



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Determinación de la calidad fenólica total de la pulpa del café *Coffea arabica*. L

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Navarrete Romero, Yenifer Gabriela

DIRECTOR: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgtr.

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Determinación de la calidad fenólica total de la pulpa del café, *Coffea arabica*. L, realizado por Yenifer Gabriela Navarrete Romero ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre del 2017

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Yenifer Gabriela Navarrete Romero declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Determinación de la calidad fenólica total de la pulpa del café *Coffea arabica*. L**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Mgtr. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 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 investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autor: Yenifer Gabriela Navarrete Romero

Cédula: 1104147572

DEDICATORIA

A mis padres por su inmenso apoyo y amor, en especial a mi padre por creer siempre en mí y estar conmigo incondicionalmente.

A mi amado y adora hijo Mathias por ser la luz de mi vida y al gran amor de mi vida Geovanny.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por brindarme la oportunidad de culminar una meta importante en mi vida y bendecirme todos los días.

Mi gratitud a mis padres porque sin su apoyo, amor y guía a lo largo de mi vida, nada hubiera sido posible.

A Geovanny por acompañarme a lo largo de mi carrera.

De manera especial a mi director de tesis Mgtr. Geovanny Figueroa Hurtado porque supo guiarme de la mejor manera con sus sabios conocimientos, por dedicar su tiempo para ayudarme a culminar exitosamente con la presente investigación, de la misma manera agradezco orientación, paciencia y confianza.

A mi tribunal Mgtr. Maritza Janneth Castillo Carrión y Mgtr. María del Cisne Guamán, por su dedicación y apoyo en este trabajo.

Al Ing. Holger Jaramillo por su motivación y estar presto para ayudarme en lo necesario.

Agradezco a mi familia, compañeros y a todos quienes de una u otra forma ayudaron en la culminación este trabajo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ECUACIONES	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRAC	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Generalidades.....	5
1.2. Producción del café.....	5
1.2.1. Producción mundial	5
1.2.2. Producción en el Ecuador	6
1.3. Aprovechamiento de subproductos del café.	6
1.4. Antioxidantes	6
1.4.1. Antioxidantes presentes en la pulpa de café.	7
1.5. Contenido de Fenoles Totales.....	7
1.6. Cuantificación de la capacidad antioxidante	8
1.6.1. Método FRAP	8
1.6.2. Método DPPH	8
1.6.2.1. IC_{50}	9

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA	10
2.1. Preparación de muestra.	11
2.2. Análisis de humedad.	11
2.3. Extracción de compuestos antioxidantes	12
2.4. Determinación del rendimiento de extracción	13
2.5. Cuantificación de fenoles totales	14
2.6. Cuantificación de actividad antioxidante	16
2.6.1. Método FRAP	16
2.6.2. Método DPPH.	18
2.6.2.1. IC_{50} y AAI.....	20
2.7. Análisis estadístico.....	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. Rendimiento de extracción.....	25
3.2. Cuantificación de fenoles totales	26
3.3. Cuantificación de antioxidantes.....	29
3.3.1. Método FRAP y DPPH	29
3.3.1.1. IC_{50} y AAI	33
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto del café	5
Figura 2. Muestra con Folin-Ciocalteu.....	8
Figura 3. Estándares del ensayo DPPH	9
Figura 4. Deshidratación de la pulpa del café	11
Figura 5. Maceración de la pulpa de café	13
Figura 6. Preparación de estándares para la cuantificación de fenoles	14
Figura 7. Cuantificación de fenoles totales	15
Figura 8. Preparación de solución de trabajo del método FRAP.....	16
Figura 9. Preparación de solución madre y estándares del método FRAP.....	17
Figura 10. Determinación del método FRAP.....	18
Figura 11. Preparación de solución de trabajo para DPPH.....	19
Figura 12. Determinación del método DPPH.....	20
Figura 13. Preparación de solución de trabajo para el método IC ₅₀	21
Figura 14: Preparación de dilución de los extractos para el método IC ₅₀	21
Figura 15: Lectura de absorbancias de los extractos diluidos para el método IC ₅₀	22
Figura 16: Fenoles totales de la pulpa de café.....	27
Figura 17: Fenoles totales de la pulpa de café comparada con subproductos del mango y cacao aplicando la misma técnica de extracción.....	28
Figura 18: Fenoles totales de la pulpa de café comparada con otros subproductos de frutos.....	29
Figura 19: Capacidad antioxidante por el método FRAP y DPPH en la pulpa de café.....	31
Figura 20: Capacidad antioxidante por el método FRAP y DPPH en la pulpa de café y subproductos de algunos frutos.....	32
Figura 21: Capacidad antioxidante medida mediante los métodos FRAP y DPPH, en la pulpa de café comparada con subproductos del mango y cacao aplicados con la misma técnica de extracción.....	33
Figura 22: IC ₅₀ de la pulpa de café comparada con otros frutos y subproductos de frutos.....	34
Figura 23: IC ₅₀ en la pulpa de café comparada con subproductos del mango y cacao usados en la misma matriz.....	35

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Porcentaje de humedad.....	12
Ecuación 2. Concentración de extracción	13
Ecuación 3. Rendimiento de extracción	13
Ecuación 4. Ecuación de la recta	16
Ecuación 5: Concentración de los extractos diluidos.....	22
Ecuación 6: Ajuste de volumen	22

Ecuación 7: Porcentaje de Inhibición del radical DPPH.....	23
Ecuación 8: Ecuación polinómica	23
Ecuación 9: Índice de actividad antioxidante.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento de los extractos.....	12
Tabla 2. Rendimiento de extracción para los diferentes tratamientos.....	25
Tabla 3. Contenido de fenoles totales en la pulpa de café en los diferentes tratamientos.....	26
Tabla 4. Capacidad de antioxidantes en la pulpa de café deshidratada mediante método.	30
Tabla 5. IC ₅₀ y AAI de la pulpa del café.....	33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Determinación de humedad de la pulpa de café deshidratada.	45
ANEXO B: Rendimiento de extracción.	46
ANEXO C: Cuantificación de contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu.	48
ANEXO D: Cuantificación de capacidad antioxidante por medio del método FRAP.	54
ANEXO E: Capacidad antioxidante mediante el método DPPH.....	61
ANEXO F: Determinación del método IC ₅₀ y AAI.....	66
ANEXO G: Análisis estadístico	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AAI: Índice de actividad antioxidante

