



**UNIVERSIDAD TÉCNICA  
PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**“PULPA DE CAFÉ: *Coffea arabica* L: COMO FUENTE  
ALTERNATIVA DE ANTIOXIDANTES”**

*Tesis de grado previo a la obtención del título  
de Bioquímico Farmacéutico.*

**AUTORA:**

Alejandra Tatiana Días Curay.

Ing. Miguel Ángel Meneses.  
Director del trabajo de fin de carrera.

Loja- Ecuador  
2010-2011

## CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN

Loja, 12 de septiembre del 2011

Ing. Miguel Ángel Meneses

CENTRO DE TRANSFERENCIA, TECNOLOGIA E INVESTIGACIÓN  
AGROINDUSTRIAL (CETTIA).

Dejo constancia de haber revisado y estar de acuerdo en la presentación del Proyecto de fin de carrera, titulado: **“PULPA DE CAFÉ: *Coffea arabica* L: COMO FUENTE ALTERNATIVA DE ANTIOXIDANTES”** presentado por la Srta. Alejandra Tatiana Días Curay.

Particular que comunico para los fines legales pertinentes.

Ing. Miguel Ángel Meneses

-----  
**DIRECTOR DE TESIS**

-----  
**Firma**  
**DIRECTOR DE TESIS**

## DEDICATORIA:

Este trabajo va dirigido de manera muy especial a mis padres: Carmita y Marco, a mis hermanos: Ximena, Fabricio y Andrés, por su apoyo incondicional, al ser el motivo de inspiración de mi vida, y por los que he llegado a cumplir una más de mis metas.

De igual manera a mis amigas: Anabel, Carolina, Diana, María del Carmen y Mónica, las mismas que me han brindado su amistad incondicional durante el transcurso de mi carrera.

A todos ellos va dedicado mi esfuerzo, mi dedicación y vivencias, que sin duda alguna han marcado mi vida.

*Alejandra*

## AGRADECIMIENTO:

*Agradezco de manera muy especial a la Universidad Técnica Particular de Loja y a los Docentes de dicha Institución, por haber impartido sus conocimientos para mi formación personal, de igual manera al Laboratorio CETMA, a la Ing. Ruth Martínez Directora del Citte, por haberme permitido realizar mi proyecto de fin de carrera. Al Ing. Miguel Ángel Meneses, por el apoyo brindado en la realización del proyecto de tesis previo a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico.*

*Alejandra*

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS:**

Yo, Alejandra Tatiana Días Curay declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....  
Alejandra T. Días Curay.

**Autora**

.....  
Ing. Miguel A. Meneses

**Director de Tesis**

## RESUMEN:

En el presente estudio se trabajó con residuos de café *Coffea arabica* L (pulpa fresca) procedente de la localidad de Vilcabamba seleccionada así por su disponibilidad y condiciones geográficas. Para la extracción de compuestos antioxidantes la muestra de café fue tratada con tres solventes de extracción: metanol, etanol y mezcla de solventes: metanol/acetona. La medición de actividad antioxidante se realizó bajo cuatro métodos diferentes: ABTS, DPPH, FRAP y Fenoles Totales. Los resultados mostraron que la extracción con mezcla de solventes (metanol/acetona) extrajo mayor cantidad de compuestos antioxidantes: DPPH  $22,85 \pm 1,14$ ; ABTS  $17,93 \pm 1,66$ ; FRAP  $25,58 \pm 0,02$   $\mu\text{Mol eq. Trolox /g PF}$  respectivamente y Fenoles totales  $135,16 \pm 5,51$  mg eq. ac. Gálico /100g PF. La pulpa fresca de café tiene una capacidad antioxidante considerable en comparación con frutas reconocidas como fuente de antioxidantes.

**Palabras claves:** pulpa fresca, actividad antioxidante, DPPH, ABTS, FRAP, Fenoles totales.

## **ABSTRACT**

In this study we worked with *Coffea arabica* L coffee residue (fresh pulp) from Vilcabamba and selected for their availability and geographical conditions. For the extraction of antioxidant compounds in coffee sample was treated with three extraction solvents: methanol, ethanol and mixture of solvents: methanol / acetone. The measurement of antioxidant activity was performed under four different methods: ABTS, DPPH, FRAP and total phenols. The results showed that the extraction solvent mixture (methanol / acetone) extracted as much antioxidant compounds, DPPH  $22,85 \pm 1,14$ ; ABTS  $17,93 \pm 1,66$ ; FRAP  $25,58 \pm 0,02$  microMol eq. Trolox / g PF, respectively, and total phenols  $135,16 \pm 5,51$  mg eq. ac. Gallic / 100g PF. Fresh coffee pulp has a significant antioxidant capacity in from to fruit like a as a source of antioxidants.

**Keywords:** fresh pulp, antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP, total phenols.

# “PULPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L): COMO FUENTE ALTERNATIVA DE ANTIOXIDANTES”

<sup>1</sup>Alejandra T. Días., \*Miguel A. Meneses.

\*Universidad Técnica Particular de Loja, <sup>1</sup>Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial (CETTIA), San Cayetano Alto, Calle Marcelino Champagnat, s/n, Loja-Ecuador.

<sup>1</sup>[atdias@utpl.edu.ec](mailto:atdias@utpl.edu.ec); 2570275, \*[mameneses@upl.edu.ec](mailto:mameneses@upl.edu.ec).

## SUMMARY:

In this study we worked with *Coffea arabica* L coffee residue (fresh pulp) from Vilcabamba and selected for their availability and geographical conditions. The coffee sample was treated with three extraction solvents: methanol, ethanol and solvent mixture (methanol / acetone). Quantification of antioxidants was carried out under four different spectrophotometric techniques (ABTS, DPPH, FRAP and total phenols). Statistical analysis showed that the greater extraction of antioxidant compounds was methanol / acetone for all methods: DPPH  $22,85 \pm 1,14$ ; ABTS  $17,93 \pm 1,66$ ; FRAP  $25,58 \pm 0,02$  microMol eq. Trolox / g PF, respectively, and total phenols  $135,16 \pm 5,51$  mg eq. ac. Gallic / 100g PF. Fresh coffee pulp has a significant antioxidant capacity in from to fruit like a as a source of antioxidants.

**Keywords:** *fresh pulp, antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP, total phenols.*

## INTRODUCTION:

Studies in human nutrition <sup>(1)</sup>. demonstrate a close relationship with the consumption of fruits and vegetables, Also the oxidative stress has been linked to the pathogenesis of many human diseases such as atherosclerosis, cancer, arthritis, etc; that is why the use of antioxidants is studied intensively in pharmacology particularly for the treatment of stroke and neurodegenerative diseases <sup>(4)</sup>.

Green coffee contains a large number and variety of phenolic compounds such as chlorogenic acid, caffeic, phenyl, coumaric acid, tannins, epicatechin, quercetin, among others <sup>(2)</sup>. Chlorogenic acid is the major phenolic component of coffee and a main source in the human diet, each cup contains 15 to 325 mg, with an average of 200 mg per cup in American coffee <sup>(18)</sup>. Chlorogenic acids, which are also found in fruits and vegetables, are well recognized as an antioxidant in some circumstances may be more potent than  $\alpha$ -tocopherol or ascorbic acid <sup>(3)</sup>.

An increasing number of experimental data, clinical, and epidemiological studies that show the degree of biological activity and beneficial effects of antioxidants against degenerative diseases induced by oxidative stress and age-related diseases (cancer and aging) so it has generated a great interest in the role played by the antioxidants <sup>(4)</sup>.

In the last years there has been a tendency to increasing the use of agro-industrial waste as a source of natural antioxidants <sup>(5)</sup>.

Coffee pulp is a by-product that presents a variety of alternatives to be recycled in its entirety <sup>(4)</sup>.

The use of residues and by-products of the coffee is the big interest because it is a potential source of renewable resources and raw materials for food industries, chemical, pharmaceutical wide and varied scale <sup>(6)</sup>, other authors <sup>(7)</sup> show a perspective of using waste as a source of natural antioxidants.

The selection of these alternatives depends on several factors, such as the ability of the benefit, type of technology used to process and may be more important, the lack of interest from producers to waste management in coffee addition to the cost of acquiring new technologies <sup>(8)</sup>.

The objective of this study was to test the potential of ethanol as extraction solvent. Also, was determined the best solvent for extracting antioxidant compounds in fresh pulp of coffee, and was evaluated three extraction solvents of different polarity (methanol, ethanol and methanol/acetone) and four different extraction methods (DPPH, ABTS, FRAP and total phenols).



## MATERIALS AND METHODS:

**Sampling:** I from Vilcabamba (the located 52.5 kms. away from Loja and 1,500 mts. altitude). Sampling was carried out based on the Nicaraguan Standard 17002 (2007) <sup>(10)</sup> for each residue was worked with a total of 3 batches of 3 kg c / or collected on different dates.

**Characterization of the fresh pulp of coffee:** the study of coffee was made to standardize, besides making a selection of fruit. Analyses were performed on the fresh pulp were: humidity (AOAC 920.3151) <sup>(11)</sup>, pH (AOAC 970.2), total soluble solids and fruit color (color chart of the Royal Horticultural Society, RHS).

**Obtain excerpt:** The standarization has been made tested two organic solvents: methanol (99.99%) and ethanol (99%). It weighed 5.0 g sample (fresh pulp) for each case, mechanical agitation was left for 24 hours at room temperature, then filtered the extract and stored under refrigeration (4 ° C) until use. The solvent was removed by vacuum evaporation using a Rotary evaporators (Buchi R200) with heating bath (Buchi B-490) at 37 ° C <sup>(12)</sup>. Each extract obtained diluted with a ratio was 1:10 (w / v), including extract / solvent.

We used the method described by Perez and Saura <sup>(13)</sup>. 0.5 g sample was contacted with 20 mL of methanol / water (50:50, v / v) with 1 mL of 2N HCl (pH 2). The mixture was putted under stirring for 1 hour on an orbital shaker (Thermolyne Digital Big Bill) to 320 rpm Subsequently centrifuged (Dinac) at 1000 rpm for 30 min. The supernatant was collected and stored in the dark at 4 ° C. The residue was subjected to a second extraction with 20 mL of a solution acetone / water (70:30, v / v) at room temperature for 1 hour and centrifuged at 1000 rpm for 30 min. The supernatants were obtained collected and stored at 4 ° C in darkness.

**Determination of Antioxidant Activity:** All extracts obtained with different solvents, were subjected to quantification of antioxidants using the following methods: 2,2-diphenyl-1-picryl hidrazilo (DPPH) <sup>(10, 11)</sup>, a wavelength of 515nm. The 2.2 azinobis - (3 - ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid) ABTS <sup>(12, 11)</sup> at a wavelength of 734 nm, FRAP <sup>(13)</sup> at a wavelength of 593 nm and the method of total phenols <sup>(14)</sup> at a wavelength of 725 nm. All spectrophotometric assays was performed in triplicate.

**Data Analysis:** The determination of the efficiency of the solvent used, was made by comparing the average standard deviation of measured antioxidant activity in the four extraction methods and for each measurement.

Well as an analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests.

## RESULTS AND DISCUSSION

The characterization of fresh coffee pulp is shown in Table 1, The color, humidity, pH and total soluble solids date are all indicators of high degree of maturity that make fresh coffee pulp <sup>(4)</sup>, These values this varied according to the following parameters: instead of collecting the fruit, weather conditions (heat, temperature, rain), fruit maturity, and so on. <sup>(4, 15, 16)</sup>.

Tabla 1. Caracterización de la pulpa fresca de café

MUESTREO	HUMEDAD %	pH	Sólidos Solubles °BRIX	COLOR
Lote 1	88.69±0.57	4.78±0.01	14	Red Group 53 A, B Greyed- Purple Group 187 A.
Lote 2	88.25±0.02	6.90±0.04	15	Red Group 53 A, B Greyed- Purple Group 187 A.
Lote 3	88.15±0.03	5.92±0.04	15	Red Group 53 A, B Greyed- Purple Group 187 A.

The obtencion the extract was able to determine that either solvents in question are pure solvents (methanol and ethanol) or solvent mixture (methanol/ acetone) reacted differently see table 2. In the first case, certainly the highest performance was obtained with the methanol extract which was expressed as g extract / g fresh sample. This result had important significance because methanol is more polar-grade ethanol, therefore the ability to extract compounds was higher <sup>(17)</sup>.

Tabla 2. Rendimiento de los extractos secos

Muestreo	Solvente	Rendimiento
Lote 1	Metanol	57 % ± 7,134
	Etanol	26 % ± 7.134
Lote 2	Metanol	56 % ± 0,002
	Etanol	36 % ± 0.002
Lote 3	Metanol	54 % ± 0.001
	Etanol	29 % ± 0.001

**Tabla 3.** Results DPPH, ABTS, FRAP and Phenols total

Café	Información	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g PF}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g PF}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g PF}$ )	Fenoles totales (mg GAE/100g PF)
	Extracto MeOH	6,10 $\pm$ 0,13	3,38 $\pm$ 0,52	5,33 $\pm$ 0,35	29,36 $\pm$ 1,29
	Extracto EtOH	0,96 $\pm$ 0,12	2,59 $\pm$ 1,84	2,88 $\pm$ 0,17	38,59 $\pm$ 2,67
	Extracto Metanol-Acetona	22,85 $\pm$ 1,14	17,93 $\pm$ 1,66	25,58 $\pm$ 0,02	135,16 $\pm$ 5,51

While the method of solvent mixture wasn't allowed to express the efficiency of extraction because the solvents aren't pure state and therefore more difficult to obtain the dry weight of sample extracted much less evaporation them. However, this method was used as reference in evaluation of antioxidant activity in fruits and vegetables <sup>(9)</sup>.

Data from trials of antioxidant activity for DPPH, ABTS and FRAP were expressed in micromoles of Trolox equivalent / g of fresh pulp (microMol TE / g PF), and total phenolic acid equivalents in milligrams eq. ac. Gallic / 100 grams of fresh pulp (mg EAG / 100g PF).

As shown in Table 3, the greater quantification the solvent of antioxidants against for ethanol methanol, this is for degree of polarity introduced each of these solvents, in its pure state. The solvent mixture (methanol / acetone), has more antioxidant activity, because they are not pure compounds and taking into account that water is a good conductor polar generating more free radical scavenging in each method.

#### CONCLUSIONS:

It was determined that ethanol is a solvent potential to extract antioxidant compounds, in this case, methanol is higher grade in polarity and thus better extraction solvent.

The results showed that the extraction solvent mixture (methanol / acetone) drew much of antioxidant compounds, DPPH 22,85  $\pm$  1,14; ABTS 17,93  $\pm$  1,66; FRAP 25,58  $\pm$  0,02 microMol eq. Trolox / g PF, respectively, and total phenols 135,16  $\pm$  5,51 mg eq. ac. Gallic / 100g PF.

#### REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA:

1. Castañeda, C., Ramos, L., Ibáñez, V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. Vol. 8. 2008.

2. Castañeda, C., Ramos, L., Ibáñez, V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. Vol. 8. 2008.

3. Olthof, M., Hollman, P., Katan, M. Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. Human Nutrition and Metabolism. American Society for Nutritional Sciences. 2000.

4. Rodríguez, N. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional: Gestión Integral de Residuos sólidos y Peligrosos, Siglo XXI. 2002.

5. Ramirez, M., Coronel, N., Kumar, K., Roussos, S., Guyot, S., Augur, C. Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic-High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry is published by the American Chemical. 2004.

6. Prata, E., Oliveira, L. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. Departamento de Engenharia Química. Espírito Santo. Brazil. ScienceDirect. 2007.

7. Rathinavelu, R., Graziosi, G. Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización Internacional del Café. Italia. 2005.

8. Pérez, A. Los productos derivados de frutas: fuentes de antioxidantes. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Costa Rica. 2009.

9. Espinal, M., Restrepo, L. Capacidad antioxidante y ablandamiento de la Palmira Ica L (*Psidium guajava*). Tesis presentada como requisito para optar por el título de Magister en ciencias Químicas. Bogotá. 2010.

10. Nicaragua, CNDNT, y Cd. Norma técnica obligatoria nicaragüense para la producción empaque y comercialización de papa fresca para consumo humano. Norma técnica obligatoria nicaragüense. M.D.F. I. Y. Comercio. Nicaragua. 2007.

