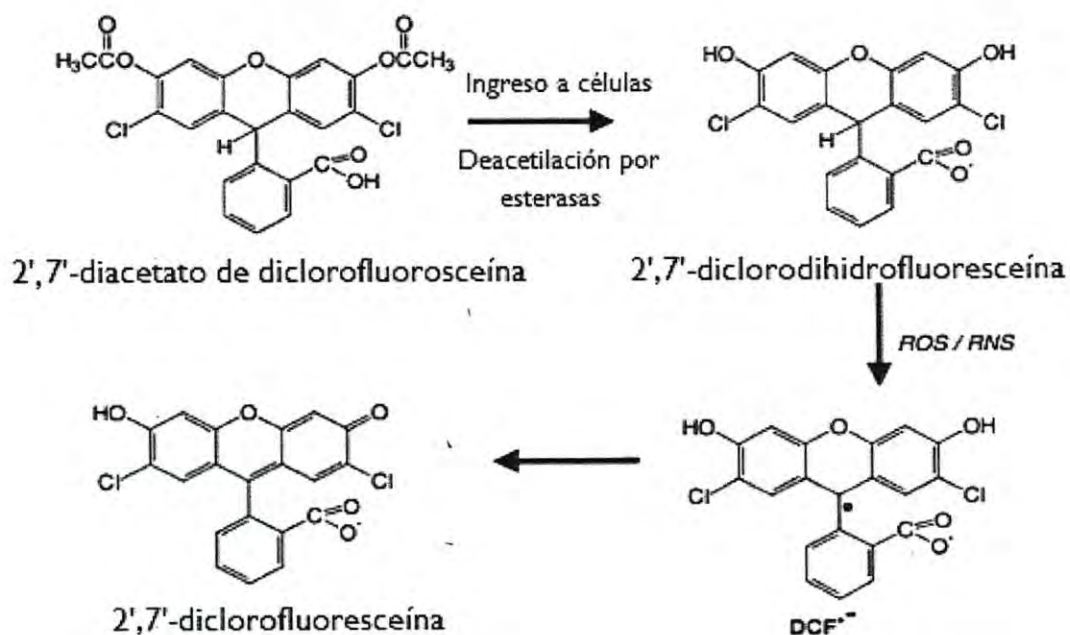
## ANEXO 1

Curva de calibración de melanoidinas a 420 nm.



## ANEXO 2

Conversión de DCFH-DA al producto fluorescente DCF.



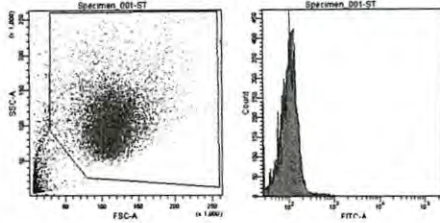
El diacetato de diclorofluoresceína es hidrolizado por esterasas celulares a 2,7-diclorodihidrofluoresceína, cuya oxidación por las especies reactivas de oxígeno o por las especies reactivas de nitrógeno (ROS/ RNS), produce el compuesto fluorescente DCF (dichlorofluorescein, o 2,7-diclorofluoresceína) por medio del radical intermediario DCF<sup>•-</sup>.



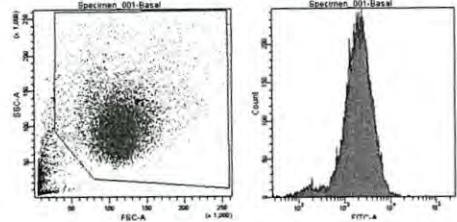
### ANEXO 3

Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 0.5 h.