Abs: Absorbancia

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

b.s: Base seca

C.A: Capacidad antioxidante

DPPH: 2,2-difenil-1-picrihidracil

E.T: Equivalente de Trolox

EAG: Equivalente de ácido gálico

EOH: Etanol

F.T: Fenoles totales

FD: Factor de dilución

FRAP: Poder de reducción férrica

g: Gramo

H₂O: Agua

HCl: Ácido clorhídrico

I %: Porcentaje de Inhibición del radical DPPH

IC₅₀: Capacidad media inhibitoria

Kg: Kilogramo

L: Litro

M: Molar

MeOH: Metanol

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mM: Milimolar

N: Normalidad

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

nm: Nanómetro

P. alícuota: Peso alícuota

P. final: Peso final

P. inicial: Peso inicial

R²: Coeficiente de determinación

rpm: Revoluciones por minuto

SM: Solución madre

ST: Solución de trabajo

TPTZ: Complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina

v/v: Volumen/volumen

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µmol: Micromoles

%: Porcentaje

RESUMEN

En la industria alimentaria crece el interés por el uso de antioxidantes en alimentos; el café es el segundo producto más comercializado a nivel mundial. Sin embargo, la industria cafetera únicamente aprovecha el 18.5 % del fruto, desechando la pulpa que representa el 44 %, por lo cual surge la necesidad de encontrar usos de esta materia prima que contiene una riqueza de compuestos fenólicos y antioxidantes. En este estudio se evaluó la mejor técnica de extracción de antioxidantes. Las variables independientes fueron concentración de solventes y temperatura de extracción. El contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante fueron las variables respuesta, medidos mediante el método Folin Ciocalteu para fenoles totales, FRAP y DPPH para capacidad antioxidante. Las condiciones óptimas de extracción fueron mezcla de solvente EtOH-H₂O (50-50, v/v) a una temperatura de 60 °C con valores de 3113 mg EAG/100g para fenoles totales, 190 y 220 μmol E.T/g para FRAP y DPPH respectivamente, en cuanto IC₅₀ se obtuvo 34 μg/mL demostrando que la pulpa de café contiene un potencial antioxidante moderado considerándose fuente alternativa de antioxidantes.

Palabras claves: antioxidantes, fenoles totales, DPPH y FRAP.

ABSTRAC

In the food industry, there has been a growing interest in the use of antioxidants. In this respect, coffee is the second most traded product in the world. However, the coffee industry uses only 18.5 % of the fruit. The pulp, which is about 44 % of the whole fruit by weight, is discarded in this process. For this reason, there is a need for finding uses for this raw material, which contains a variety of phenolic compounds and antioxidants. The present study evaluated the best technique for extracting antioxidants. The independent variables were solvent concentration and temperature of extraction. Total, phenolic content and antioxidant capacity were the response variables, which were measured by using the Folin Ciocalteu method for total phenols, and FRAP and DPPH for the antioxidant capacity. The optimal conditions of extraction were a mixture of solvent EtOH-H₂O (50-50, v/v) at a temperature of 60 °C, with values of EAG 3113 mg/100g for total phenols, and 190 and 220 µmol E.T/g for FRAP and DPPH respectively. As for IC₅₀, we obtained 34 µg/mL, which demonstrates that the coffee pulp has a moderate antioxidant potential; thus, it is considered as an alternative source of antioxidants.

Keywords: Antioxidants, total phenols, DPPH and FRAP.

INTRODUCCIÓN

En la industrialización del café solamente se aprovecha el 18.5 % del peso total del fruto de café (Aristizabal & Duque, 2006). Esto puede ocasionar contaminación ambiental, sobre todo en las aguas de las zonas cafeteras. Por ello, se hace evidente la necesidad de buscar alternativas para el aprovechamiento de los subproductos del café, en especial de la pulpa considerando que representa el 44 % del peso total del fruto (Chaves, 2006; García Bure, 2014)

Se han planteado varios usos que se le puede dar a la pulpa de café, como producción de biogás, bioetanol, obtención de abono orgánico, producción de hongos comestibles, obtención de alcohol, vinos, alimentación animal y abono (Rathinavelu & Graziosi, 1967). Sin embargo, el uso de antioxidantes en la industria alimentaria y farmacéutica ha cobrado gran interés, por su beneficio para la salud humana.

El café es uno de los alimentos más estudiados, por su presencia de compuestos fenólicos y antioxidantes (Niseteo, Komes, Belščak-Cvitanović, Horžić, & Budeč, 2012). La pulpa de café es buena fuente de antioxidantes naturales; y sustancias fenólicas (López et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de temperatura de extracción y concentración de solventes, que permitan maximizar la extracción de compuestos antioxidantes. Se encontró que las condiciones óptimas fueron, mezcla de solventes EtOH-H₂O (50-50, v/v) y temperatura de 60 °C, obteniendo un contenido fenólico de 3113 mg EAG/100 g de b.s y capacidad antioxidante de 190 y 220 µmol E.T/ g b.s para FRAP y DPPH, respectivamente.

En el primer capítulo del presente trabajo se encuentra la revisión bibliográfica acerca del café y los subproductos, compuestos fenólicos, actividad antioxidante y el fundamento de los métodos para la cuantificación de la actividad antioxidante. En el segundo capítulo se hace referencia a la metodología empleada para la obtención de extractos, cuantificación de fenoles, determinación de la actividad antioxidante. En el tercer capítulo se presenta los resultados alcanzados y su discusión. Finalmente se incluye las conclusiones del estudio y recomendaciones para posteriores estudios.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades

El café (*Coffea arabica*. L) es un arbusto perennifolio de la familia Rubiáceas, puede crecer hasta 4.5 m de altura, es muy atractivo a la vista; tiene flores blancas, fragantes y pequeñas que se ubican a lo largo de las ramas; su fruto es rojo oscuro el cual contiene dos granos (Herrejon Herrejon, López Rojas, Reséndiz López, Rojas, & Érica, 2010). El café, fue descubierto en Etiopía, aproximadamente 850 A.C, y fue cultivado en Arabia, donde le daban varios usos tales como alimento, vino, medicina y bebida por ser aromático (Wagner, 2001).



Figura 1. Fruto del café
Fuente y elaboración:
Desarrollo-GIZ (2013)

El café es uno de los alimentos más estudiados, por la presencia de sus antioxidantes (Niseteo et al., 2012); algunos autores demuestran que reduce la diabetes tipo 2, cirrosis hepática, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, también posee actividad anticariógena in vitro; todo esto es gracias a la presencia de sus antioxidantes (Fonseca-García, Calderón-Jaimes, & Rivera, 2014; Gotteland & de Pablo, 2007; Riobó & Franco, 2013).