11. AOAC. Asociacion of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 18<sup>va</sup>. Ed. Washington, USA. 2005.
12. Tiemi, L., Vieira, R., Lajolo, F., Genovese, M. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. Cienc. Tecnol. Aliment, Campinas. 2007.
13. Pérez, J., Saura, F. Metodología para la Evaluación de Capacidad Antioxidante en Frutas y Hortalizas. V Congresos Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 2007.
14. Brand, W., Cuvelier, M., Borfet, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. 1995.
15. Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros, L., Hawkins, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of food Composition and Analysis. 2006.
16. Arnao, M., Cano, A., Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Analytical, nutritional and clinical methods section. Food Chemistry. 2000.
17. Benzie, I., Strain, J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Analytical, Biochemistry. 1996.
18. Gutiérrez, A. Café, Antioxidantes y protección a la salud. MEDISAN. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Vol. 6 (4). Santa Clara. 2002.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS:

	<b>Pag.</b>
Certificación de Aprobación	I
Dedicatoria	II
Agradecimiento	III
Contrato de Cesión de Derechos	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Artículo	VII
Índice	

### **CAPITULO I**

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1 Objetivos General</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b>	<b>6</b>

### **CAPITULO II**

<b>2. Revisión Bibliográfica</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Generalidades</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Importancia Económica del café</b>	<b>8</b>
<b>2.2.1 Café a nivel mundial</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2 Café en Ecuador</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3 Sectorización del café en Ecuador</b>	<b>9</b>

<b>2.3</b>	Beneficio húmedo del café	9
<b>2.4</b>	Subproductos del café	10
<b>2.5</b>	Utilización de la pulpa de café	10
<b>2.6</b>	Acción de los compuestos antioxidantes	11
<b>2.7</b>	Estudios de utilización de residuos para antioxidantes naturales	13

### **CAPITULO III**

<b>3.</b>	Materiales y Métodos	14
<b>3.1</b>	Materia Prima	14
<b>3.2</b>	Muestreo	14
<b>3.3</b>	Reactivos	15
<b>3.4</b>	Caracterización de la pulpa fresca de café	15
<b>3.4.1</b>	Determinación de Humedad	15
<b>3.4.2</b>	Determinación de pH	15
<b>3.4.3</b>	Determinación de Sólidos Solubles Totales	16
<b>3.4.4</b>	Determinación de color de la pulpa fresca de café	16
<b>3.5</b>	Obtención del extracto	16
<b>3.5.1</b>	Maceración Dinámica	16
<b>3.6</b>	Mezcla de Solventes	17
<b>3.7</b>	Determinación de Actividad Antioxidante	17
<b>3.7.1</b>	Método de DPPH	17
<b>3.7.2</b>	Método ABTS	18
<b>3.7.3</b>	Método FRAP (Poder antioxidante de reducción férrica)	19

<b>3.7.4</b> Determinación de Fenoles Totales	20
<b>3.8</b> Análisis de datos	21

#### **CAPITULO IV**

<b>4.</b> Caracterización de la pulpa fresca de café	22
<b>4.1</b> Determinación de color, humedad, pH, sólidos totales	22
<b>4.2</b> Rendimiento de Extracción	23
<b>4.3</b> Determinación de Actividad Antioxidante	24
<b>4.3.1</b> Método DPPH	25
<b>4.3.2</b> Método ABTS	26
<b>4.3.3</b> Método FRAP	27
<b>4.3.4</b> Fenoles Totales	28

#### **CAPITULO V**

<b>5.</b> Conclusiones	29
<b>6.</b> Recomendaciones	29

## ANEXOS

<b>Anexos 1: (a, b, c y d)</b>	Fotografías de caracterización de la pulpa fresca de café	31
<b>Anexo 2: (a, b y c)</b>	Fotografías de obtención del extracto de la pulpa fresca de café	32
<b>Anexo 3: (a y b)</b>	Fotografías de obtención del Método Patrón	32
<b>Anexo 3: (c)</b>	Diagrama de obtención del Método Patrón	32
<b>Anexo 4:</b>	Obtención del Extracto Metanólico/Etanólico	33
<b>Anexo 5:</b>	Determinación de Actividad Antioxidante	34
<b>Anexo 5.1:</b>	Determinación del Método DPPH	34
<b>Anexo 5.2:</b>	Preparación de la Curva de Calibración	34
<b>Anexo 6:</b>	Determinación del Método ABTS	35
<b>Anexo 6.1:</b>	Preparación de la Curva de Calibración	35
<b>Anexo 7:</b>	Determinación del Método FRAP	36
<b>Anexo 7.1:</b>	Determinación de la Curva de Calibración	36
<b>Anexo 8:</b>	Determinación del Método de Fenoles Totales	37
<b>Anexo 8.1:</b>	Determinación de la curva de calibración de fenoles totales	37
<b>Anexo 9:</b>	Tablas de resultados del Anova para pulpa fresca de café	38
<b>Anexo 9.1:</b>	One-way ANOVA: DPPH versus Extracción	38
<b>Anexo 9.2:</b>	One-way ANOVA: ABTS versus Extracción	39
<b>Anexo 9.3:</b>	One-way ANOVA: FRAP versus Extracción	39
<b>Anexo 9.4:</b>	One-way ANOVA: Fenoles versus Extracción	40
<b>Anexo 10:</b>	(a, b, c y d) Análisis de Tukey para los diferentes métodos: DPPH, ABTS, FRAP y Fenoles Totales	41
<b>Anexo 11:</b>	Determinación de capacidad antioxidante	43
<b>Anexo 11.1:</b>	Curva de calibración del DPPH	43
<b>Anexo 12:</b>	Curva de calibración del ABTS	45
<b>Anexo 13:</b>	Curva de calibración del FRAP	47
<b>Anexo 14:</b>	Curva de calibración de Fenoles Totales	49

## TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Especificación de la <i>coffea arabica</i> L	8
<b>Tabla 2:</b> Ventajas de la pulpa de café	11
<b>Tabla 3:</b> Residuos Agroindustriales con Actividad Antioxidante	13
<b>Tabla 4:</b> Caracterización de la pulpa fresca de café	22
<b>Tabla 5:</b> Rendimiento de Extractos secos	23
<b>Tabla 6:</b> Resultados de Desviación Estándar de DPPH, ABTS, FRAP y Fenoles Totales	25



## GRAFICAS Y FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1a:</b> Muestreo	32
<b>Fotografía 1b:</b> Muestra más cápsula de aluminio	32
<b>Fotografía 1c:</b> Estufa	32
<b>Fotografía 1d:</b> Desecador	32
<b>Fotografía 2a:</b> Maceración Dinámica	32
<b>Fotografía 2b:</b> Eliminación del solvente	32
<b>Fotografía 2c:</b> Peso del Extracto	32
<b>Fotografía 3a:</b> Centrifugación	33
<b>Fotografía 3b:</b> Sobrenadantes del Método Patrón	33

# Capítulo I

## **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN:

Después del petróleo, el café es el producto más comercializado en el mercado mundial<sup>1</sup>. En Ecuador el cultivo de café tiene importancia relevante en el ámbito económico, social y ecológico; la importancia económica radica en la generación de ingresos para las familias cafetaleras, en la industria del café trabajan 20 millones de personas<sup>2</sup> y demás actores de la cadena productiva que dependen de las contingencias de producción y precios de este grano en el mercado internacional, en el ámbito social se basa en la generación de empleo directo e indirecto para miles de familias vinculadas a la comercialización, transporte y exportación.

A pesar de que la crisis mundial del sector cafetalero se acentúo con mayor incidencia entre los años 2000 y 2004 debido a la sobreproducción del grano a nivel mundial y a los precios bajos; se ha generado un crecimiento sostenido a partir del año 2005, tanto en volumen de exportación como ingresos de divisas, teniendo como promedio 1 millón de sacos de 60kg en los últimos 4 años.<sup>3</sup>

Las empresas ecuatorianas que producen café tienen una larga trayectoria a nivel mundial<sup>4</sup>. El café ecuatoriano se exporta actualmente a cincuenta países, dentro de estos se encuentran Alemania, Polonia, Rusia, Japón, Colombia, Inglaterra, Holanda, Perú, Estados Unidos, entre otros.<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup> Parras, P., Martínez, M., Jimenez, A., Murcia, M. Antioxidant capacity of coffes of several origins brewed following three diferent procedures. Food Chemistry. Murcia-Spain. 2006.

<sup>2</sup> Cardenás, F., Macias, W. Cafés especiales: Tipos, productores y mercado internacional. Tesis de Economista en mención Finanzas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Quito. 2004.

<sup>3</sup> Ristevic, S. HS-SPME-GC-TOFMS Methodology for Verification of Geographical Origin and Authenticity Attributes of Coffee Samples. Canadá. 2008.

<sup>4</sup> Naranjo, J. Café Ecuatoriano “Una variedad para cada gusto”. Ficha técnica. 2009.



Los cultivos de café en Ecuador ocupan una superficie aproximada de 219.000 hectáreas, de las cuales el 68% corresponde a cultivos de café arábico y el 32% a cultivos de café robusta. Para el año 2009 se estimó una producción de 852.780 quintales<sup>4</sup>; Ecuador es uno de los principales productores de Café Especial, el cual es producido en diez provincias en el país.<sup>5</sup>

El proceso del café se conoce como beneficio agrícola vía húmeda,<sup>6</sup> el que genera una cantidad considerable de residuos y desechos; dentro de los sólidos del café, la pulpa es la parte más voluminosa, representa entre el 40 - 56% en peso de este.<sup>7</sup>

En café cereza solo el 18,5% llega a ser café oro, el resto del fruto es agua (20%), pulpa (41%), cascarilla (4,5%), mucílago (16%). Este desperdicio como pulpa de café representa un problema ambiental, estudios demuestran que los residuos del café generan el 60% de la contaminación del agua en las zonas cafetaleras.<sup>8</sup>

---

<sup>4</sup> Naranjo, J. Café Ecuatoriano "Una variedad para cada gusto". Ficha técnica. 2009.

<sup>5</sup> Hanna, E. La participación potencial en la producción de café orgánico vía la Alianza de agricultores orgánico (Aliagro). 2005.

<sup>6</sup> Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I., González, M. Coffee for cardiologists. Revista de cardiología. Colombia. Vol. 11(8). 2005.

<sup>7</sup> Castillo, R., Carballo, L., Pérez, N., Fernández, R. Estudio de la composición química del residuo sólido del beneficio húmedo del café en bahía honda, pinar del Río. Centro de Estudios Forestales. Montes de Oca. Pinar del Río. 2002.

<sup>8</sup> Coronel, M., Marín, A. Estudio del café especial Ecuatoriano. Proyecto final de Máster para la obtención del título de Máster Internacional en Nutrición y Dietética. Quito-Ecuador. 2010.



En los últimos años, se ha notado una tendencia creciente en la utilización de residuos agroindustriales como es el caso de la pulpa de café.<sup>9</sup> Para ello se han planteado múltiples alternativas entre algunas la producción de biogás, obtención de abono orgánico, producción de hongos comestibles, obtención de alcohol, vinos y alimentación animal.<sup>10,11</sup>

La selección de una de estas alternativas depende de varios factores, tales como: la capacidad del beneficio, tipo de tecnología empleada para el proceso y la que puede ser más importante, la falta de interés por parte de los productores para mejorar el manejo de residuos del café, además del costo que implica adquirir nuevas tecnologías.<sup>12</sup>

Diferentes estudios muestran que los residuos del café poseen componentes de alto valor en la industria,<sup>10</sup> la pulpa de café en promedio contiene el 11% de proteína, sin embargo el 40% corresponde a proteína lignificada, la cual no es aprovechada por los animales, en el caso de su uso como alimento.<sup>12</sup> El residuo de pulpa de café contiene sustancias químicas que de cierto modo pueden ser perjudiciales para la alimentación animal,<sup>10</sup> entre los más conocidos tenemos los ácidos clorogénicos, taninos y cafeína.

---

<sup>9</sup> Ramirez, M., Coronel, N., Kumar, K., Roussos, S., Guyot, S., Augur, C. Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic-High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry is published by the American Chemical. 2004.

<sup>10</sup> Favela, E., Huerta, S., Roussos, S., Olivares, G., Nava, G., Viniestra, G., Gutiérrez M. Producción de Enzimas a partir de pulpa de café y su aplicación en el beneficio húmedo. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. Xalapa-México. 2004.

<sup>11</sup> Pérez, A. Los productos derivados de frutas: fuentes de antioxidantes. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Costa Rica. 2009.

<sup>12</sup> Vitto, R., Ciria, J. Utilización del subproducto pulpa de café ensilada en dietas de ovinos en una finca del estado Táchira Venezuela. Universidad del Táchira. Agrarias. Soria. 2004.



Además el mucílago del café pero en especial la pulpa contiene una serie de azúcares, polifenoles, antocianinas y taninos, todos estos compuestos se caracterizan por el color y apariencia del fruto.<sup>13</sup>

El aprovechamiento de los residuos y subproductos del café siguen resultando de gran interés, debido a que constituyen una posible fuente de recursos renovables y de materia prima para industrias de alimentos, químico farmacéuticos de amplia y variada magnitud,<sup>14</sup> en este caso el estudio de Rathinavelu y Graziosi,<sup>13</sup> muestra una perspectiva del uso de los residuos como fuente de actividad antioxidante.

Los alimentos enriquecidos con compuestos antioxidantes o alimentos funcionales, cada día cobran mayor importancia debido al papel que desempeñan en la salud humana,<sup>15</sup> puesto que previenen y eliminan aquellas sustancias potencialmente nocivas (radicales libres) generadoras de desórdenes y enfermedades en el ser humano.

El impacto social de los alimentos funcionales es innegable y ello se constata al comprobar que muchos consumidores asumen que son productos beneficiosos que contienen antioxidantes, omega-3, prebióticos, probióticos, polifenoles, flavonoides, etc.<sup>16</sup>

---

<sup>13</sup> Rathinavelu, R., Graziosi, G. Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización Internacional del Café. Italia. 2005.

<sup>14</sup> Prata, E., Oliveira, L. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. Departamento de Engenharia Química. Espírito Santo. Brazil. Science Direct. 2007.

<sup>15</sup> Vilaplana, M. Beneficios cardiovasculares, antioxidantes y gastrointestinales de los frutos secos. OFFARM. Vol 22. 2003.

<sup>16</sup> Vidal, M. Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a cómo declarar sus efectos sobre la salud. Alimentos funcionales. Universidad de Barcelona. 2008.



El mercado de los alimentos funcionales a nivel mundial no ha parado de crecer en los últimos años, y hoy existen ya comercializados más de 200 alimentos de este tipo. Como reflejo de su expansión, cabe señalar que en el 2003 representaban sólo el 5% del mercado de alimentos, en 2005 pasaron a representar más de un 30% de la cuota del mercado.<sup>16</sup> Se prevee que su crecimiento genere un mercado de \$100 billones en el 2013.<sup>17</sup>

El desarrollo del mercado de alimentos funcionales tiene implícita la búsqueda de fuentes alternativas y sostenibles de compuestos bioactivos, por consiguiente el valor agregado en la utilización de los residuos agroindustriales ha cobrado impulso en todo el mundo, de tal manera que, los residuos agroindustriales son procesados para la extracción de moléculas bioactivas.<sup>18</sup> Estos residuos, de hecho, podrían ser una fuente alternativa para la obtención de antioxidantes naturales.<sup>19</sup>

Dentro de la línea de investigación del CETTIA, “Aplicación de Tecnologías emergentes y tradicionales en procesos agroindustriales”, se busca la extracción y fraccionamiento de compuestos naturales con propiedades antioxidantes mediante fluidos supercríticos (FSC). Estos objetivos se vinculan con la línea de investigación, en el desarrollo de productos funcionales y nutraceuticos.

---

<sup>16</sup> Vidal, M. Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a cómo declarar sus efectos sobre la salud. Alimentos funcionales. Universidad de Barcelona. 2008.

<sup>17</sup> Smith, J., Charter, E. Functional Food Product Development. Wiley. 2010.

<sup>18</sup> Boskou, D. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science & Technology. Elsevier. Vol 17. 505-512. Thessaloniki – Greece. 2006.

<sup>19</sup> Pushpa, M., Madhava, N. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. Springer Science. India. 2010.



Como paso previo a la aplicación de FSC es necesario evaluar la actividad antioxidante de la pulpa fresca de café para conocer su potencial de aprovechamiento. Se han realizado estudios sobre la actividad antioxidante en pulpa seca de café; con el estudio en pulpa fresca se busca determinar cuál es el mejor estado para extraer antioxidantes en la pulpa de café.

## 1.1 OBJETIVOS:

### 1.1.1 General:

- Generar conocimientos para el aprovechamiento de los residuos de café (pulpa fresca) de la variedad ***Coffea arabica L*** como fuente de antioxidante.