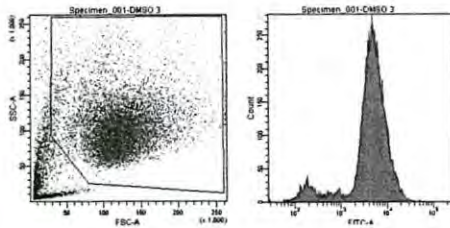
Sin teñir



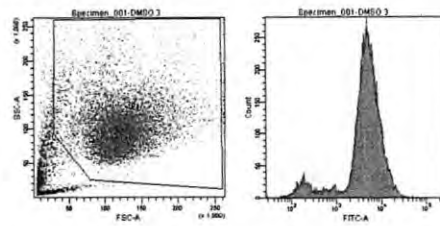
Basal



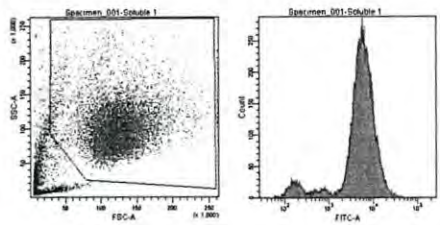
Control con DMSO



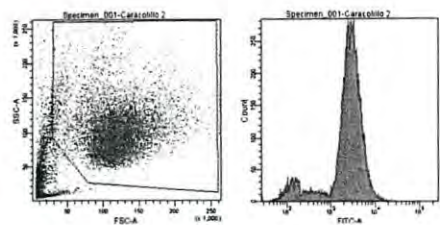
Ácido cafeico



Café soluble

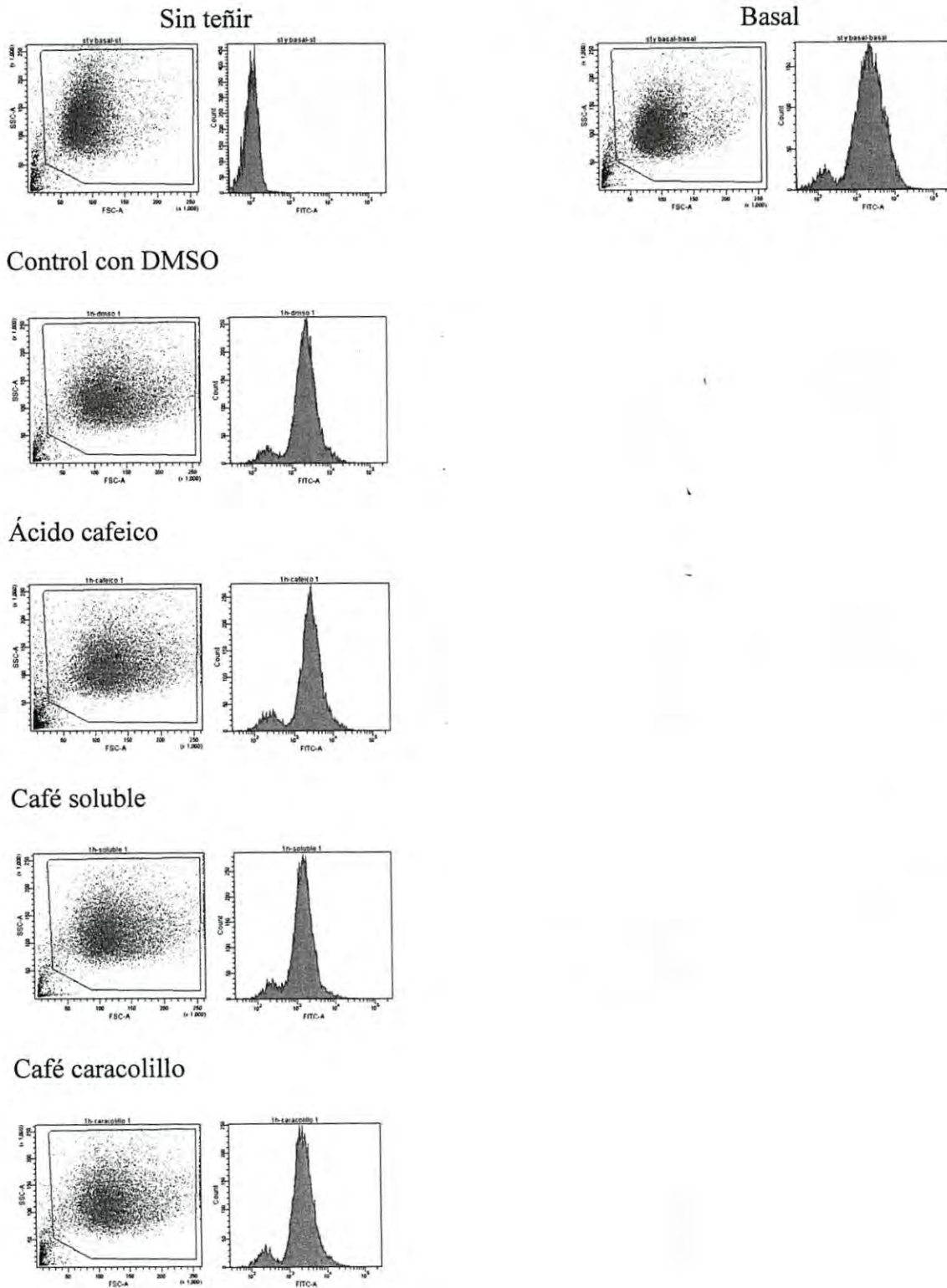


Café caracolillo



## ANEXO 4

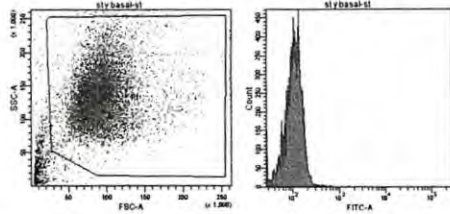
Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 1 h.



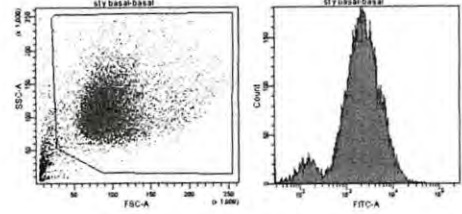