1.2. Producción del café

1.2.1. Producción mundial

El café es uno de los productos, más comercializado y exportado a nivel mundial, en el año 2015 la producción mundial del café se incrementó un 4.4 %, produciendo 152.7 millones de sacos de 60 Kg (Fira, 2015).

El café se produce en América Latina, África y Asia; siendo Brasil, Colombia, Perú y Ecuador, los países que se destacan en su producción. Por otra parte, Estados Unidos, Canadá, Alemania, Francia, Italia y Japón; son los principales importadores (Fira, 2015).

1.2.2. Producción en el Ecuador

El Ecuador es uno de los mayores productores y exportadores de café en América latina, lo que denota gran importancia para el país, en la parte económica, ambiental y social por la generación de empleo (Proecuador, 2013).

El café arábico de mejor calidad proviene de la provincia de Loja y Zamora. Se estima que la producción de café en el Ecuador es de 1.5 millones sacos de 60 Kg anuales, entre café arábico y de robusta (Lopez Dominguez & Zurita Herrera, 2009).

1.3. Aprovechamiento de subproductos del café.

En la industrialización del café sólo se utiliza el 18.5 % del fruto, dejando de lado los subproductos, los cuales al no ser utilizados pueden generar problemas ambientales. Los subproductos presentes en el fruto del café son la pulpa, pergamino y mucilago (Aristizabal & Duque, 2006).

El mucílago de café, representa el 14.5 % del café, a partir de este se pueden obtener pectinas sin Fuenteinar, azúcares naturales (glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa) y proantocianinas incoloras, las cuales pueden utilizarse como recurso básico para la fabricación de otros alimentos o síntesis de sustancias químicas (Rathinavelu & Graziosi, 1967). El pergamino, conforma el 4.5 o 5 % del peso del fruto del café, usualmente es utilizado en combustible de ladrilleras, fogones en algunos hogares, gracias a su poder calorífico (Rodríguez Valencia, 1999).

La pulpa o exocarpio es el principal subproducto del café, representando el 44 % del fruto. Contiene varios compuestos químicos como: polifenoles, azúcares, proteína y minerales (Rodríguez & Zambrano, 2013).

La pulpa es usada como combustible directo gracias a su poder calorífico de 15.88 MJ/Kg (Rodríguez & Zambrano, 2013); en este sentido se puede utilizar en sistemas de combustión a gas o para la producción de energía eléctrica, por medio de turbinas generadoras de gas. Además, puede ser utilizada para la producción de bioetanol (Rodríguez & Zambrano, 2013).

1.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son un grupo de sustancias que se encuentran en forma natural en alimentos de origen vegetal, tienen gran importancia en la medicina e industria alimentaria.

Se utilizan como aditivos, para evitar la oxidación y deterioro de los alimentos. En nuestra dieta poseen un papel importante, siendo su función principal disminuir la cantidad de radicales libres presentes en nuestro organismo (Elejalde Guerra, 2001), y que están relacionados con enfermedades por daño oxidativo y procesos de envejecimiento (Gutiérrez Zavala, Ledesma Rivero, García García, & Grajales Castillejos, 2007). Algunos autores han investigado que los alimentos ricos en antioxidantes ayudan a la prevención de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cancerígenas (Álvarez et al., 2009; Bello, 2006).

1.4.1. Antioxidantes presentes en la pulpa de café.

La pulpa de café es una buena fuente de antioxidantes naturales y sustancias fenólicas (López et al., 2013). Los principales antioxidantes presentes son: ácidos clorogénicos, ácido 5-cafeoilquínico, epicatequina, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, catequina, ácido protocatequínico, rutina, ácido ferúlico, ácido 5-feruloilquínico, cianidina-3-rutinósido, ácido gálico, p-hidrobenzoico, p-coumárico y ácido vanílico (Baggio, Lima, Mancini Filho, & Fett, 2007; Larraín, Schaefer, Richards, & Reed, 2008; Rathinavelu & Graziosi, 1967).

1.5. Contenido de Fenoles Totales

El método colorimétrico Folin y Ciocalteu es usado para la determinación de los grupos fenólicos (Mesa-Vanegas et al., 2010), basado en reacción colorimétrica oxido-reducción de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu el cual es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato de color amarillo y al ser reducido por los fenoles da lugar a cromógenos de color azul intenso. Este cambio de color es susceptible a ser determinado espectrofotométricamente a 765 nm (García Martínez, Fernández Segovia, & Fuentes López, 2015; Slinkard & Singleton, 1977).



Figura 2. Muestra con Folin-Ciocalteu

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

1.6. Cuantificación de la capacidad antioxidante

1.6.1. Método FRAP

El ensayo FRAP se basa en la capacidad que tienen los compuestos fenólicos en reducir el hierro férrico (incoloro) a ferroso (azulado), presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). La aparición del color indicará la capacidad reductora de la muestra, la cual es proporcional a la concentración de antioxidantes de la muestra (Agudo, 2014; Benzie & Strain, 1996). El cambio de color se evalúa espectrofotométricamente mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda entre 590 a 595 nm (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006).

1.6.2. Método DPPH

El ensayo DPPH, fue desarrollado por Brand-Williams, Cuvelier, y Berset (1995), el cual es usado para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de la muestra, por medio de la determinación del grado de decoloración de la solución de DPPH que tiene un electrón desapareado (Mesa-Vanegas et al., 2010). Lo que produce un cambio de coloración de azul violeta a amarillo pálido, siendo susceptible espectrofotométricamente a 517 nm (Thaipong et al., 2006).

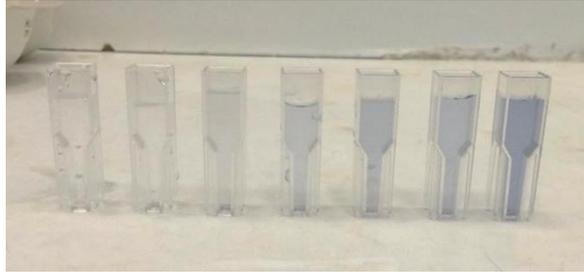


Figura 3. Estándares del ensayo DPPH

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

1.6.2.1. IC_{50}

El IC_{50} se define como la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50 % la cantidad de DPPH inicial; con la finalidad de obtener un parámetro de Fuenteerencia en cuanto a la capacidad antioxidante; este método es usado para expresar los resultados del método DPPH (Scherer & Godoy, 2009). Cuando el valor de IC_{50} es más bajo, mayor será la capacidad antioxidante. El valor de IC_{50} se calcula gráficamente usando una curva polinomial, trazando la concentración del extracto frente al efecto del barrido (Scherer & Godoy, 2009).

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Preparación de muestra.