### 1.1.2 Específicos:

- Valoración del potencial de pulpa fresca de café (***Coffea arabica L***) como fuente de antioxidantes mediante la cuantificación de la capacidad antioxidante y fenoles totales.
- Evaluación de la potencialidad en la extracción de componentes con capacidad antioxidante, presentes en residuos de pulpa fresca de café, mediante la determinación del rendimiento de extracción con etanol.

### 1.1.3 Hipótesis

**H<sub>0</sub>**: Los residuos de la producción de café (pulpa fresca) **NO** son fuente de antioxidantes.

**H<sub>1</sub>**: Los residuos de la producción de café (pulpa fresca) **SI** son fuente de antioxidantes.



# Capítulo II

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades

El cultivo de café está reservado a tierras altas de montaña entre 900 y 2000 msnm. Es originario de Etiopía, hoy en día se produce en países como Brasil, Camerún, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Guatemala, Haití, Jamaica, Kenia, México, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, El Salvador, Tanzania, Nicaragua y Venezuela.<sup>2</sup>

El café es un cultivo permanente, producido por el árbol del cafeto. Estos arbustos requieren una temperatura elevada (20° a 25°C) y una humedad atmosférica importante. Es una planta de semi-sombra que hay que proteger de los vientos y de las temperaturas bajas.<sup>20</sup> En la Tabla 1 se muestran las especificaciones y características propias de ***coffea arabica* L.**

El café es cultivado con el objeto de producir un grano cuyo rico contenido de sustancias aromáticas y estimulantes permita preparar una infusión altamente apreciada como bebida.<sup>21</sup>

La palabra “café” viene de la forma latina *coffea*, miembro de la familia rubiaceae, que tiene más de 500 géneros y 6000 especies de árboles tropicales y arbustos.<sup>22</sup> Existen alrededor de 25 especies, pero la típica bebida de café es más familiarizada con las variedades: *arabica* y *canephora* (robusta).

---

<sup>2</sup> Cardenás, F., Macías, W. Cafés especiales: Tipos, productores y mercado internacional. Tesis de Economista en mención Finanzas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Quito. 2004.

<sup>20</sup> Área de desarrollo: Cultivo de café. Agrobanco. 2007.

<sup>21</sup> Salazar, A., Acuña, R., García, M. Utilización de la pulpa de café en la alimentación animal. Zootecnia Trop. Venezuela. Vol. 26(4). 2008.

<sup>22</sup> Corporación Ecuatoriana de Cafetaleras y Cafetaleros (CORECAF). Estudio del mercado del café. 2000.



Tabla 1. Especificación de la *Coffea arabica* L

<b>Género:</b>	Coffea
<b>Especie:</b>	<b><i>Coffea arabica</i> L</b>
<b>Familia:</b>	Rubiáceas
<b>Origen:</b>	África Oriental
<b>Lluvia anual:</b>	1.500 – 2000 mm/m <sup>2</sup>
<b>pH</b>	Ligeramente ácido
<b>Temperatura:</b>	20-25 °C
<b>Características:</b>	Arbusto de 3 m y libremente puede crecer hasta 7 m de altura, con ramas redondeadas, hojas opuestas, peciolo corto, flores blancas aromáticas. El fruto es una drupa esférica u oval más o menos carnosa, contiene dos semillas.

Fuente: Álvarez, R. 2008.

## 2.2 Importancia económica del café

### 2.2.1 Café a nivel mundial

El café es indudablemente uno de los productos vegetales más importantes del comercio internacional y en la actualidad se produce café en distintas regiones, siendo Brasil el mayor país productor y exportador. En el 2005 la producción mundial de café alcanzó a 108.2 millones de sacos (60 kg c/u) de los cuales 65% a 70% correspondieron a arabica y el resto a robusta, respectivamente.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup> Coronel, M., Marín, A. Estudio del café especial Ecuatoriano. Proyecto final de Máster para la obtención del título de Máster Internacional en Nutrición y Dietética. Quito-Ecuador. 2010.



## 2.2.2 Café en Ecuador

El café es uno de los cultivos que se ha destacado en las exportaciones agrícolas del país, el mismo que conjuntamente con el cacao y el banano constituyen una fuente de empleo y divisas para la economía ecuatoriana, dando origen al desarrollo de otras importantes actividades económicas como el comercio, la industria, entre otras.<sup>23</sup>

## 2.2.3 Sectorización del café en Ecuador

Actualmente, el cultivo de café se encuentra ubicado a nivel nacional, según los datos del último Censo Agropecuario existen 151.900 hectáreas de cultivo de café solo y 168.764 hectáreas de cultivo de café asociado.<sup>23</sup>

En la superficie únicamente de café, Manabí ocupa el 38,6%, Sucumbíos 17,36%, Orellana 11,89%, El Oro 7,67%, Loja 4,01% y la diferencia en otras provincias, en tanto que en la superficie asociada de café, Manabí ocupa un 24,25%, Los Ríos 17,9%, Guayas 9,22%, Esmeraldas 7,94%, Pichincha 13,90%, Bolívar 7,05% y el resto en otras provincias productoras.<sup>23</sup> En nuestro país se cultivan las dos especies de café *arabico* y *robusta*, aproximadamente el 55% de la superficie total es de arabico. La producción de café *arabico*, considerado de mejor calidad se concentra específicamente en Manabí, la provincia de Loja y las estribaciones de la cordillera occidental de los Andes, en tanto que el robusta se cultiva en la Amazonía, es decir en Sucumbíos y Orellana, en su mayor porcentaje.<sup>23</sup>

Ecuador es uno de los principales productores en el mercado de Cafés Especiales, este tipo de café es producido en diez provincias del país.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Cardenás, F., Macías, W. Cafés especiales: Tipos, productores y mercado internacional. Tesis de Economista en mención Finanzas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Quito. 2004.

<sup>23</sup> Historia del café en Ecuador. 2008: Fuente: [www.sica.gov.ec/cadenas/cafe/docs/historia\\_cafe.html](http://www.sica.gov.ec/cadenas/cafe/docs/historia_cafe.html) del ministerio de agricultura.



## 2.3 Beneficio húmedo del café

El beneficio húmedo es un proceso para transformar los frutos del cafeto de su estado cerezo a café pergamino,<sup>8</sup> este es un factor determinante en la calidad de taza. Se desarrolla en dos fases; la primera húmeda o despulpe y la segunda de secado que termina con la obtención del café pergamino seco y listo para su almacenamiento, el proceso de beneficio del café se puede observar en la figura 1.

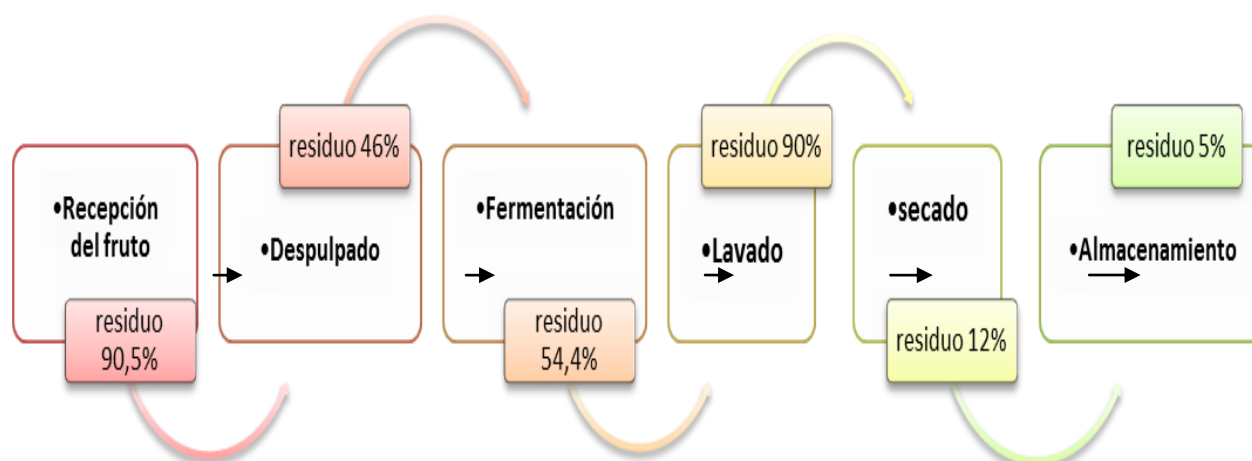


Figura. 1 Beneficio húmedo del café

## 2.4 Subproductos del Café

En la industria del café, solamente se utiliza el 9,5% del peso del fruto fresco en la preparación de la bebida, el 90,5% queda en forma de residuos.<sup>24</sup> La pulpa es la parte más voluminosa, representa entre el 40 - 56% en peso de este,<sup>7</sup> además de contener agua (20%), pulpa (41%), cascarilla (4,5%), mucílago (16%).<sup>8</sup>

<sup>7</sup> Castillo, R., Carballo, L., Pérez, N., Fernández, R. Estudio de la composición química del residuo sólido del beneficio húmedo del café en bahía honda, pinar del Río. Centro de Estudios Forestales. Montes de Oca. Pinar del Río. 2002.

<sup>8</sup> Coronel, M., Marín, A. Estudio del café especial Ecuatoriano. Proyecto final de Máster para la obtención del título de Máster Internacional en Nutrición y Dietética. Quito-Ecuador. 2010.

<sup>24</sup> Rodríguez, N. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional: Gestión Integral de Residuos sólidos y Peligrosos, Siglo XXI. 2002.



La pulpa de café es utilizada en el mundo para la producción de biogás, obtención de abono orgánico, producción de hongos comestibles, obtención de alcohol, vinos, alimentación animal y obtención de carbón activado.<sup>11</sup>

Al mucílago del café se lo utiliza en la alimentación de porcinos, producción de alcohol etílico y la borra para la producción de manitol, los trabajos que se están desarrollando para el aprovechamiento de los subproductos, son la obtención de pectinas a partir de la pulpa y el mucílago del café, y el cultivo de hongos tropicales sobre residuos agroindustriales presentes en la zona cafetera.<sup>24</sup>

## 2.5 Utilización de la pulpa del café

A través de investigaciones se ha podido establecer que la pulpa de café posee factores anti-nutricionales o tóxicos que limitan su uso en la alimentación animal,<sup>25</sup> identificando que dentro de tales factores los más nocivos son cafeína, taninos, polifenoles y el alto contenido de fibra de la pulpa.<sup>26</sup>

---

<sup>11</sup> Pérez, A. Los productos derivados de frutas: fuentes de antioxidantes. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Costa Rica. 2009.

<sup>24</sup> Rodríguez, N. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional: Gestión Integral de Residuos sólidos y Peligrosos, Siglo XXI. 2002.

<sup>25</sup> Molina, M., Lechuga, Otto., Bressani, R. Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. Agronomía Mesoamericana. Guatemala. 1990.

<sup>26</sup> Moreau, Y., Arredondo, J., Gaime, I., Roussos, S. Dietary Utilisation of Protein and Energy from Fresh and Ensiled Coffee Pulp by the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Brazilian Archives of Biology and technology. Brazil. Vol. 46(2). 2003.



El ensilaje de la pulpa de café es una alternativa válida para manipular y almacenar las enormes cantidades de pulpa de café que se producen en las fábricas de todo el mundo que procesan el fruto del café.<sup>13</sup>

La pulpa de café es uno de los subproductos que presenta una gran variedad de alternativas para ser recicladas en su totalidad:

**Tabla 2.** Ventajas de la pulpa de café

USOS DE LA PULPA FRESCA DE CAFÉ				
Transformación en humus a partir de cultivos de lombrices.	Elaboración de abonos orgánicos fermentados.	Proceso de elaboración de aboneras (composteras)	Su utilización como sustrato para la reproducción biológica y así obtener abonos orgánicos.	La pulpa reemplaza el 20 % de concentrados en la alimentación animal como el lechero.

Fuente: Rodríguez. 2002.

Elaboración: La Autora

## 2.6 Acción de los compuestos antioxidantes

El sistema antioxidante o de defensa está constituido por compuestos de naturaleza enzimática, que son capaces de catalizar las reacciones que transforman a los radicales libres y a sus precursores en sustancias inocuas.<sup>27</sup>

<sup>13</sup> Rathinavelu, R., Graziosi, G. Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización Internacional del Café. Italia. 2005.

<sup>24</sup> Rodríguez, N. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional: Gestión Integral de Residuos sólidos y Peligrosos, Siglo XXI. 2002.

<sup>27</sup> Gómez, L., Nicolás, J. Producción de alcohol etílico a partir de mucílago de café. Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo Con el grado de Licenciatura. Guácimo-Costa Rica. 2006.



Estudios en nutrición humana,<sup>28</sup> demuestran que existe una estrecha relación entre el consumo de frutas y verduras, así mismo, el estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas como: arterioesclerosis, artritis, cáncer, etc.; es por ello que el uso de antioxidantes es estudiado de forma intensiva, en farmacología; particularmente, en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas.<sup>28</sup>

En este contexto los vegetales, además de aportar nutrimentos energéticos, vitaminas y minerales, constituyen una fuente importante de compuestos antioxidantes en la dieta.<sup>29</sup> Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de alto contenido en los alimentos, a la vez que son más saludables e incluso pueden llegar a ser considerados dentro de los alimentos funcionales.<sup>30</sup>

Entre estos componentes antioxidantes están los carotenos, flavonoides, vitamina C y E, y otros fitoquímicos.<sup>29</sup> Es por eso que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional.<sup>30</sup>

Además los compuestos fenólicos son principales contribuyentes al sistema antioxidante químico de los frutos y su actividad antioxidante ha sido asociada a sus características químicas estructurales como la capacidad de donación de protones hidroxilos, la capacidad de deslocalizar y estabilizar electrones desapareados.<sup>31</sup>

---

<sup>28</sup> Castañeda, C., Ramos L., Ibáñez, V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. Vol 8. 2008.

<sup>29</sup> Medrano, k. Capacidad antioxidante, contenido de Vitamina "C" y carotenos en plantas comestibles silvestres del Departamento de Chiquimula. Informe de Tesis para optar al título de Nutricionista. Guatemala. 2005.

<sup>30</sup> Martínez, I., Periago, M., Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de nutrición. Murcia-España. Vol 50. 2000.

<sup>31</sup> Espinal, M., Restrepo, L. Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira Ica I (***Psidium guajava***). Tesis presentada como requisito para optar al título de Magister en Ciencias Químicas. Bogotá. 2010.





## 2.7 Estudios de utilización de residuos para antioxidantes naturales

Muchos estudios se han centrado en determinar la capacidad antioxidante de varios residuos agroindustriales de los cuales se ha obtenido excelentes resultados para su aprovechamiento, ver Tabla 3, dentro de estos se puede mencionar: bayas como arándano, uva, mora, fresa, frambuesa.<sup>11</sup> Entre otros residuos como semillas y cáscaras de trigo sarraceno, lino, semillas y cáscaras de girasol, raíces de ginseng, raíces y flores de *Echinacea*, papas de carne blanca y púrpura, arándanos, cerezas, pieles de cebolla morada, raíces y aceite de rábano picante y trigo, en los que se ha encontrado relación directa entre concentración fenólica y actividad antioxidante.<sup>32</sup>

Tabla 3. Residuos agroindustriales con actividad antioxidante

Residuos	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles Totales
Pulpa de guayaba <sup>11</sup>	1,92 ± 0,08	-----	462 ± 51	-----
Corteza de guayaba <sup>32</sup>	275 ± 7a	164 ± 4a	-----	626 ± 11a
Orujo de uva blanca <sup>11</sup>	2,19 ± 0 .08	355,4 ± 30,3	4661 ± 436	-----

Fuente: Restrepo *et al.*, 2009

<sup>11</sup> Pérez, A. Los productos derivados de frutas: fuentes de antioxidantes. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Costa Rica. 2009.

<sup>32</sup> Restrepo, D., Narváez, C., Restrepo, L. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez- Santander. Quim Nova. Vol 32. Bogotá- Colombia. 2009.

# Capítulo III

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS:

#### 3.1 Materia Prima

El café analizado fue proporcionado por los productores de San Pedro de Vilcabamba, perteneciente a la provincia de Loja (altura 1700 m.s.n.m.); lugar que fue elegido de acuerdo a sus características ecológicas y disponibilidad. Además por el beneficio húmedo que presenta el café de este modo la pulpa se considera el desecho más importante del beneficio húmedo del café.<sup>33</sup>

#### 3.2 Muestreo

El muestreo se realizó en base a la Norma Nicaragüense 17002 (2007),<sup>34</sup> la muestra en la que se trabajó corresponde a la pulpa fresca de café, para cada residuo se trabajó con un total de 3 lotes de 3 kg c/u recolectados en fechas diferentes:

- **Lote 1:** 22 de abril del 2010.
- **Lote 2:** 20 de mayo del 2010.
- **Lote 3:** 31 de mayo del 2010.