## ANEXO 5

Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 3 h.

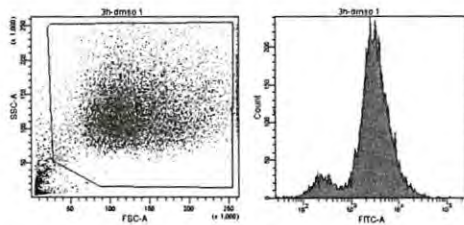
Sin teñir



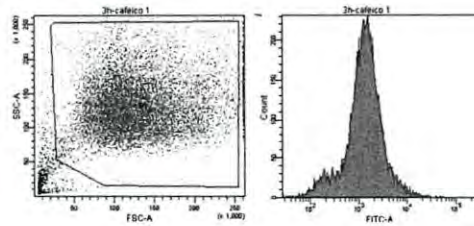
Basal



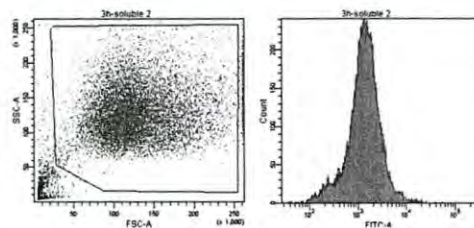
Control con DMSO



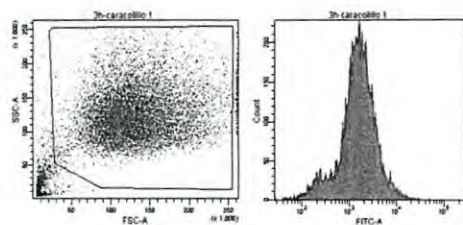
Ácido cafeico



Café soluble



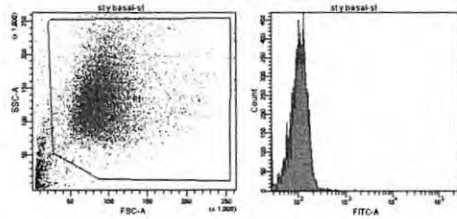
Café caracolillo



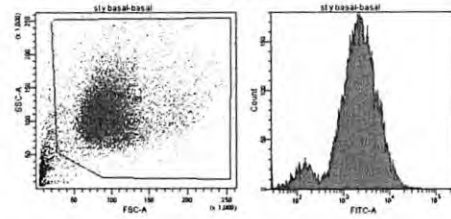
## ANEXO 6

Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 6 h.