Se trabajó con muestras procedentes del sector los Chivos en Vilcabamba de la provincia de Loja, proporcionadas por la Sra. Alba Jumbo. Posterior a su recolección, fueron transportadas al laboratorio de alimentos de la UTPL. Se lavó el fruto de café con agua, y se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10 % (Garmendia & Vero, 2006). Seguidamente se despulpó manualmente, para su posterior secado en la estufa de convección forzada a 60 ± 1 °C por 48 horas. Para acelerar la eliminación del agua, cada 4 horas se dio vuelta a la pulpa.



Figura 4. Deshidratación de la pulpa del café

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Una vez deshidratada la muestra se trituró en dos etapas, primero una reducción de tamaño utilizando un molino manual de marca Corona, seguido de una trituración empleando el molino ultra centrífugo marca Retsch ZM 200. Se tamizó la muestra con la finalidad de obtener un tamaño de partícula final ≤ 355 μm que permita facilitar la extracción (Figueroa Hurtado, Armijos Piedra, & Pérez Cuenca, 2012).

2.2. Análisis de humedad.

Se realizó la determinación del contenido de agua según la norma AOAC 934.06 de humedad en frutas deshidratadas. Brevemente, se colocó tres capsulas vacías en la estufa al vacío a 70 ± 1 °C durante 6 horas. Trascorrido el tiempo, se procedió a enfriar en el desecador durante una hora y se registró su peso (*P cápsula*). A continuación, se pesó aproximadamente 5 g de muestra (*P inicial*) y se deshidrató la muestra en la estufa al vacío a 70 ± 1 °C durante 6 horas, se enfrió en el desecador por una hora y se tomó su peso. Se repitió el mismo procedimiento hasta que la variación entre dos pesadas consecutivas sea menor a 0.005 g, el ultimo peso es *P final*. Los cálculos se realizaron mediante la ecuación 1 (Anexo A).

$$\% \text{ de humedad} = \left(1 - \frac{P \text{ final} - P \text{ cápsula}}{P \text{ muestra}}\right) * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de humedad

2.3. Extracción de compuestos antioxidantes

Los diferentes tratamientos de extracción se realizaron de acuerdo al diseño experimental estadístico presentado en la Tabla 1. Se utilizó EtOH y H₂O, por ser solventes compatibles con la industria alimentaria (Cerón & Uribe, 2011).

Tabla 1. Tratamiento de los extractos

Solvente	Relación (v/v)	Temperatura (°C)
EtOH	100	20
EtOH-H₂O	50-50	20
H₂O	100	20
EtOH	100	40
EtOH-H₂O	50-50	40
H₂O	100	40
EtOH	100	60
EtOH- H₂O	50-50	60
H₂O	100	60

Fuente: El autor

Elaboración: El autor.

Se utilizó una relación 1-20 (m/v) (Sogi, Siddiq, Greiby, & Dolan, 2013). Para ello se pesó un 1 g del subproducto en un frasco boheco de 250 mL, se adicionó 20 mL de solvente según tabla 1 y se agregó un magneto de 2.5 cm. La mezcla se sometió a maceración dinámica a 2500 rpm durante 1 hora y 30 minutos, a una determinada temperatura como lo indica en la tabla 1.



Figura 5. Maceración de la pulpa de café

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Pasado el tiempo de maceración, se sometió a centrifugación a 2790 rpm por 30 minutos, en una centrifuga de marca CLAY ADAMS® Brand DYNAC® (Becton, Dickinson and Company, MD, USA); se quedó con el sobrenadante, y el sólido se desechó. El extracto se lo almacenó en Fuentrigeración, protegido de la luz con papel aluminio.

2.4. Determinación del rendimiento de extracción

Los viales vacíos previamente secados en una estufa a 60°C por 4 horas, se registró su peso, el cual corresponde al *P vacío*. Se adicionó 2 mL de extracto y registró su peso (*P. Alícuota*); la determinación de la concentración de los extractos se realizó mediante evaporación del solvente, al calentar paulatinamente en una plancha los viales con el extracto, hasta conseguir un peso constante, el último peso es el *P final*. La concentración de extracción se calculó con la ecuación 2 (Anexo B).

$$\text{Concentración} = \left(\frac{P \text{ final} - P \text{ vacío}}{P \text{ alícuota}} \right)$$

Ecuación 2. Concentración de extracción

para calcular el rendimiento de los extractos se aplicó la Ecuación 3:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left[\left(\frac{P \text{ final} - P \text{ vacío}}{P \text{ alícuota}} \right) * F.D \right] * 100$$

Ecuación 3. Rendimiento de extracción

2.5. Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se aplicó el método colorimétrico de Folin Ciocalteu, según lo descrito por Swain y Hillis (1959) con modificaciones realizadas por Thaipong et al. (2006).

- a) **Preparación de estándares de ácido gálico.-** Se prepararon siete estándares de ácido gálico a diferente concentración, de acuerdo a lo que menciona Thaipong et al. (2006), en el rango de 0 a 1 mg/mL. En la figura 6 se presenta la secuencia de preparación y en el anexo C ítem 2 se presenta el cálculo para la solución madre y estándares (Anexo C, ítem 2).