El café fue transportado desde el lugar de cultivo, la muestra se almacenó en vasijas de vidrio y se seleccionó los frutos fue en función del beneficio húmedo del café.

---

<sup>33</sup> Castillo, R., Carballo, L., Pérez, N., Fernández, R. 2002. Estudio de la composición química del residuo sólido del beneficio húmedo del café en Bahía Honda Pinar del Río. Centro de Estudios Forestales, Departamento de Química, Universidad Hermanos Saíz Montes de Oca. Pinar del Río. 2008.

<sup>34</sup> Nicaragua, CNDNT, y Cd. Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense para la producción empaque y comercialización de papa fresca para consumo humano. Norma técnica obligatoria nicaragüense. M. d. F. I. y. Comercio. Nicaragua. 2007.



### 3.3 Reactivos

Los reactivos 2, 4, 6- tri - (2- piridil- s- triazina) TPTZ; 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ABTS; ácido- 6- hidroxil- (2, 5, 7, 8 tetrametilcromano- 2 –carboxílico) Trolox; y el reactivo de Folín-Ciocalteu 2N fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El carbonato de calcio adquirido de Merck, Ácido gálico monohidratado ( $C_6H_2(OH)3COOH.H_2O$ ) de J.T.Baker. Los solventes empleados fueron de grado analítico: metanol HPLC 99,99%, etanol al 99% y acetona 99,8%.

### 3.4 Caracterización de la pulpa fresca de café

La caracterización de los frutos se realizó para estandarizar el estudio del café, además de efectuar una selección del fruto.

Los análisis llevados a cabo sobre la pulpa fresca fueron: humedad, pH, sólidos solubles totales y color del fruto como se detalla a continuación:

**3.4.1 Determinación de Humedad:** El contenido de humedad se llevo a cabo bajo el método descrito por las técnicas de la AOAC 920.3151 (2005),<sup>35</sup> fue determinado por métodos gravimétricos en estufa al vacío; para ello se pesaron  $2,0 \pm 0,1$  g de muestra (balanza analítica Ohaus), la muestra se colocó en una cápsula de aluminio y se llevó a la estufa de vacío a 70 °C durante 5 horas, luego de este proceso las muestras se dejaron enfriar en un desecador a temperatura ambiente, el resultado se obtuvo por diferencia de pesos (Anexo 1).

Los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar.

---

<sup>35</sup> AOAC. Asociacion of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 18<sup>va</sup>. Ed. Washington, USA.2005.



**3.4.2 Determinación de pH:** El pH se midió bajo el método descrito por las técnicas de la AOAC 970.2 (2005),<sup>34</sup> pH en productos derivados del cacao, se midió con un pH-metro digital (Hanna) previamente calibrado con buffer pH 4,01 - 7,00 (Mettler Hanna); para determinar el pH de la solución se pesaron  $10,0 \pm 0,1$  g de fracción de pulpa fresca de café, disuelta en 100 mL de agua a temperatura ambiente (25 °C).

Los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar.

**3.4.3 Determinación de sólidos solubles totales:** Para determinar el contenido de sólidos solubles totales o grado de madurez de la muestra, las medidas se efectuaron con un brixómetro, el resultado se expresó como grados Brix.

**3.4.4 Determinación de color de la pulpa fresca de café:** La clasificación del color fue hecha según la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS) de Inglaterra, para cada muestreo.

### **3.5 Obtención de extractos.**

#### **3.5.1 Maceración Dinámica**

Para la obtención de los extractos se ensayó con dos solventes orgánicos: metanol (99,99%) y etanol (99%). Se pesaron 5,000 g de muestra (pulpa fresca) para cada caso, se transfirió en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio, se agregó 100 mL del solvente respectivo, se introdujo una barra magnética y se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, luego de haber transcurrido el tiempo de reacción, se filtró el extracto con papel filtro Whatman N°1, luego se almacenó en refrigeración (4°C) hasta su uso.

---

<sup>34</sup> Nicaragua, CNDNT, y Cd. Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense para la producción empaque y comercialización de papa fresca para consumo humano. Norma técnica obligatoria nicaragüense. M. d. F. I. y. Comercio. Nicaragua. 2007.



El solvente se eliminó por evaporación al vacío, utilizando un rotaevaporador (Buchi R200) con baño de calentamiento (Buchi B-490), a temperatura de 37 °C.<sup>36</sup> Cada extracto obtenido se diluyó con una relación 1:10 (w/v), entre extracto / solvente (Anexo 2 y 4).

El rendimiento de extracción se expresó como g extracto / g muestra fresca.

### 3.6 Mezcla de solventes:

Se empleó el método descrito por Jara y Saura (2007). Se pesó 0,500 g de muestra, se puso en contacto con 20 mL de metanol / agua (50:50, v/v) con 1 mL de HCl 2N (50:50, v/v, pH 2). La mezcla fue puesta en agitación por 1 hora, en un agitador orbital (Thermolyne Big Bill Digital) a 320 r.p.m.

Posteriormente se centrifugó (Dinac) a 1000 r.p.m. durante 30 min. El sobrenadante recogido se almacenó en la oscuridad a 4°C. El residuo fue sometido a una segunda extracción con 20 mL de una solución acetona / agua (70:30, v/v) a temperatura ambiente por 1 hora y se centrifugó a 1000 r.p.m. por 30 min. Se efectuaron tres extracciones de acuerdo a cada fecha de recolección de la muestra. Los sobrenadantes obtenidos fueron reunidos y almacenados a 4°C en oscuridad.

Sobre dichos sobrenadantes se efectuó la cuantificación de fenoles y las medidas de actividad antioxidante (Anexo 3).

---

<sup>36</sup> Tiemi, L., Vieira, R., Lajolo, F., Genovese, M. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. Cienc. Tecnol. Aliment, Campinas. 2007.



### 3.7 Determinación de actividad antioxidante.

#### 3.7.1 Método de DPPH

Se empleó el método original de Bran-Williams *et al.*<sup>37</sup> con algunas modificaciones descritas por Thaipong *et al.*<sup>38</sup>

Se preparó una solución madre de 2,2-difenil-1-picryl hidrazilo (DPPH), para lo cual se pesó 0,024 g (balanza analítica Ohaus) y se disolvió en 100 mL de metanol, a esta solución madre se la almacenó a 4°C hasta su uso.

Para la solución trabajo se tomó 10 mL de la solución madre y se diluyó en 75 mL de metanol, hasta alcanzar una absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  unidades. Medida en espectrofotómetro UV visible (Jenway 6400) a 515 nm. Se preparó un blanco con metanol para ajustar el espectrofotómetro a cero.

Se preparó una curva de calibración con Trolox, para lo cual se pesó 0,0250 g de Trolox y se aforó a 100 mL con metanol. De la solución se tomaron alícuotas (0,2; 2; 4; 6; 7 y 8  $\mu$ L) cada una de estas alícuotas fueron llevadas a un volumen de 25 mL con metanol para tener concentraciones de 2-80 ppm. De cada concentración se tomó 150  $\mu$ L y se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de DPPH, se dejó reaccionar por 30 min en obscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm.

---

<sup>37</sup> Brand, W., Cuvelier, M., Borfet, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.

<sup>38</sup> Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros, L., Hawkins, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006.



Por cada extracto se tomó 150  $\mu$ L, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de DPPH y se dejó reaccionar por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, luego se midió la absorbancia a 515 nm. La cuantificación se realizó utilizando la curva de calibración, los resultados fueron expresados en  $\mu$ Mol equivalentes de Trolox / g de pulpa fresca ( $\mu$ Mol TE / g PF) y representan el valor promedio de tres repeticiones. En el Anexo 5 se muestra un esquema del procedimiento.

### 3.7.2 Método ABTS

Se utilizó el método descrito por Arnao *et al.*<sup>39</sup> con algunas modificaciones descritas por Thaipong *et al.*<sup>38</sup> Se preparó una solución stock de 2,2 azinobis -(3- Etilbenzotiazolín 6 ácido sulfónico) (ABTS) 7 mM. Para la solución madre se requirió de la preparación de dos soluciones: solución (A) se pesó 0,1015 g de ABTS y se aforó con 25 mL de agua destilada, solución (B) se pesó 0,01757 g de persulfato de potasio 2.6 mM aforados con 25 mL de agua destilada. Las soluciones A y B fueron vertidas al mismo tiempo en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio, se dejó reposar durante 12 horas en oscuridad a temperatura ambiente.

Para la solución trabajo se tomó 4 mL de la solución madre y se diluyó en 120 mL con metanol hasta alcanzar una absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  unidades a 734 nm. Se preparó un blanco con metanol para ajustar el espectrofotómetro a cero.

Se preparó una curva de calibración con Trolox, para lo cual se pesó 0,0250 g aforado a 100 mL con metanol, se prepararon soluciones a diferentes concentraciones (2-80 ppm) como se detalló anteriormente en el apartado 3.7.1.

---

<sup>38</sup> Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosbyb, K., Cisneros, L., Hawkins, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of food Composition and Analysis. 2006.

<sup>39</sup> Arnao, M., Cano, A., Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Analytical, nutritional and clinical methods section. Food Chemistry. 2000.





Se tomó 150  $\mu$ L de cada concentración, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de ABTS y se dejó reaccionar por 7 min en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm.

Por cada extracto se tomó 150  $\mu$ L, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de ABTS y se procedió igual que las soluciones para la curva de calibración. La cuantificación se realizó utilizando la curva de calibración, los resultados fueron expresados en  $\mu$ Mol equivalentes de Trolox / g de pulpa fresca y representan el valor promedio de tres repeticiones.

El esquema del procedimiento se puede observar con mayor claridad en el Anexo 6.

### **3.7.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)**

Se empleó el método descrito por Benzie y Strain.<sup>40</sup> Se prepararon diferentes soluciones por separado. Para la solución madre incluyeron: 300 mM de buffer acetato de sodio, para lo cual se pesó 9,6875 g de  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  diluidos en 50 mL de ácido acético (10 mM) con pH 3,6, para la otra solución se pesó 0,0312 g de 2, 4, 6-tri-(2-piridil-s-triazina (TPTZ) diluidos en 10 mL de HCl (40 mM), para la tercera solución se pesó 0,054 g de una solución de cloruro férrico hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 20 mM. La solución de trabajo fue preparada con la mezcla de 25 mL de buffer acetato de sodio, 2,5 mL de solución TPTZ y 2,5 mL de solución de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . Una vez preparados todas las soluciones reactantes se mezclaron y antes de su primer uso se calentó en un baño de calentamiento (Buchi R200) a 37°C.

Se preparó una curva de calibración con Trolox, para lo cual se pesó 0,0250 g, preparando soluciones a diferentes concentraciones (2-80 ppm) como se detalló anteriormente.

Se tomó 150  $\mu$ L de cada concentración, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo FRAP y se dejó reaccionar por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm.

---

<sup>40</sup> Benzie, I., Strain, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Analytical, Biochemistry. 1996.



Por cada extracto se tomó 150  $\mu$ L, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de FRAP y se procedió igual que las soluciones para la curva de calibración. La cuantificación se realizó utilizando la curva de calibración, los resultados fueron expresados en  $\mu$ Mol equivalentes de Trolox / g de pulpa fresca y representan el valor promedio de tres repeticiones.

El esquema del procedimiento se puede observar con mayor claridad en el Anexo 7.

### 3.7.4 Determinación de fenoles totales.

Se realizó con el método de Folín Ciocalteu descrito por Peschel *et al.*<sup>41</sup> Para la curva de calibración se preparó una solución referencial con ácido gálico, se pesó 26,88 mg aforados a 100 mL con metanol. De la solución se tomaron alícuotas (0,4; 1; 2; 4; 6 y 8  $\mu$ L) que fueron llevados a un volumen de 10 mL con metanol para tener concentraciones de 1,04-20,8 ppm.

De cada concentración se tomó 150  $\mu$ L, 2400 mL de agua destilada y 150  $\mu$ L de Folín 0.25N. La mezcla se llevo a un volumen final de 10mL con agua destilada, se agitó por 2 min y se dejó reaccionar por 3 min (5 min). Seguidamente se adicionó 300  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó y se hizo reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm.

La cuantificación se realizó utilizando la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico / 100g de pulpa fresca (mg eq. A.G / 100g PF).

Por cada extracto se tomó 150  $\mu$ L de cada muestra, se mezcló con 2400 mL de agua destilada y 150  $\mu$ L de Folín 0.25N, se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada, la mezcla se agitó por 2 min y se dejó reaccionar por 3 min (5 min). Seguidamente se adicionó 300  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó y se hizo reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente. Se midió a una longitud de onda de 725 nm.

---

<sup>41</sup> Peschel, W., Dieckman, W., Sonnenschein, M., Plescher, A. HIGH ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PRESSING RESIDUES FROM EVENING PRIMROSE IN COMPARISON TO OTHER OILSEED CAKES AND PLANT ANTIOXIDANT. Science Direct. Industrial crops and products an international journal. 2006



El esquema del procedimiento se puede observar con mayor claridad en el Anexo 8.

### **3.8 Análisis de Datos**

Los datos obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante para DPPH, ABTS y FRAP fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de pulpa fresca ( $\mu\text{Mol Eq Trolox / g PF}$ ) y para Fenoles Totales en miligramos equivalentes a ácido gálico / 100 gramos de pulpa fresca ( $\text{mg. eq. AG / 100 g PF}$ ). Las curvas de calibración se obtuvieron un coeficiente de correlación  $r^2$ ; sobre 0,99 (Anexo 15).

El análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se efectuaron con la ayuda del programa MINITAB 14, para el mismo se realizó la prueba de ANOVA para determinar la existencia y el nivel de diferencia significativa entre los factores en mención, con un intervalo de confianza del 95%.

# Capítulo IV

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4. Caracterización de la pulpa fresca de café

### 4.1 Determinación de color, humedad, pH, sólidos solubles totales.

Los datos en función al color, humedad, pH y sólidos solubles totales en conjunto fueron indicadores del alto grado de madurez que presentó la pulpa fresca de café analizada<sup>24</sup> además de las condiciones de adaptación para su hábitat y la selección del fruto según las prácticas de cultivo de café. Los colores más representativos encontrados mediante la carta de colores The Royal Horticultural Society (RHS) fueron Orange-Red Group N53-A, B y Greyed Purple Group 187 A para los tres muestreos en estudio.

El pH varió de acuerdo a la altitud de su hábitat y condiciones climáticas en cantidades iguales,<sup>42</sup> en este caso el café de Vilcabamba (cultivado a una altitud de 1900 msnm) presentó una media de  $5,86 \pm 1,08$  los cuales fueron indicativos para resaltar que las condiciones de selección del fruto estuvieron dentro de su área geográfica.

En base a la determinación de sólidos solubles totales se pudo determinar la madurez del fruto (15 °Brix), el cual estuvo dentro del rango de los frutos maduros<sup>24</sup> además que se pudo constatar por medio de la caracterización del color del fruto ver tabla 4.

---

<sup>24</sup> Rodríguez, N. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional: Gestión Integral de Residuos sólidos y Peligrosos, Siglo XXI. 2002.

<sup>42</sup> Buenaventura, C., Castaño, J. Influencia de la altitud en la calidad de la bebida de muestras de café procedente del Ecotopo 206B en Colombia. Cenicafé. 2002.



En cuanto al porcentaje de humedad de la pulpa fresca de café presentó un valor promedio entre los tres muestreos de  $88,31 \pm 0,50\%$ , este valor es aceptable comparado con valores señalados por Marín *et al.*<sup>44</sup>, Blandón *et al.*<sup>43</sup> y Valencia<sup>45</sup> de 69,70 %, 74,83 % y 80,31 % respectivamente, estos datos tienen similitud y están relacionados directamente con la altitud, los mismos factores de la altitud hacen que ciertas propiedades organolépticas del café se acentúen a medida que se incremente la altura.

Es decir todas estas características organolépticas que presentó la pulpa fresca de café fueron satisfactorias a la hora de hacer la selección del fruto.