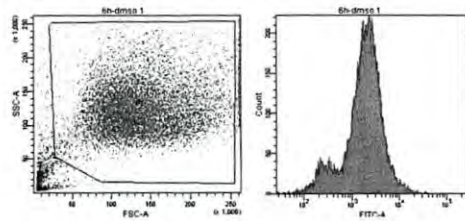
Sin teñir



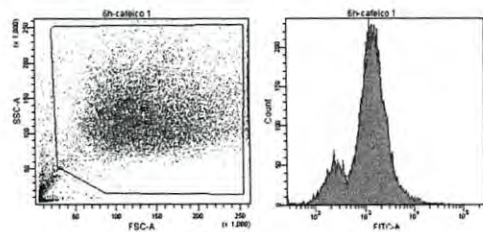
Basal



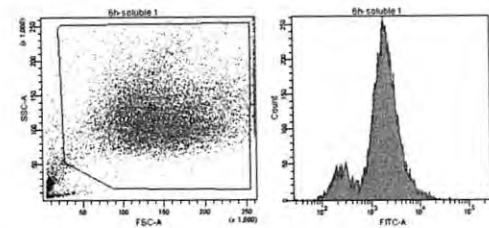
Control con DMSO



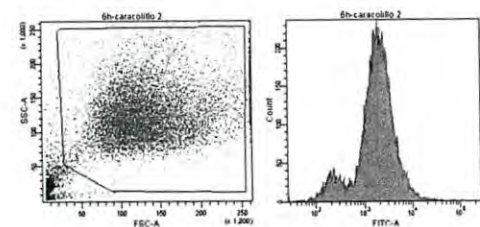
Ácido cafeico



Café soluble

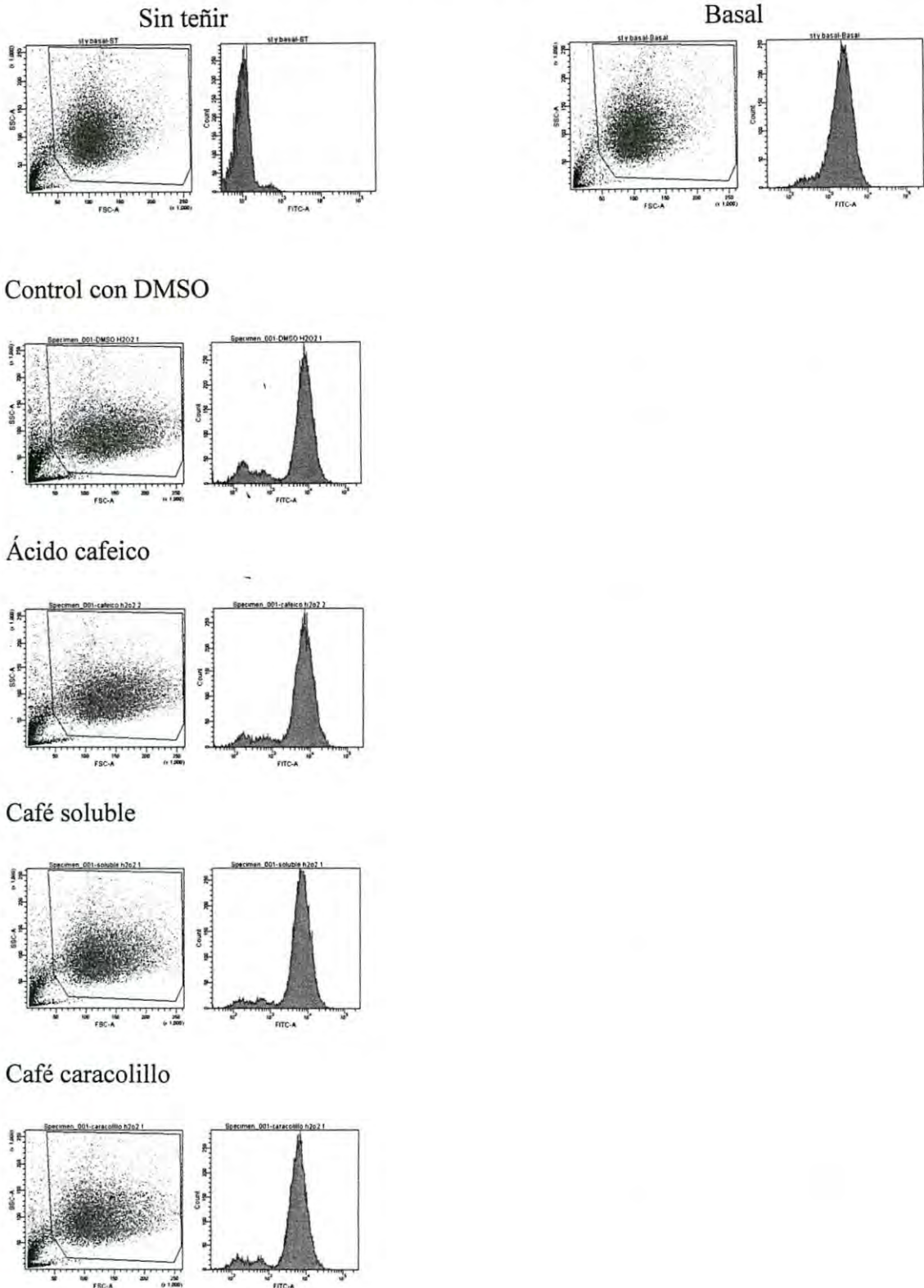


Café caracolillo



## ANEXO 7

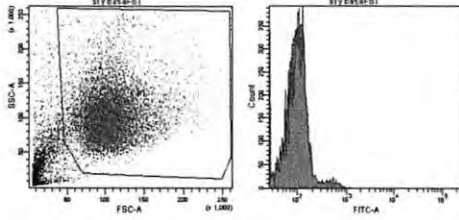
Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 12 h.