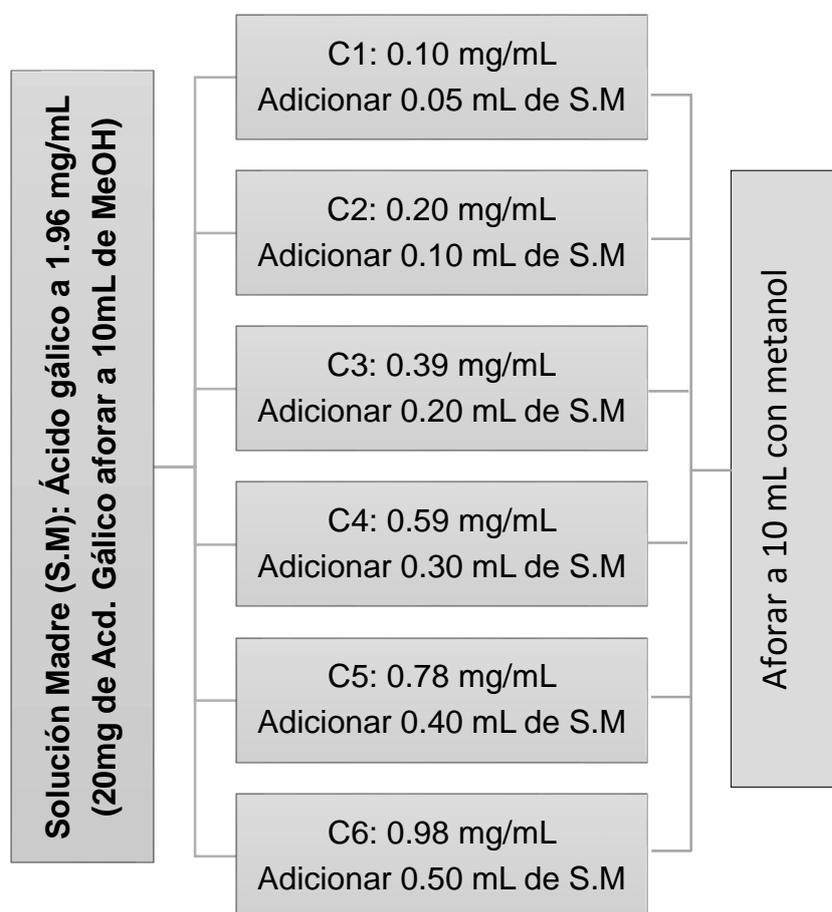


Figura 6. Preparación de estándares para la cuantificación de fenoles

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

- b) **Lectura de absorbancias.** - A los estándares y los extractos se les midió la absorbancia siguiendo el procedimiento descrito en la figura 7.

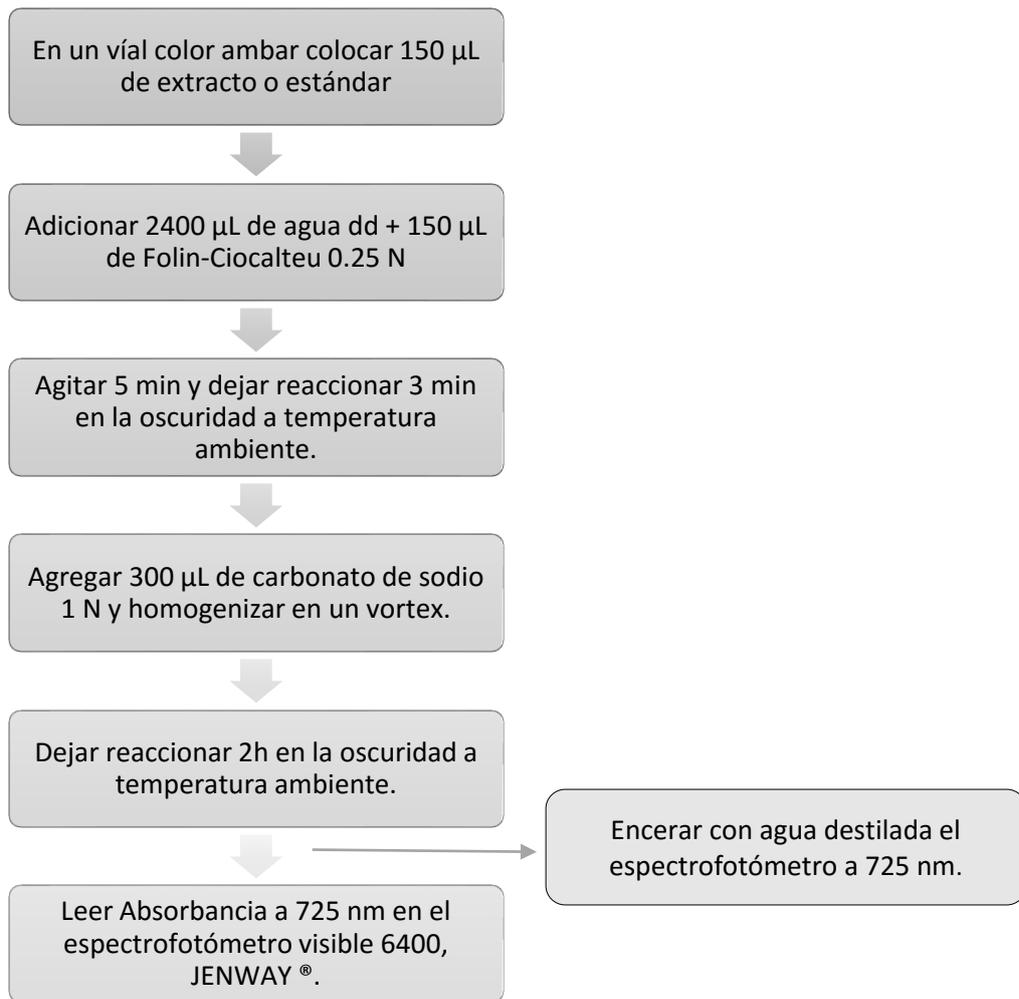


Figura 7. Cuantificación de fenoles totales

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Con las absorbancias obtenidas de los estándares preparados, se construye la curva de calibración, en el eje de la x va la concentración en mg equivalentes de ácido gálico y en el eje de la y las absorbancias obtenidas de los estándares. El coeficiente de correlación tiene que ser igual o superior a 0.99, para indicar una adecuada linealidad (Guerreo et al., 2013).

Las absorbancias obtenidas de los extractos deben encontrarse dentro de la curva de calibración; si el valor es mayor al de la curva de calibración, la muestra debe diluirse y si es menor al valor de la curva de calibración, la muestra necesita concentrarse. El contenido de fenoles totales se expresa en miligramos equivalentes de ácido gálico (Guerreo et al.) por cada 100 gramos de muestra en base seca de cada extracto, la misma fue calculada mediante retroceso por medio de la ecuación de la recta (Ecuación 4), la cual proviene de la curva de calibración:

$$y = m \cdot x + b$$

Ecuación 4. Ecuación de la recta

Dónde:

y = absorbancia

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

La concentración resultante se multiplicó por el factor de dilución usado, el cálculo se presenta en el anexo C ítem 4.

2.6. Cuantificación de actividad antioxidante

2.6.1. Método FRAP

Para la determinación de antioxidantes presentes en los extractos, se usó el método descrito por Benzie y Strain (1996) con modificaciones de Thaipong et al. (2006).