**Tabla 4.** Caracterización de la pulpa fresca de café

MUESTREO	HUMEDAD %	pH	Sólidos Solubles °BRIX	COLOR
Lote 1	$88,69 \pm 0,57$	$4,78 \pm 0,01$	14	Red Group 53 A, B Greyed-Purple Group 187 A.
Lote 2	$88,25 \pm 0,02$	$6,90 \pm 0,04$	15	Red Group 53 A, B Greyed-Purple Group 187 A.
Lote 3	$88,15 \pm 0,03$	$5,92 \pm 0,04$	15	Red Group 53 A, B Greyed-Purple Group 187 A.

N= 3, muestras de pulpa de café expresados promedio  $\pm$  desviación estándar

**Fuente:** Investigación experimental

**Elaboración:** La Autora

<sup>43</sup> Blandón, G., Dávila, M., Rodríguez, N. Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. Cenicafé. 1999.

<sup>44</sup> Marín, S., Arcila, J., Montoya, E., Oliveros, C. Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L. variación Colombia). Cenicafé. 2003.

<sup>45</sup> Valencia, M. 2008. Estudio químico de la pulpa de café. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales, Colombia. 2008.



## 4.2 Rendimiento de Extracción

En la tabla 5, se observa el rendimiento de extracción que se obtuvo con los solventes puros en cuestión: metanol presentó un promedio de 55,6 % y el etanol 30,3%. Sin duda alguna el rendimiento más alto se obtuvo con el extracto metanólico el cual fue expresado como g extracto / g muestra fresca. Este resultado tuvo importante relevancia debido a que el metanol es de mayor polaridad que el etanol, por ende la capacidad de extracción de compuestos es mayor.<sup>46</sup>

**Tabla 5.** Rendimiento de los extractos secos

Muestreo	Solvente	Rendimiento
Lote 1	Metanol	57 % ± 7,134
	Etanol	26 % ± 7,134
Lote 2	Metanol	56 % ± 0,002
	Etanol	36 % ± 0,002
Lote 3	Metanol	54 % ± 0,001
	Etanol	29 % ± 0,001

N= 3, muestras de pulpa de café expresados promedio ± desviación estándar

Fuente: Investigación experimental

Elaboración: La Autora

Mientras que el método para mezcla de solventes no permitió expresar el rendimiento de extracción, debido a que los solventes utilizados no se encuentran en su estado puro y por lo tanto es más difícil obtener el peso seco extraído de la muestra y mucho menos la evaporación de los mismos. Sin embargo este método se utilizó como referencia en evaluación de actividad antioxidante en frutas y hortalizas.<sup>47</sup>

<sup>46</sup> Martínez, J., Salas, R., Cardador, M. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helicarpus Terebinthinaceus*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Oaxaca. 2007.

<sup>47</sup> Pérez, J., Saura, F. Metodología para la Evaluación de Capacidad Antioxidante en Frutas y Hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 2007.



### 4.3 Determinación de Actividad Antioxidante

Los resultados para la determinación de antioxidantes en todos los métodos fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. A continuación en la tabla 6 se presentan resumidos los resultados de Actividad antioxidante y Fenoles totales.

**Tabla 6.** Resultados de actividad antioxidante: DPPH, ABTS, FRAP y Fenoles Totales

Café	Información	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g PF}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g PF}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g PF}$ )	Fenoles totales (mg GAE/100g PF)
	Extracto MeOH	6,10 $\pm$ 0,13	3,38 $\pm$ 0,52	5,33 $\pm$ 0,35	29,36 $\pm$ 1,29
	Extracto EtOH	0,96 $\pm$ 0,12	2,59 $\pm$ 1,84	2,88 $\pm$ 0,17	38,59 $\pm$ 2,67
	Extracto Metanol-Acetona	22,85 $\pm$ 1,14	17,93 $\pm$ 1,66	25,58 $\pm$ 0,02	135,16 $\pm$ 5,51

( $\mu\text{mol TE/g PF}$ ): (micromoles equivalentes de trolox/gramo de Pulpa Fresca); (mg GAE/100g PF): miligramos equivalentes de ácido gálico/100gramos de Pulpa Fresca)

N= 3, muestras de pulpa de café expresados promedio  $\pm$  desviación estándar.

Fuente: Investigación experimental

Elaboración: La Autora

#### 4.3.1 Método DPPH

El resultado en  $\mu\text{Mol TE / g PF}$ , para el método DPPH fue mayor con la mezcla de solventes: metanol/acetona; teniendo en cuenta que no son compuestos puros, el agua es el principal solvente que presenta una alta polaridad y por ende una mayor capacidad de extracción de compuestos antioxidantes,<sup>46</sup> el menos reactivo en este caso fue el etanol 0,96  $\pm$  0,12.

<sup>46</sup> Martínez, J., Salas, R., Cardador, M. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Oaxaca. 2007.





El análisis de varianza y la prueba de tukey mostraron que existió diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ ) para los distintos solventes, (Anexo 9. 11a, gráfica 7). Evidenciando que el extracto con mezcla de solventes presentó mayor actividad antioxidante.

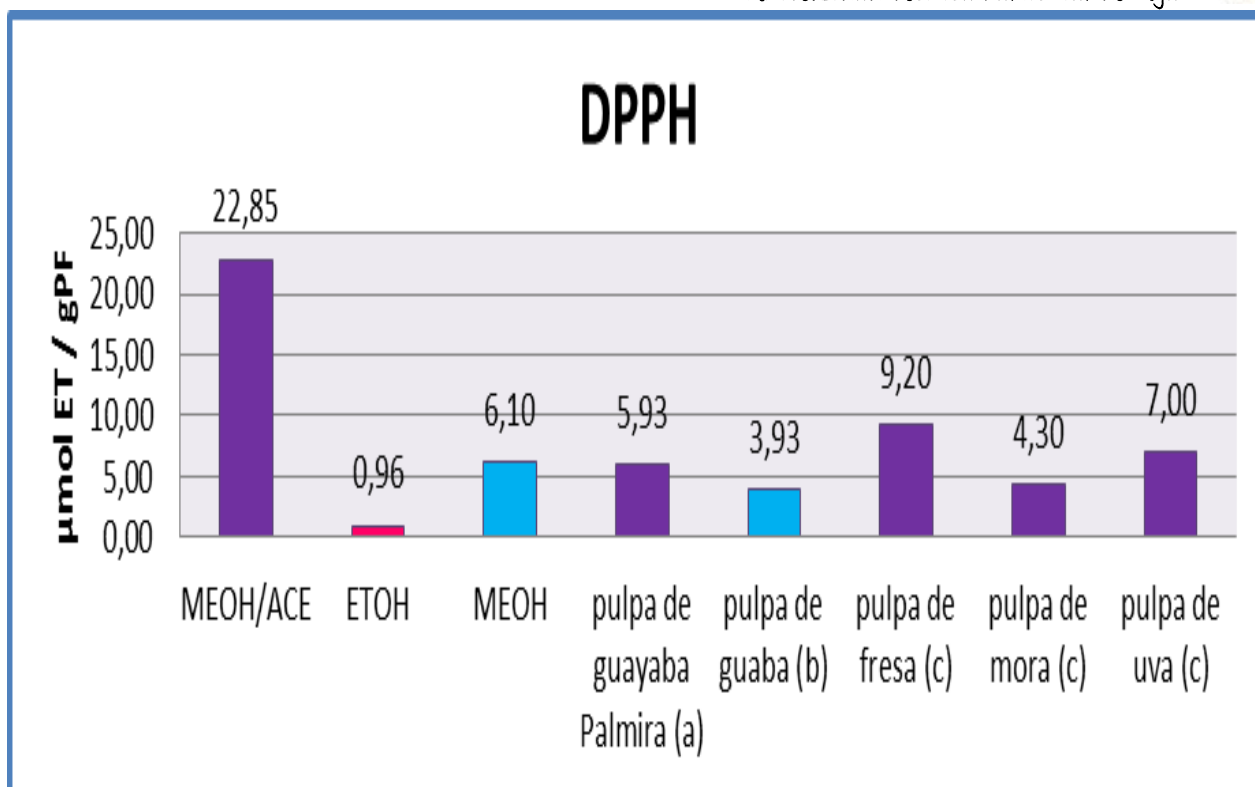
En estudios realizados con pulpa de guaba (b)<sup>38</sup> en extractos metanólicos, los compuestos antioxidantes expresaron 3,93  $\mu\text{Moles}$  de trolox / g MBH, los cuales son menores a los valores obtenidos en nuestro estudio pulpa fresca de café y al solvente en mención, (ver grafica 1). Además otros autores<sup>31</sup> han realizado ensayos en pulpa de guayaba (a), con extracto etanólico y el resultado 5,93  $\mu\text{Mol ET/ g MBH}$  es menor en comparación al de nuestro estudio, pero para metanol es mucho mayor, estos datos muestran similitud en cuanto a la cuantificación de antioxidantes, siendo satisfactoria para nuestro caso. Otro estudio en pulpas de frutas como la fresa (c), mora (c) y uva (c)<sup>48</sup> muestran valores de actividad antioxidante semejantes cuando se compara con metanol, los mismos que son significativos y a la vez muy provisionarios a los obtenidos en nuestro estudio, esto lleva decir que el residuo de pulpa de café contiene un porcentaje aceptable de actividad antioxidante.

---

<sup>31</sup> Espinal, M., Restrepo, L. Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira Ica I (***Psidium guajava***). Tesis presentada como requisito para optar al título de Magister en Ciencias Química. Bogotá. 2010.

<sup>38</sup> Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosbyb, K., Cisneros, L., Hawkins, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of food Composition and Analysis. 2006.

<sup>48</sup> Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Fett, R. Comparación de Métodos en la Determinación de la Actividad Antioxidante de Pulpas de Frutos Congelados. Schironia. Pag. 17-19. Brasil. 2006.

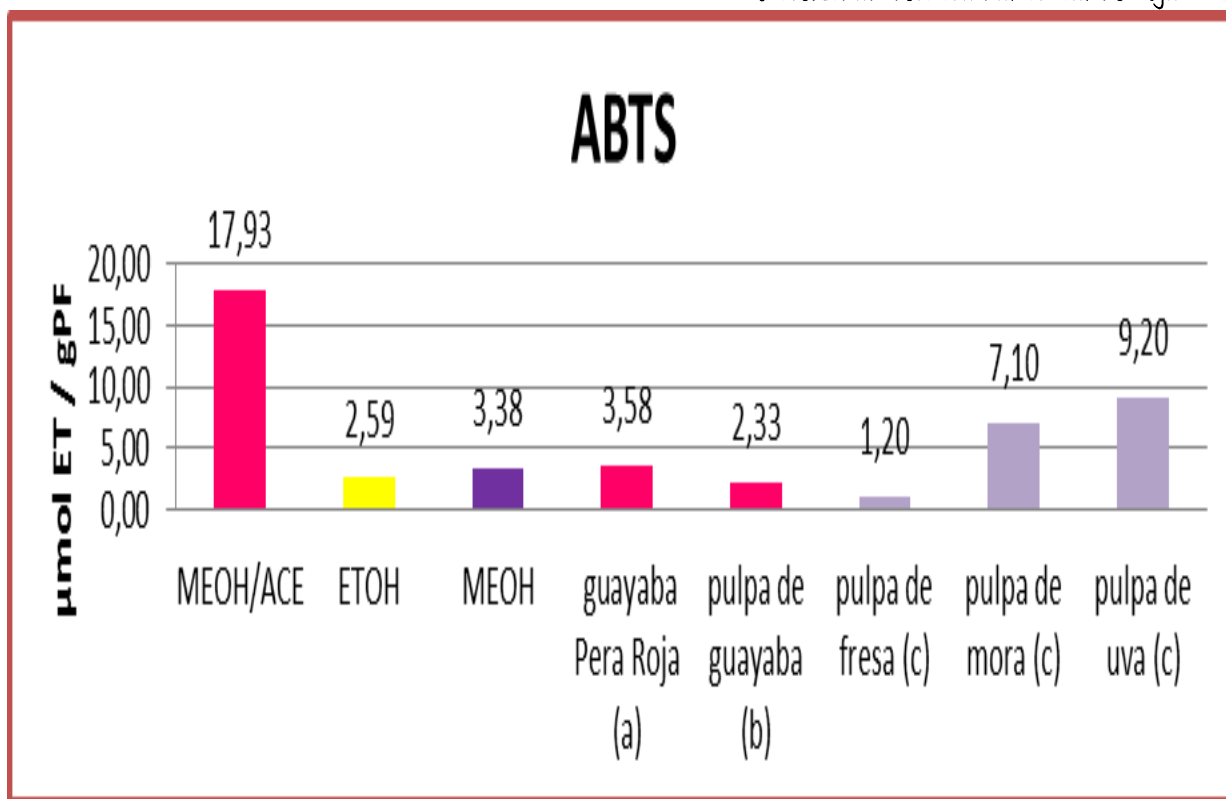


Grafica 1: Actividad Antioxidante comparada con residuos frescos

#### 4.3.2 Método ABTS

En la Tabla 6, se observa que la cuantificación de antioxidantes obtenidos con el método de ABTS fue mayor con la mezcla de solventes: metanol/acetona, el valor menos reactivo fue el etanol  $2,59 \pm 1,84$ .

El análisis de varianza y la prueba de tukey mostraron que existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% ( $p > 0,5$ ) para los distintos solventes, (ver Anexo 9. 11b, gráfica 8).



**Grafica 2:** Actividad Antioxidante comparada con residuos frescos

En estudios realizados con pulpas de frutas de guayaba (a)<sup>32</sup> con pulpa de frutas de fresa (c), mora (c), uva (c)<sup>48</sup> y con pulpa de guayaba de variedad Pera Roja (a)<sup>49</sup> trabajaron con metanol (50:50, v/v)/acetona (70:30,v/v), los mismos que concluyeron que la guayaba es buena fuente de antioxidantes y que el solvente utilizado presentó mayor atracción de compuestos antioxidantes.

<sup>32</sup> Restrepo, D., Narváez, C., Restrepo, L. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez- Santander. Quim Nova. Vol 32. Bogotá- Colombia. 2009.

<sup>48</sup> Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Fett, R. Comparación de Métodos en la Determinación de la Actividad Antioxidante de Pulpas de Frutos Congelados. Schironia. Pag. 17-19. Brasil. 2006.

<sup>49</sup> Rojas, D., Narváez, E., Restrepo, L. Evaluación del contenido de Vitamina C, Fenoles Totales y Actividad Antioxidante en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades Pera, Regional Roja y Regional Blanca. Red-Alfa Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena. 2008.



En estos casos la actividad antioxidante medida por la técnica de ABTS mostró valores inferiores a los de nuestro estudio con el mismo solvente de extracción. Esto denota que la pulpa fresca de café presenta mayor actividad antioxidante y por ende las propiedades que posee podrían ser beneficiosas en su uso como fuente alternativa de antioxidantes.

#### 4.3.3 Método FRAP

En la Tabla 6, se observa que la actividad antioxidante para FRAP fue más satisfactoria para la mezcla de solventes: metanol/acetona, alcanzando un valor de  $25,58 \pm 0,02$  debido a la polaridad que presentan dichos solventes.<sup>46</sup>

El análisis de varianza y la prueba de tukey mostraron que existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.5$ ) para los distintos solventes metanol, etanol y en especial para metanol/acetona, (ver Anexo 9. 11c).

En el estudio de pulpa de guayaba (a),<sup>32,49</sup> se efectuaron los análisis de actividad antioxidante evaluando el tiempo de extracción con metanol/acetona, los valores obtenidos fueron menores a los de nuestro estudio  $11,20 \pm 0,02$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  muestra B.H, los cuales son indicativos favorables para nuestro estudio en pulpa fresca de café, ya que también hay que considerar que el valor de la guayaba esta en un rango aceptable debido a que es una fruta de consumo directo.