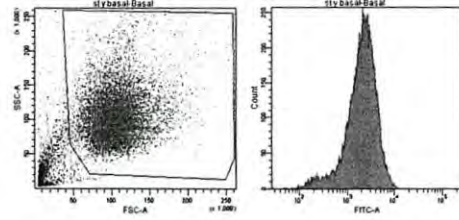
## ANEXO 8

Histogramas de células C3F.6 incubadas con las muestras de café, control positivo (ácido cafeico) y control negativo (DMSO) por 24 h.

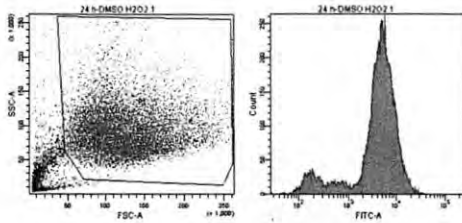
Sin teñir



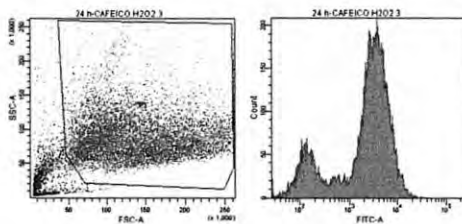
Basal



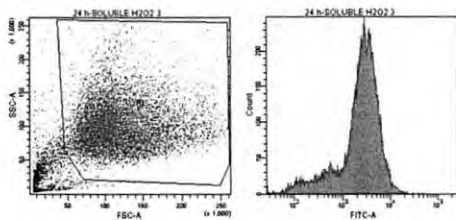
Control con DMSO



Ácido cafeico



Café soluble



Café caracolillo