- a) **Preparación de solución de trabajo para FRAP.-** para ello se preparó tres soluciones: buffer de acetato, solución TPTZ 10 mmol, y solución de cloruro férrico 20 mmol de acuerdo como se muestra en la figura 8 (Anexo D, ítem 1)

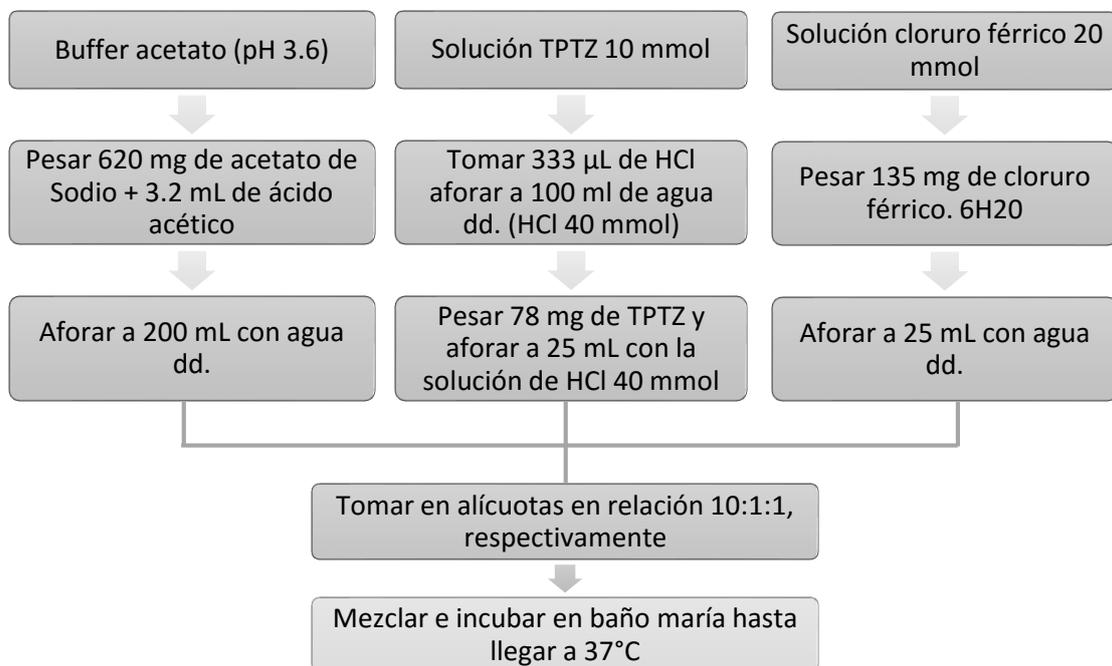


Figura 8. Preparación de solución de trabajo del método FRAP

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

b) **Preparación de solución madre y estándares de Trolox.** - Como solución patrón se utilizó el compuesto trolox a una concentración de 1029.73 $\mu\text{mol/L}$, del mismo se prepararon nueve estándares a diferente concentración, desde 20.594 μmol hasta 823.79 $\mu\text{mol/L}$; estos valores fueron tomados de la metodología empleada por Thaipong et al. (2006). El proceso se detalla en la figura 9 y los cálculos en el anexo D, ítem 2.

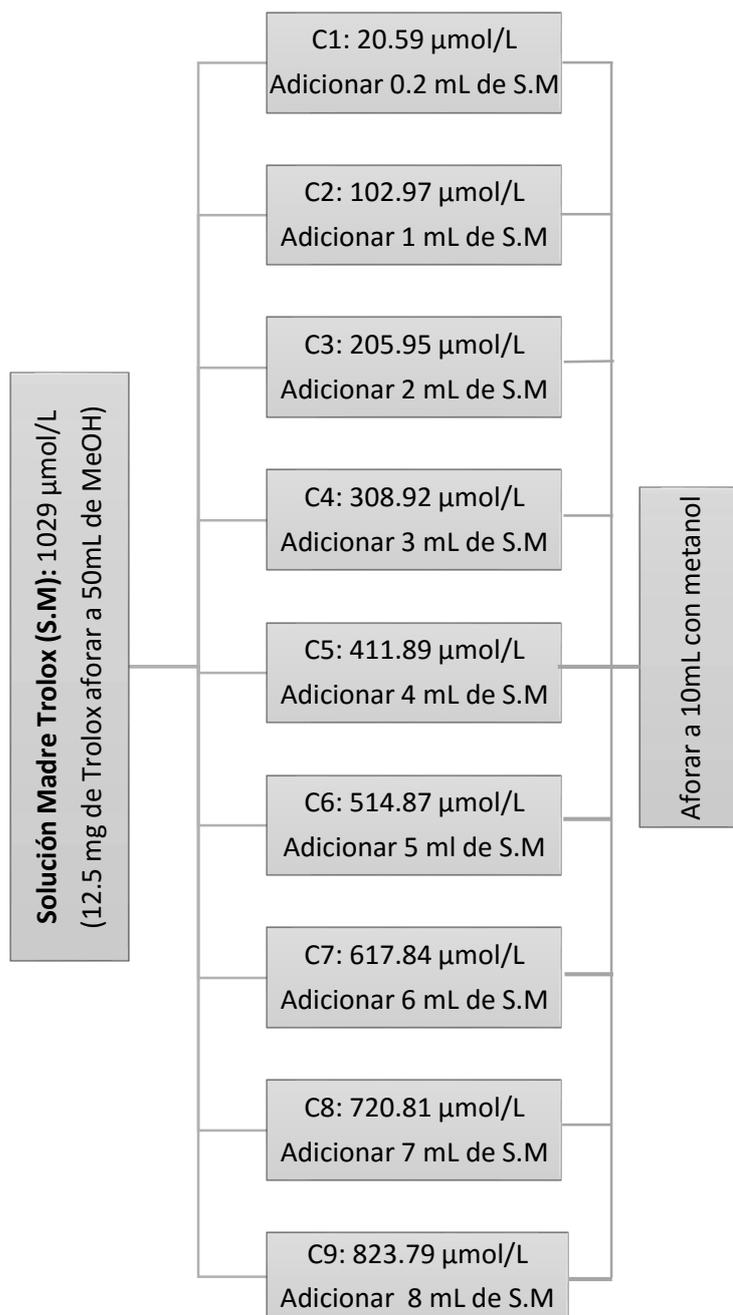


Figura 9. Preparación de solución madre y estándares del método FRAP.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

- c) **Lectura de absorbancias.-** Para los estándares y las muestras se siguió el mismo procedimiento el cual se detalla en la figura 10.