---

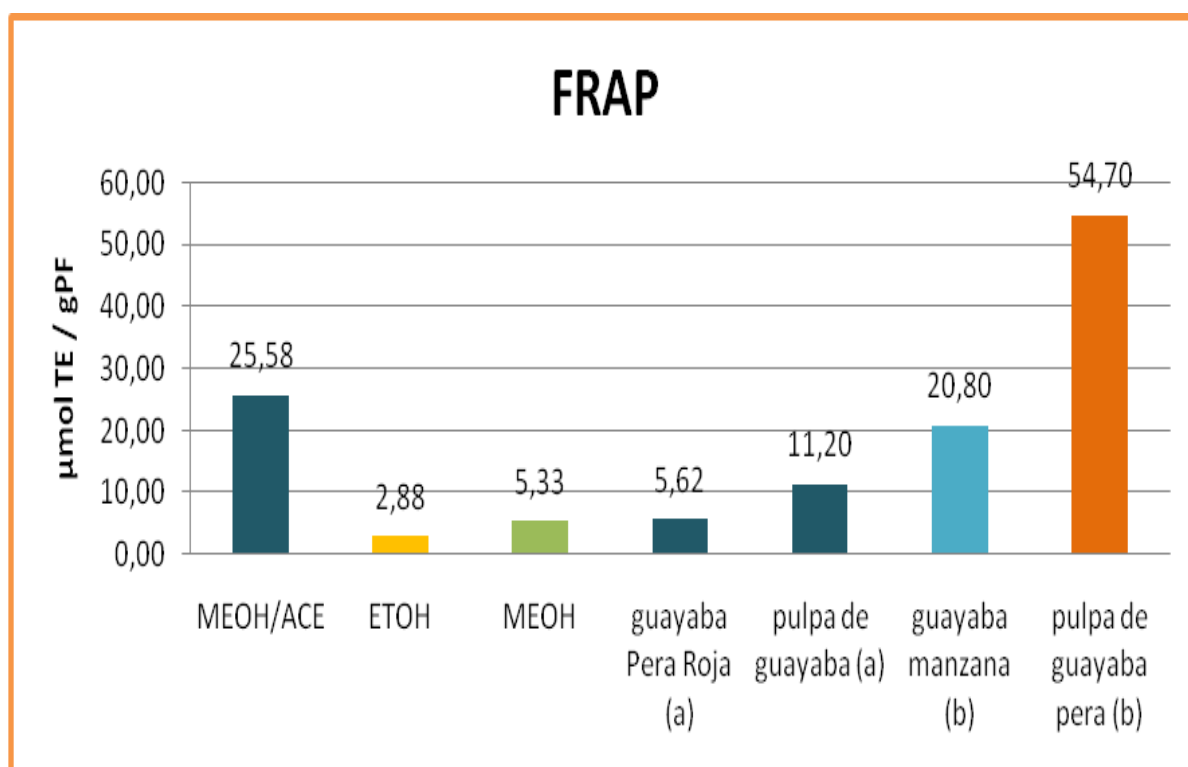
<sup>32</sup> Restrepo, D., Narváez, C., Restrepo, L. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez- Santander. Quim Nova. Vol 32. Bogotá- Colombia. 2009.

<sup>46</sup> Martínez, J., Salas, R., Cardador, M. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Oaxaca. 2007.

<sup>49</sup> Rojas, D., Narváez, E., Restrepo, L. Evaluación del contenido de Vitamina C, Fenoles Totales y Actividad Antioxidante en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades Pera, Regional Roja y Regional Blanca. Red-Alfa Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena. 2008.



También existen otros valores reportados previamente por otros autores,<sup>32</sup> tal como se observa en la gráfica 3, los mismos que muestran relación con los resultados obtenidos en la pulpa fresca de café, ya que la mayor extracción fue obtenida con mezcla de solventes: metanol/acetona debido al grado de polaridad que presentan dichos solventes, esto hace que el tratamiento resulte beneficioso y pueda ser una fuente alternativa de antioxidantes.



**Grafica 3:** Actividad Anioxidante comparada con residuos frescos

<sup>32</sup> Restrepo, D., Narváez, C., Restrepo, L. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez- Santander. Quim Nova. Vol 32. Bogotá- Colombia. 2009.



#### 4.3.4 Método Fenoles Totales

En la Tabla 6, se observa que la actividad antioxidante para fenoles totales utilizando como referencial ácido gálico el valor más representativo fue mezcla de solventes (metanol/acetona)  $135,16 \pm 5,51$  mg AG / 100g PF ya que mostró mayor captación de compuestos fenólicos.

El análisis de varianza y la prueba de tukey mostraron que existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.5$ ) para los distintos solventes metanol, etanol y metanol/acetona (ver Anexo 9. 11d).

En estudios realizados para determinar el contenido de fenoles totales con metanol/acetona en los diferentes frutos citados<sup>32, 48, 49</sup> los valores se muestran mayores a los obtenidos con pulpa fresca de café, debido a que el método determina aquellos compuestos con características similares al ácido gálico empleado como estándar, además de ello la pulpa de café posee compuestos de mayor peso molecular y de diferente estructura,<sup>28,32,48</sup> aunque también la polaridad que presentan, los cuales estuvieron expresados en mg AG/100g PF, ver gráfica 4.

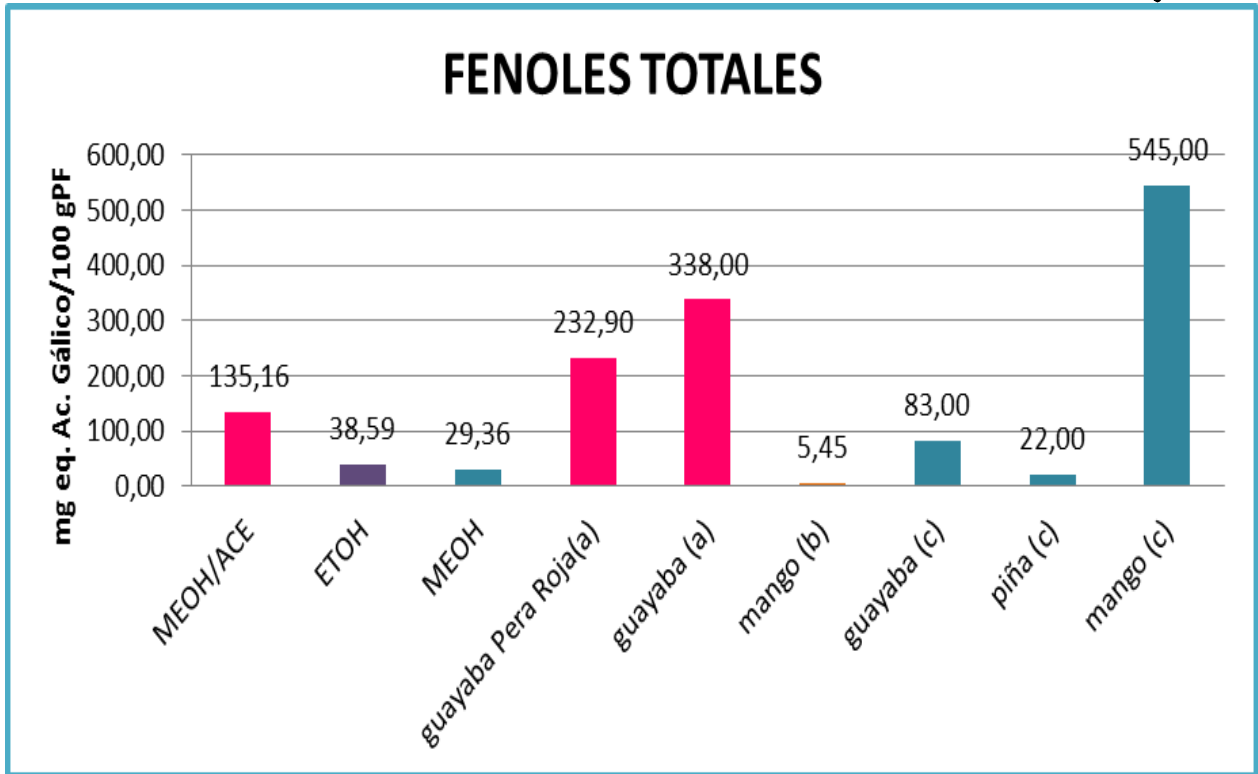
---

<sup>28</sup> Castañeda, C., Ramos L., Ibáñez, V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. Vol 8. 2008.

<sup>32</sup> Restrepo, D., Narváez, C., Restrepo, L. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez- Santander. Quim Nova. Vol 32. Bogotá- Colombia. 2009.

<sup>48</sup> Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Fett, R. Comparación de Métodos en la Determinación de la Actividad Antioxidante de Pulpas de Frutos Congelados. Schironia. Pag. 17-19. Brasil. 2006

<sup>49</sup> Rojas, D., Narváez, E., Restrepo, L. Evaluación del contenido de Vitamina C, Fenoles Totales y Actividad Antioxidante en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades Pera, Regional Roja y Regional Blanca. Red-Alfa Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena. 2008.



**Grafica 4:** Actividad antioxidante comparada con residuos frescos.

Estos resultados mostraron que la pulpa fresca de café contiene compuestos fenólicos importantes<sup>1</sup> que pueden ser considerados como una fuente alternativa de antioxidantes dependiendo a la reacción con los diferentes solventes de extracción.

# Capítulo V

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**





## 5. CONCLUSIONES

- La cuantificación de antioxidantes presentes en la pulpa fresca de café mostró los siguientes valores expresados en  $\mu\text{Mol eq. Trolox} / \text{g PF DPPH}$ : metanol  $6,10 \pm 0,13$ ; etanol  $0,96 \pm 0,12$ ; metanol/acetona  $22,85 \pm 1,14$ ; ABTS: metanol  $3,38 \pm 0,05$ ; etanol  $2,59 \pm 1,84$ ; metanol/acetona  $17,93 \pm 1,66$ ; FRAP: metanol  $5,33 \pm 0,35$ ; etanol  $2,88 \pm 0,17$ ; metanol/acetona  $25,58 \pm 0,02$  y para Fenoles Totales expresados en  $\text{mg eq. Acido Gálico} / 100\text{g PF}$ : metanol  $29,36 \pm 1,29$ ; etanol  $38,59 \pm 2,67$ , metanol/acetona  $135,16 \pm 5,51$ . Estos resultados al ser comparados con otras fuentes tradicionales permiten concluir que la pulpa fresca de café si puede ser considerada una fuente alternativa de antioxidantes.
- El tipo de solvente si influye en el rendimiento de extracción, así como en los valores de actividad antioxidante. Los extractos etanólicos presentaron los valores más bajos en comparación al metanol (2 veces mayor) y a la mezcla de solventes (10 veces mayor).
- Los valores más representativos son los obtenidos con mezcla de solventes (metanol/acetona), los mismos que se obtuvieron en base a los diferentes solventes de extracción.

## 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un seguimiento de la pulpa fresca de café ya que sabe que contiene compuestos antioxidantes importantes, que pueden ser identificados mediante HPLC y de tal manera resultan benéficos ya sea en el campo alimentario como farmacéutico y también empleando nuevas tecnologías como Fluidos Supercríticos debido a las ventajas que presenta.
- Se recomienda realizar los ensayos de antioxidantes en el tiempo más corto posible debido a que son de fácil degradación a los factores ambientales en los que se trabaje.



- Las muestras deben ser leídas en el tiempo de reacción establecido por la técnica descrita, con la finalidad de evitar falsos resultados o que sean erróneos al momento de reportar, debido a la sensibilidad que presenta dichos antioxidantes.
- Evaluar la actividad antioxidante mediante métodos *in vivo* para determinar las interacciones sinérgicas que existen entre los diferentes métodos de extracción, como la reducción de metales (FRAP), o radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), que pueden ser perjudiciales para la salud.
- Mejorar el proceso de extracción con etanol u otros solventes permitidos para la industria alimentaria y farmacéutica, buscando métodos de extracción adecuados utilizando disolventes convencionales con distinta polaridad para la posterior eliminación del mismo y así poder obtener un extracto concentrado, además de las ventajas de reducir el tiempo de extracción, el consumo de solventes orgánicos, etc.
- Trabajar en eliminar las interferencias que afectan la correcta lectura de fenoles totales y actividad antioxidante.

# **ANEXOS**



**Anexo 1: (a,b,c y d):** Fotografías de caracterización de la pulpa fresca de café



**Anexo 1a. Muestreo**



**Anexo 1b. muestra + Cápsulas**



**Anexo 1c. Estufa**



**Anexo 1d. Desecador**

**Anexo 2: (a, b y c):** Fotografías de obtención del extracto de la pulpa fresca de café



**Anexo 2a. Maceración dinámica (24 horas)**



**Anexo 2b. Eliminación del solvente**



**Anexo 2c. Peso del extracto**



**Anexo 3: (a y b) Fotografías de obtención del Método Patrón**

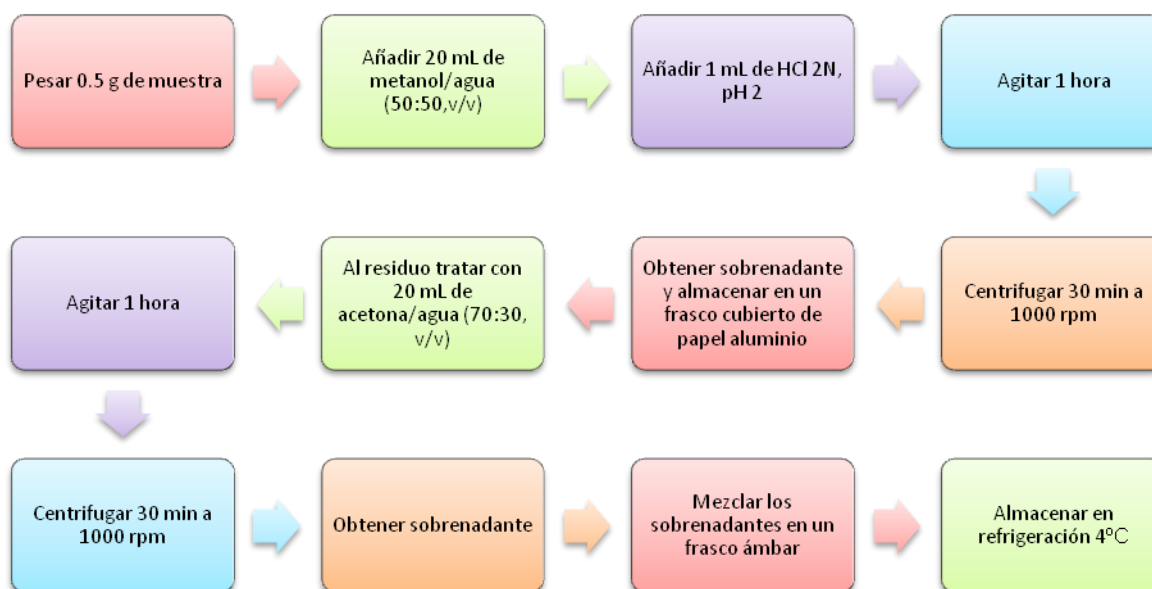


**Anexo 3a: centrifugación**



**Anexo 3b: Sobrenadante Método Patrón**

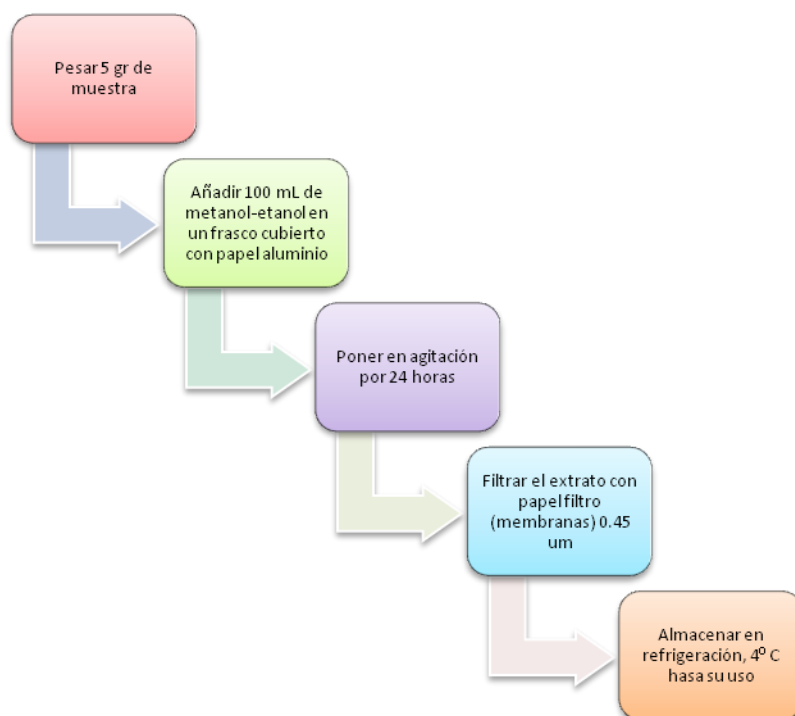
**Anexo 3: (c) Diagrama de obtención del Método Patrón**



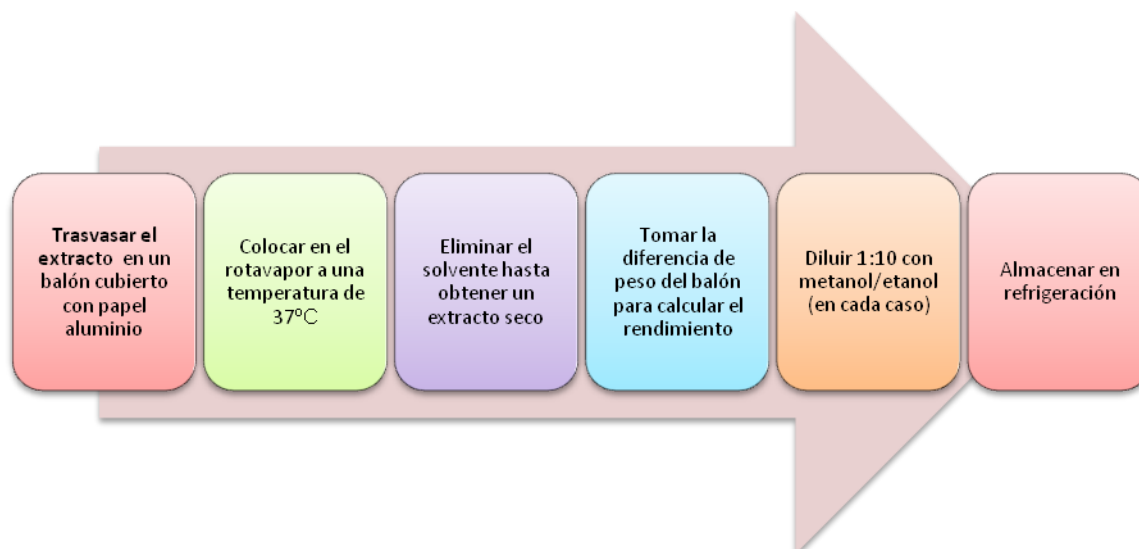
**Nota:** Los ensayos se realizan por triplicado



#### Anexo 4: Obtención del extracto Metanólico/Etanólico



#### Anexo 4.1: Procedimiento para eliminar el extracto



**Nota:** Los ensayos se realizan por triplicado



## Anexo 5: Determinación de Actividad Antioxidante

### Anexo 5.1: Determinación del Método DPPH

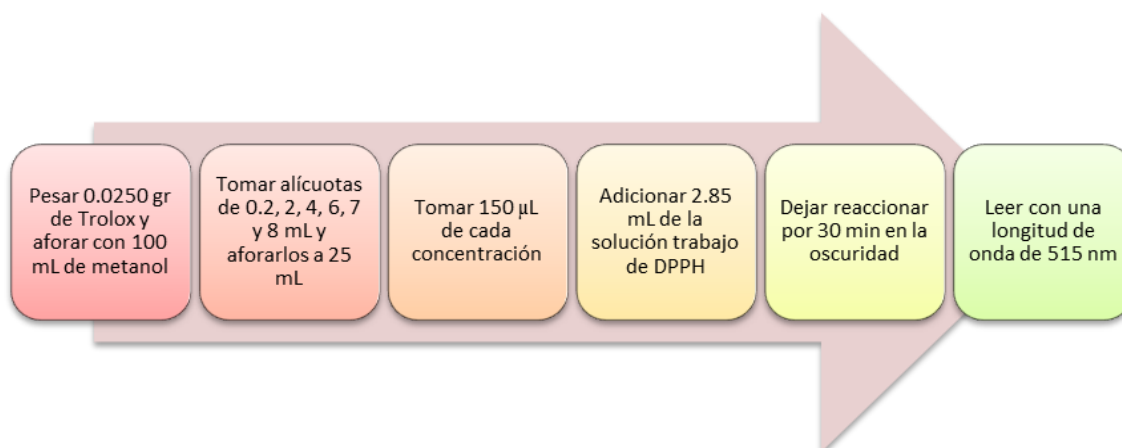
#### Preparar Solución Madre:

- Pesar 0.024gr DPPH y diluir en 100mL Metanol.
- Almacenarlo a 4°C hasta su uso.

#### Preparación de la Solución de trabajo

- De la Solución Stock, tomar 10mL y diluirlo con 75mL de Metanol hasta obtener una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 515 nm, de ser necesario ajustar con metanol a solución DPPH.

### Anexo 5.2: Preparación de la Curva de Calibración



#### Nota:

- Encerar el espectrofotómetro con metanol.
- Para el ensayo con el extracto se repite el mismo procedimiento, tomando 150 µL por cada extracto y adicionado 2.850 mL de solución trabajo.



## Anexo 6: Determinación del Método ABTS

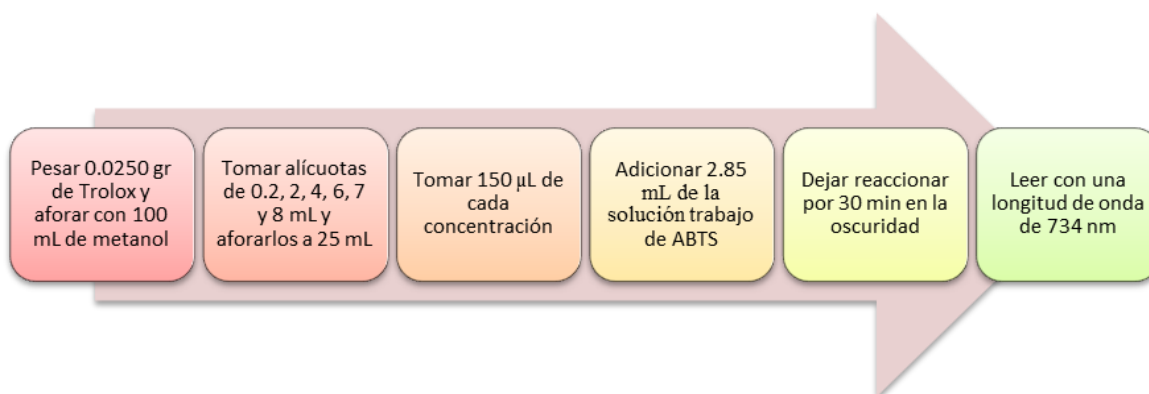
### Preparar Solución Madre:

- Pesar 0,1015 g ABTS (7.4 mM) y aforar a 25 mL con agua destilada.
- Pesar 0,01757 g de Persulfato de potasio (2.6mM) y aforarlo a 25 mL con agua destilada.
- Mezclar las dos soluciones y dejar reaccionar por 12 horas en la oscuridad a temperatura ambiente.

### Preparación de la Solución de trabajo

- La solución fue diluida mezclando 1mL de la solución Stock de ABTS con 40mL de Metanol, para obtener una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$ , de ser necesario ajustar con metanol ó solución ABTS.

### Anexo 6.1: Preparación de la Curva de Calibración.



### Nota:

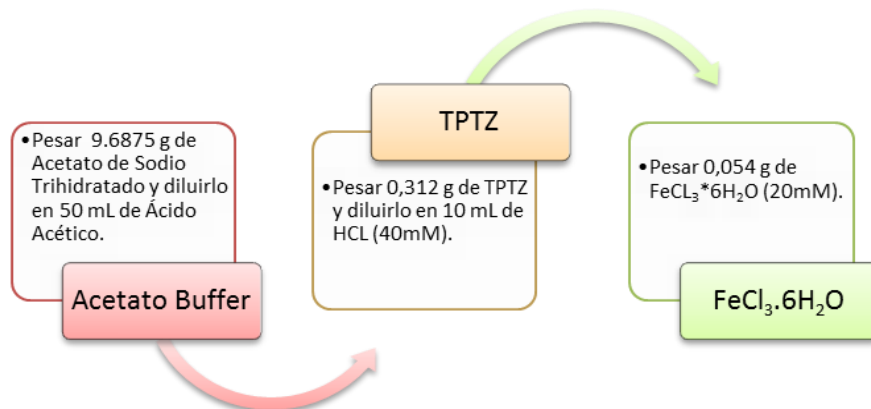
- Encerar el espectrofotómetro con metanol.
- Para el ensayo con el extracto se repite el mismo procedimiento, tomando 150 µL por cada extracto y adicionado 2.850 mL de solución trabajo.





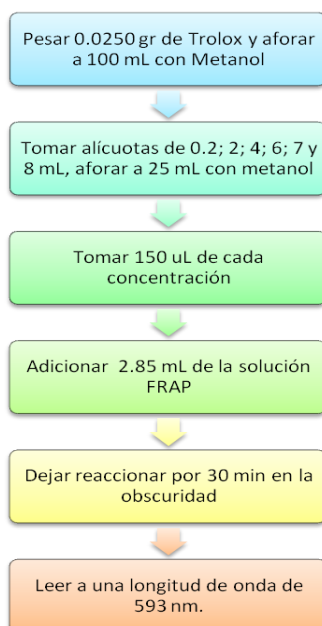
## Anexo 7: Determinación del Método FRAP

### Preparación de la solución FRAP



- Una vez preparado todos los reactivos, unir y mezclarlos. Antes de usarlo calentar a 37°C.

### Anexo 7.1: Determinación de la Curva de Calibración



#### Nota:

- Encerar el espectrofotómetro con metanol.
- Para el ensayo con el extracto se repite el mismo procedimiento, tomando 150 µL por cada extracto y adicionado 2.85 mL de solución trabajo.

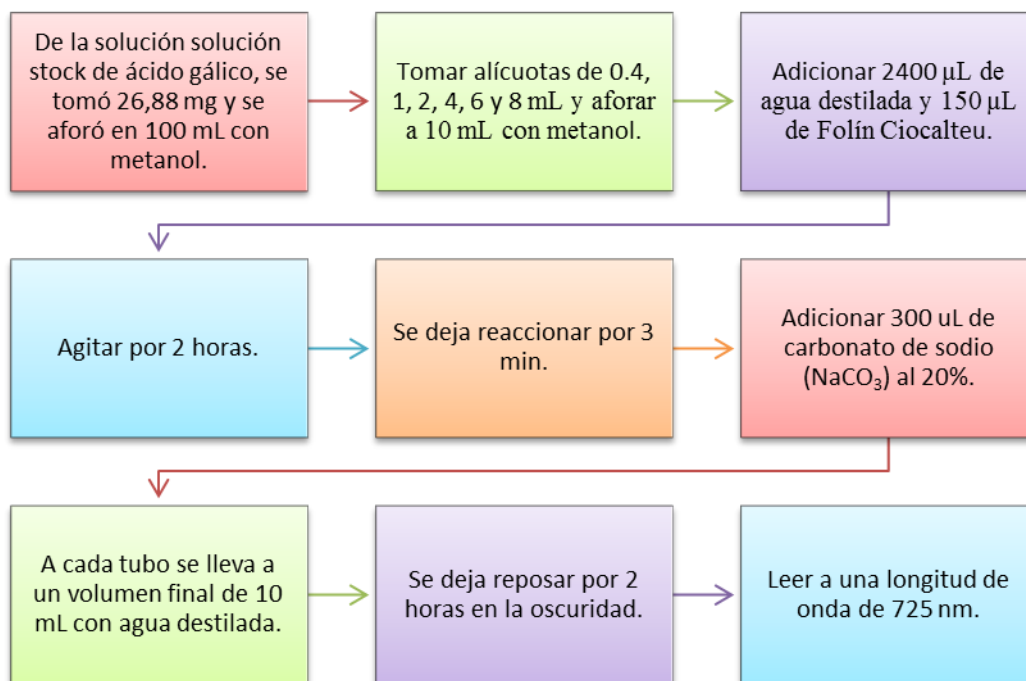


## Anexo 8: Determinación del Método de Fenoles Totales

### Preparación de Reactivos

- Preparar 100 mL de Folín 0.25N y 100 mL de agua destilada, el reactivo se protege de la luz y se coloca en refrigeración hasta su uso.
- Preparar Carbonato de Sodio al 20%; se pesa 10 g y se afora a 25 mL de agua destilada.
- Preparar una solución Stock de ácido gálico: pesar 0,02688 g y se afora a 100 mL de Metanol HPLC.

### Anexo 8.1: Determinación de la curva de calibración de fenoles totales



#### Nota:

- Encerar el espectrofotómetro con metanol.
- Para el ensayo con el extracto se repite el mismo procedimiento, tomando 150 µL por cada extracto y adicionado 2400 mL de agua destilada, 150 µL de Folín, se deja reaccionar por 5 min y se añade 300 µL de carbonato de calcio al 20%.

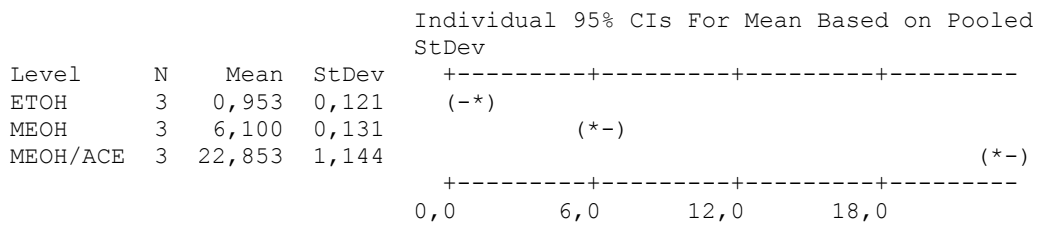


**Anexo 9:** Tablas de resultados del Anova para pulpa fresca de café.

**Anexo 9.1** One-way ANOVA: DPPH versus Extracción

Source	DF	SS	MS	F	P
EXTRACCION	2	786,772	393,386	880,74	0,000
Error	6	2,680	0,447		
Total	8	789,452			

S = 0,6683    R-Sq = 99,66%    R-Sq(adj) = 99,55%

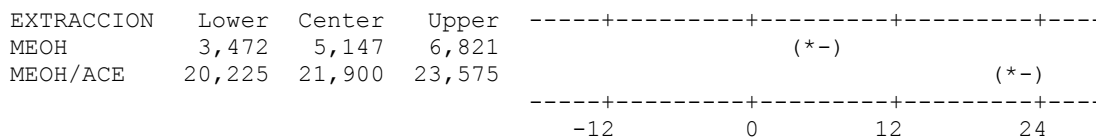


Pooled StDev = 0,668

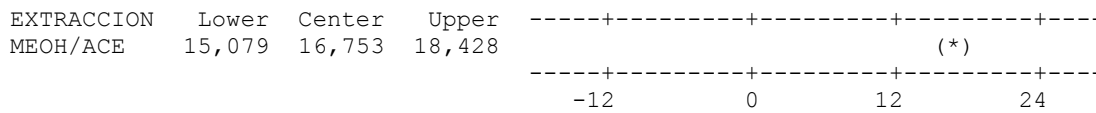
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of EXTRACCION

Individual confidence level = 97,80%

EXTRACCION = ETOH subtracted from:



EXTRACCION = MEOH subtracted from:



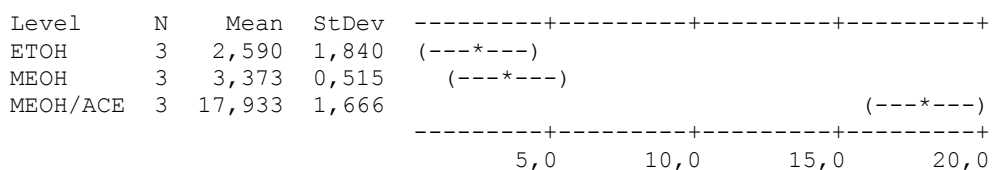


### Anexo 9.2 One-way ANOVA: ABTS versus Extracción

Source	DF	SS	MS	F	P
EXTRACCION	2	448,03	224,01	104,54	0,000
Error	6	12,86	2,14		
Total	8	460,88			

S = 1,464 R-Sq = 97,21% R-Sq(adj) = 96,28%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

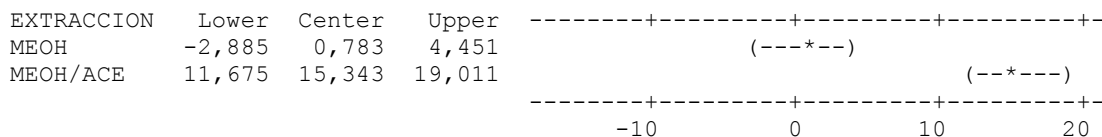


Pooled StDev = 1,464

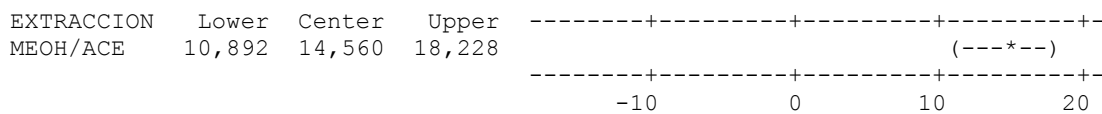
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of EXTRACCION