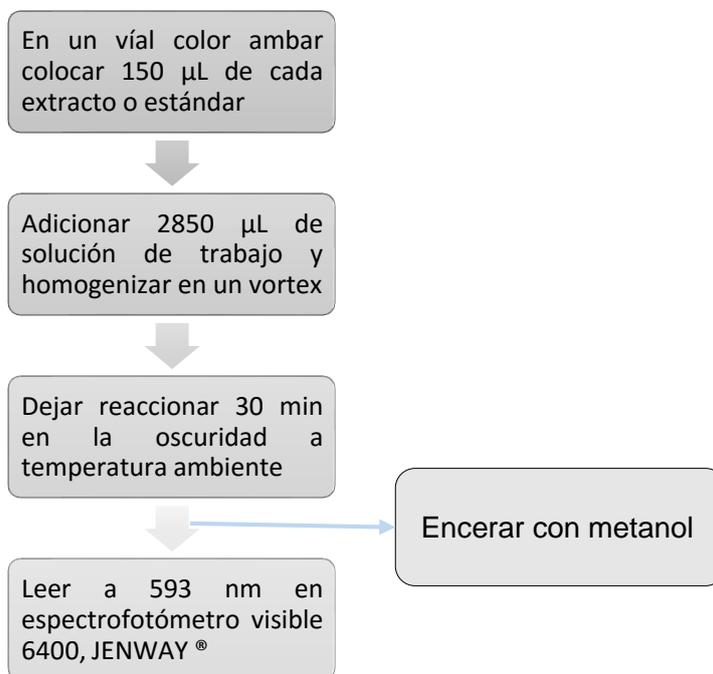


Figura 10. Determinación del método FRAP.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Con las absorbancias obtenidas de los estándares se realizó la curva de calibración. La capacidad de antioxidantes de los extractos está expresada en micro moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca, la cual fue calculada mediante retroceso por medio de la ecuación 4, la cual corresponde a la ecuación de la recta. El resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución del extracto (Anexo D, ítem 4).

2.6.2. Método DPPH.

Para medir la capacidad de captar el radical libre del DPPH en los extractos, se usó la metodología descrita por Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones de Thaipong et al. (2006).

- a) **Preparación de solución de trabajo de DPPH.-** Los pasos se describen en la figura 11.

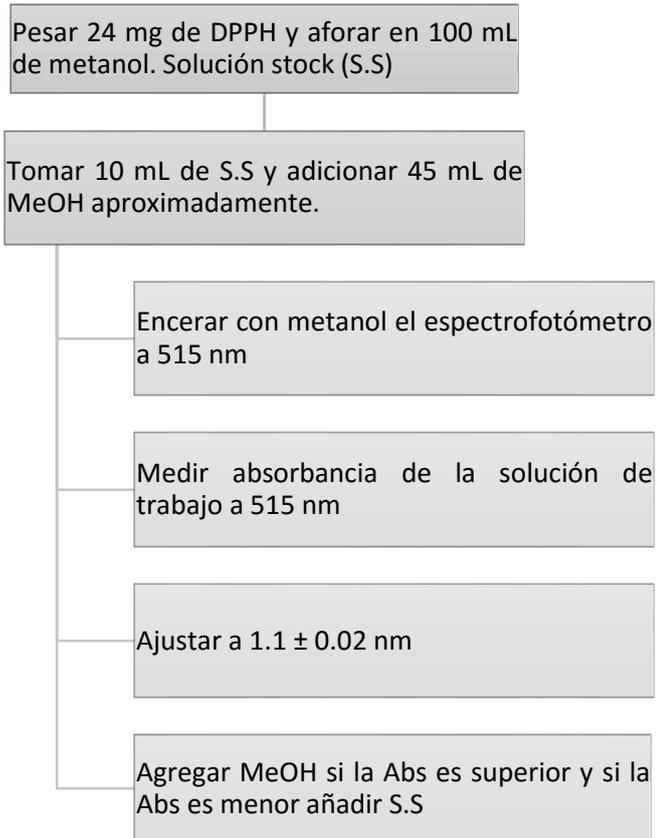


Figura 11. Preparación de solución de trabajo para DPPH.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

- b) **Preparación de solución madre y estándares de Trolox.-** Como solución patrón se utilizó Trolox, como se detalla en la figura 9 y los cálculos correspondientes se presentan en el anexo E, ítem 1.
- c) **Lectura de absorbancias.-** Para los estándares y las muestras se siguió el procedimiento descrito en la figura 12.

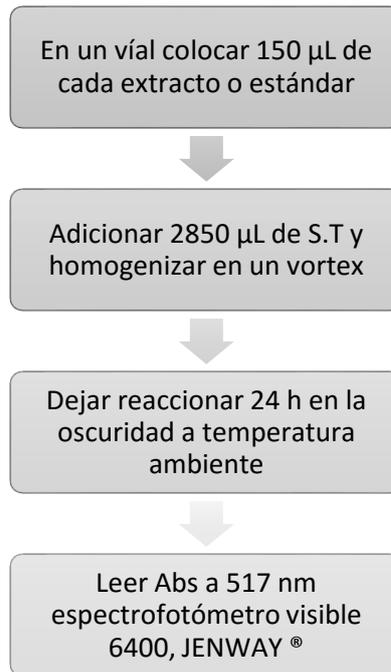


Figura 12. Determinación del método DPPH.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Con las absorbancias obtenidas de los estándares se realizó la curva de calibración. La capacidad de antioxidantes de los extractos está expresada en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca, la cual fue calculada mediante retroceso por medio de la ecuación 4. El resultado obtenido se multiplicó por el factor de dilución usado, los cálculos se observan en el anexo E, ítem 4.

2.6.2.1. IC_{50} y AAI

Al extracto con mayor actividad antioxidante se le calculó el porcentaje de inhibición del 50 % del DPPH, mediante la metodología descrita por Scherer y Godoy (2009).

- a) **Preparación de solución de trabajo de DPPH.-** se preparó DPPH disuelto en EtOH a una concentración de 0.0006 mol/L, de la misma se tomó una alícuota en relación 1-10. Los pasos se detallan en la figura 13.

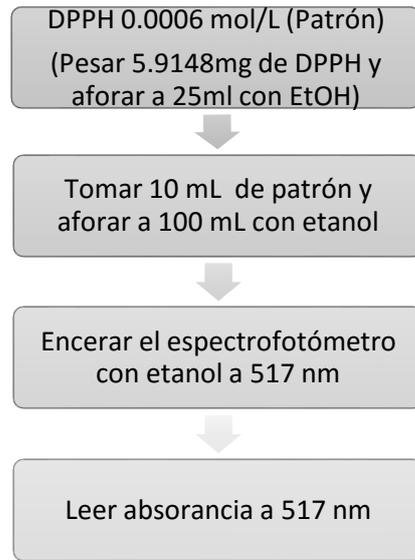


Figura 13. Preparación de solución de trabajo para el método IC₅₀.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Las absorbancias se tomaron al inicio y final de la metodología, para verificar que la solución de trabajo no cambie.

b) **Preparación de muestras.** - Se realizó siete diluciones de los extractos. Los pasos se detallan en la figura 14.