Individual confidence level = 97,80%

EXTRACCION = ETOH subtracted from:



EXTRACCION = MEOH subtracted from:



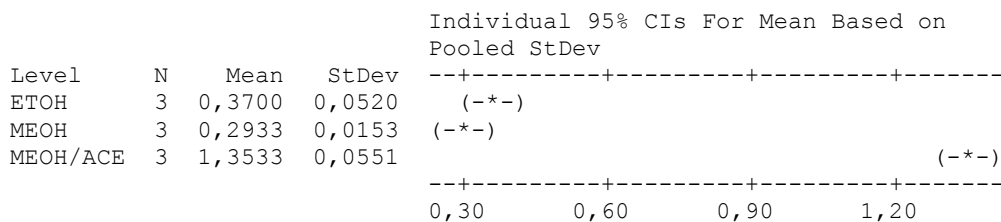




### Anexo 9.4 One-way ANOVA: Fenoles versus Extracción

Source	DF	SS	MS	F	P
EXTRACCION	2	2,09642	1,04821	527,03	0,000
Error	6	0,01193	0,00199		
Total	8	2,10836			

S = 0,04460 R-Sq = 99,43% R-Sq(adj) = 99,25%



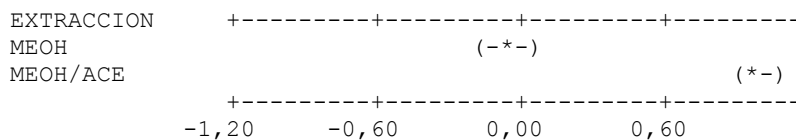
Pooled StDev = 0,0446

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of EXTRACCION

Individual confidence level = 97,80%

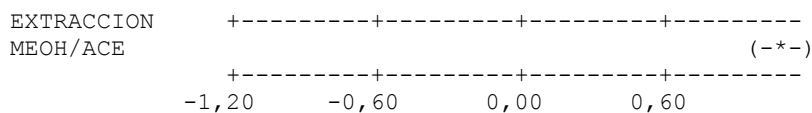
EXTRACCION = ETOH subtracted from:

EXTRACCION	Lower	Center	Upper
MEOH	-0,1884	-0,0767	0,0351
MEOH/ACE	0,8716	0,9833	1,0951



EXTRACCION = MEOH subtracted from:

EXTRACCION	Lower	Center	Upper
MEOH/ACE	0,9483	1,0600	1,1717





**Anexo 10:** (a, b, c y d) Análisis de Tukey para los diferentes métodos: DPPH, ABTS, FRAP y Fenoles Totales.

**a) DPPH**

Diferencia Poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$U_A - U_B$	$5,15 > 1,41$	Significativo
$U_A - U_C$	$16,75 > 1,41$	Significativo
$U_B - U_C$	$21,90 > 1,41$	Significativo

**b) ABTS**

Diferencia Poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$U_A - U_B$	$0,78 > 6,26$	No Significativo
$U_A - U_C$	$14,56 > 6,26$	Significativo
$U_B - U_C$	$15,34 > 6,26$	Significativo

**c) FRAP**

Diferencia Poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$U_A - U_B$	$2,45 > 1,29$	Significativo
$U_A - U_C$	$20,25 > 1,29$	Significativo
$U_B - U_C$	$22,70 > 1,29$	Significativo

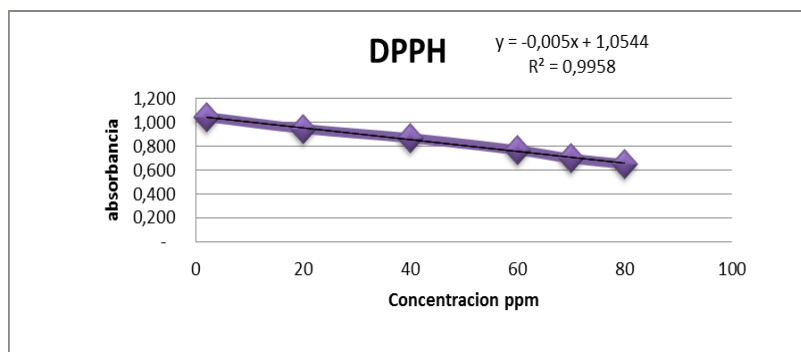
**d) Fenoles totales**

Diferencia Poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$U_A - U_B$	$0,10 > 0,97$	No Significativo
$U_A - U_C$	$1,06 > 0,97$	Significativo
$U_B - U_C$	$1,74 > 0,97$	Significativo

## Anexo 11. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA PULPA FRESCA DE CAFÉ, POR EL MÉTODO

### Anexo 11.1 Curva de calibración del DPPH

LONGITUD DE ONDA: 715nm      lectura de absorbancia: $1,1 \pm 0,2$						
CURVA DE CALIBRACIÓN: 1,102						
ESTÁNDARES:	ppm	Concentración en $\mu$ Moles Trolox	lectura de señal 1	lectura de señal 2	lectura de señal 3	Promedio de las señales
	2	8	1,040	1,047	1,044	1,044
	20	80	0,948	0,942	0,945	0,945
	40	160	0,865	0,867	0,870	0,867
	60	240	0,765	0,767	0,767	0,766
	70	280	0,695	0,696	0,697	0,696
	80	320	0,647	0,652	0,653	0,651
					$r^2$	<b>0,995</b>



<i>pendiente</i>	-0,005
<i>interceccion</i>	1,0544





**Muestras:**

MUESTRAS		lectura de señal 1	lectura de señal 2	Lectura de señal 3	Promedio de señales	Concentraciones en ppm	mg eq. Trolox/gPF	Eq $\mu$ Mol trolox	$\mu$ Mol eq. Trolox/g PF
<b>M1</b>	MEOH	0,674	0,667	0,663	0,668	77,42	1,55	309,687	6,19
<b>M2</b>	MEOH	0,670	0,671	0,670	0,670	77,02	1,54	308,085	6,16
<b>M3</b>	MEOH	0,680	0,685	0,684	0,683	74,42	1,49	297,667	5,95
<b>M1</b>	ETOH	1,003	0,998	1,001	1,001	10,77	0,22	43,096	0,86
<b>M2</b>	ETOH	1,017	0,974	1,002	0,998	11,37	0,23	45,500	0,91
<b>M3</b>	ETOH	1,017	0,918	1,024	0,986	13,65	0,27	54,582	1,09
<b>M1</b>	MÉTODO PATRÓN	0,725	0,716	0,714	0,718	67,34	5,39	269,351	21,55
<b>M2</b>	MÉTODO PATRÓN	0,687	0,685	0,683	0,685	74,02	5,92	296,064	23,69
<b>M3</b>	MÉTODO PATRÓN	0,692	0,690	0,690	0,691	72,88	5,83	291,523	23,32

**Color:** violeta/morado



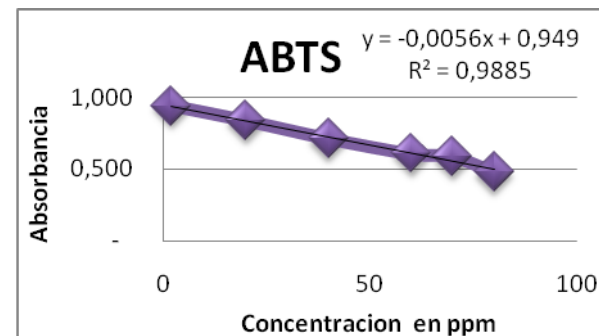
**Notas:** La curva de calibración para el DPPH, ABTS y FRAP en el espectrofotómetro se leyó con metanol.



### Anexo 12. Curva de Calibración del ABTS.

CURVA DE CALIBRACIÓN: 1.104						
ESTÁNDAR	ppm	Concentración $\mu$ Moles Trolox	Lectura de señal 1	Lectura de señal 2	Lectura de señal 3	Promedio de las señales
	2	8	0,938	0,940	0,943	0,940
	20	80	0,835	0,837	0,838	0,837
	40	160	0,691	0,689	0,752	0,711
	60	240	0,607	0,605	0,606	0,606
	70	280	0,585	0,587	0,589	0,587
	80	320	0,477	0,477	0,477	0,477
			$r^2$			<b>0,988</b>

Pendiente	-0,0056
Intereceptor	0,949

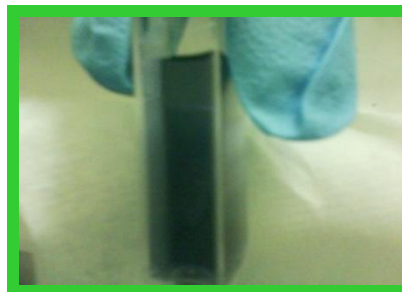




**Muestras:**

MUESTRAS		lectura de señal 1	lectura de señal 2	lectura de señal 3	Promedio de señales	Concentraciones en ppm	mg eq. Trolox/g PF	Eq $\mu$ Mol trolox	$\mu$ Mol eq. Trolox/g PF
M1	MEOH	0,701	0,702	0,705	0,703	43,61	0,87	174,448	3,49
M2	MEOH	0,749	0,752	0,750	0,750	35,17	0,70	140,690	2,81
M3	MEOH	0,679	0,679	0,679	0,679	47,80	0,96	191,209	3,82
M1	ETOH	0,897	0,897	0,898	0,897	9,15	0,18	36,582	0,73
M2	ETOH	0,775	0,758	0,757	0,763	32,87	0,66	131,483	2,63
M3	ETOH	0,638	0,638	0,637	0,638	55,12	1,10	220,482	4,41
M1	MÉTODO PATRÓN	0,602	0,601	0,601	0,601	61,55	4,92	246,214	19,70
M2	MÉTODO PATRÓN	0,657	0,660	0,662	0,660	51,23	4,10	201,901	16,39
M3	MÉTODO PATRÓN	0,636	0,636	0,637	0,636	55,36	4,43	221,426	17,71

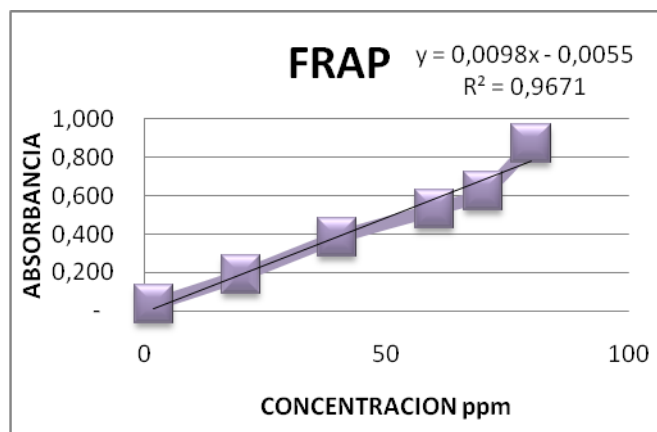
**Color:** verde Azulado





### Anexo 13. Curva de Calibración del FRAP.

LONGITUD DE ONDA: 593nm      lectura de absorbancia: 1,1 ± 0,2						
CURVA DE CALIBRACIÓN: 1,102						
ESTÁNDARES:	ppm	Concentración en $\mu$ Moles Trolox	lectura de señal 1	lectura de señal 2	lectura de señal 3	Promedio de las señales
	2	8	0,038	0,037	0,038	0,038
	20	20	0,188	0,189	0,190	0,189
	40	160	0,362	0,393	0,397	0,384
	60	240	0,581	0,593	0,420	0,531
	70	280	0,629	0,624	0,616	0,623
	80	320	0,891	0,861	0,860	0,871
$r^2$						<b>0,967</b>



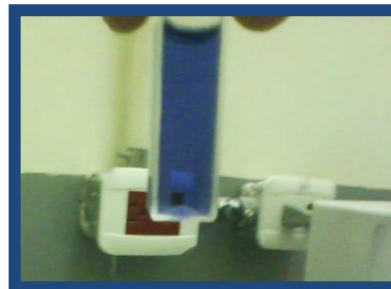
<b>Pendiente</b>	0,009
<b>Interceptor</b>	-0,006



**Muestras:**

MUESTRAS			lectura de señal 1	lectura de señal 2	lectura de señal 3	Promedio de las señales	Concentraciones en ppm	mg eq. Trolox/g PF	Eq $\mu$ Mol trolox	$\mu$ Mol eq. Trolox/g PF
M1		MEOH	0,697	0,698	0,695	0,697	71,564	1,43	286,258	5,73
M2		MEOH	0,626	0,637	0,636	0,633	65,076	1,30	260,304	5,21
M3		MEOH	0,614	0,617	0,615	0,615	63,276	1,27	253,102	5,06
M1		ETOH	0,377	0,366	0,369	0,371	38,341	0,77	153,364	3,07
M2		ETOH	0,333	0,331	0,330	0,331	34,332	0,69	137,330	2,75
M3		ETOH	0,341	0,341	0,342	0,341	35,352	0,71	141,406	2,83
M1		MÉTODO PATRÓN	0,759	0,788	0,788	0,778	79,887	6,39	319,549	25,56
M2		MÉTODO PATRÓN	0,786	0,775	0,776	0,779	79,955	6,40	319,821	25,59
M3		MÉTODO PATRÓN	0,765	0,787	0,786	0,779	79,989	6,40	319,957	25,60

**Color:** morado/azulado

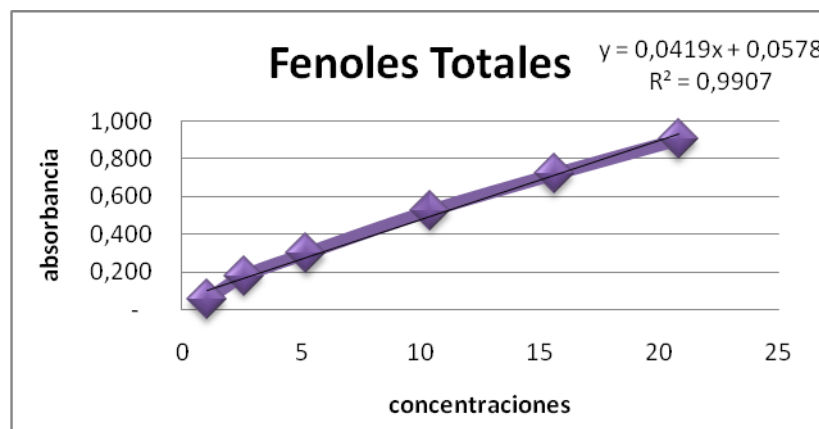


**Nota:** la curva de calibración de Fenoles Totales en el espectrofotómetro se leyó con agua destilada



### Anexo 14. Curva de Calibración de Fenoles Totales

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE					
LONGITUD DE ONDA: 725nm		lectura de absorbancia: $1,1 \pm 0,2$			
CURVA DE CALIBRACIÓN: 1,102					
ESTÁNDARES:	Concentración en ppm	lectura de señal 1	lectura de señal 2	lectura de señal 3	Promedio de señales
	1,04	0,054	0,053	0,050	0,052
	2,6	0,179	0,178	0,179	0,179
	5,2	0,299	0,299	0,301	0,300
	10,4	0,526	0,527	0,525	0,526
	15,6	0,704	0,705	0,750	0,720
	20,8	0,904	0,902	0,901	0,902
				$r^2$	<b>0,991</b>



<b>Pendiente</b>	0,0041
<b>Intereceptor</b>	0,057



**Muestras:**

MUESTRAS		lectura de señal 1	lectura de señal 2	lectura de señal 3	Promedio de señales	Concentraciones en ppm	mg eq. Ac. Gálico/100gMF
M1	MEOH	0,677	0,675	0,674	0,675	14,73	29,47
M2	MEOH	0,645	0,644	0,646	0,645	14,01	28,02
M3	MEOH	0,699	0,699	0,699	0,699	15,30	30,60
M1	ETOH	0,801	0,801	0,804	0,802	17,76	35,51
M2	ETOH	0,899	0,898	0,899	0,899	20,06	40,13
M3	ETOH	0,899	0,899	0,899	0,899	20,07	40,14
M1	MÉTODO PATRÓN	0,739	0,738	0,737	0,738	16,23	129,84
M2	MÉTODO PATRÓN	0,798	0,798	0,791	0,796	17,61	140,84
M3	MÉTODO PATRÓN	0,761	0,762	0,769	0,764	16,85	134,80

**Color:** violeta