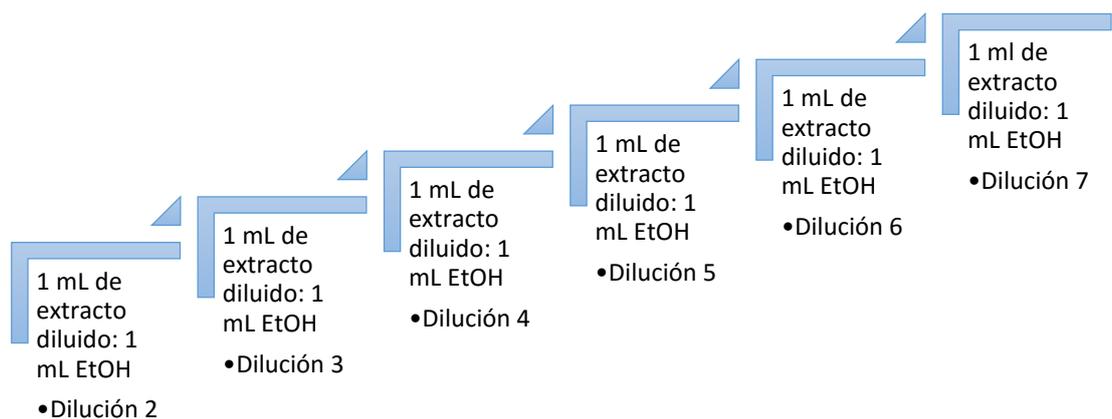


Figura 14: Preparación de dilución de los extractos para el método IC₅₀.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Para la lectura de las absorbancias de las muestras, se colocó 3.51 mL de solución de trabajo de DPPH y se añadió 0.09 mL de cada dilución de los extractos como se detalla en la figura 15.

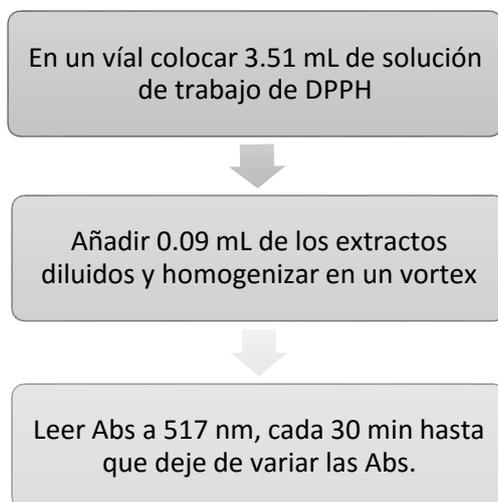


Figura 15: Lectura de absorbancias de los extractos diluidos para el método IC₅₀.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Seguidamente se calculó las concentraciones de los extractos diluidos mediante la ecuación 5 (anexo F, ítem 2).

$$\text{Concentración inicial} = \frac{\text{Concentración del extracto} * \text{alícuota del extracto}}{\text{Volumen total de la dilución}}$$

Ecuación 5: Concentración de los extractos diluidos.

A la concentración de los extractos diluidos se aplicó la corrección de volumen, con la ecuación 6 (anexo F, ítem 2).

$$\text{Ajuste de Volumen} = \text{Concentración} * \frac{0.09 \text{ mL (alícuota de muestra)}}{3.6 \text{ mL (Volumen de reacción)}}$$

Ecuación 6: Ajuste de volumen

- c) **Porcentaje de inhibición del radical DPPH (% I).**- Se determinó con la absorbancia de la solución de trabajo en tiempo cero y la absorbancia de la muestra al final de la reacción, para ello se aplicó la ecuación 7 y los cálculos se observa en el anexo F, ítem 3)

$$\% I = \frac{Abs\ 0 - Abs\ 1}{Abs\ 0} * 100$$

Ecuación 7: Porcentaje de Inhibición del radical DPPH

Donde:

Abs 0: Absorbancia de la solución de trabajo en tiempo cero.

Abs 1: Absorbancia de la muestra al final de la reacción

- d) **Valor de IC₅₀.**- Se lo realizó gráficamente, construyendo una curva polinómica, con las concentraciones iniciales de los extractos en el eje de X, y % I en el eje de la Y; de la cual se obtuvo una ecuación polinómica (ecuación 8), los cálculos correspondientes se encuentran en el anexo F, ítem 4.

$$y = ax^2 + bx + c$$

Ecuación 8: Ecuación polinómica

Se igualó la ecuación y se despejó x para saber la concentración del extracto necesaria para disminuir el 50 % de la concentración de DPPH.

El índice de actividad antioxidante (Scherer & Godoy, 2009), se lo calculo con la siguiente ecuación 9 (Anexo F, ítem 5)

$$AAI = \frac{\text{Concentración DPPH en tiempo cero } (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} (\mu\text{g/mL})}$$

Ecuación 9: Índice de actividad antioxidante

2.7. Análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento se realizó un análisis de varianza (Obaco, Pineda llanos, & Figueroa Hurtado) y para evaluar las diferencias significativas se usó Turkey por medio del programa Minitab 16. Se evaluó el efecto de las diferentes variables mediante un análisis factorial, con un nivel de significancia $p < 0.05$ (Anexo G).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Rendimiento de extracción

Se obtuvo mayor rendimiento de extracción en las muestras tratadas a una temperatura de 60 y 40 °C, esto es gracias a que el incremento de temperatura facilita la eficacia de extracción de compuestos, principalmente debido a que las paredes celulares sean más permeables, aumentando la solubilidad, incremento del coeficiente de difusión y disminución de la viscosidad del disolvente permitiendo el acceso al sustrato sólido (Gómez Romero, 2010; Rodríguez Carmona, 2016). Además, el calentamiento ablanda los tejidos vegetales, debilitando la pared celular y en consecuencia liberando los compuestos (Spigno & De Faveri, 2007). En la tabla 2 se puede observar el rendimiento de extracción.

Tabla 2. Rendimiento de extracción para los diferentes tratamientos.

Solvente	Relación (v/v)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)
EtOH	100	20	4
		40	3
		60	11
EtOH-H₂O	50-50	20	26
		40	30
		60	31
H₂O	100	20	24
		40	27
		60	29

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Los tratamientos con mezclas EtOH-H₂O presentaron mayor rendimiento frente aquellos que se utilizaron el solvente puro (EtOH 100% y H₂O 100%) como se presenta en la tabla 2. Esto confirma lo indicado por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2007), quienes encontraron mayor rendimiento de extracción al utilizar mezclas de disolventes con diferente polaridad. El EtOH al ser poco polar favorece la extracción de compuestos fenólicos menos polares como son flavonoles y polifenoles, en cambio el H₂O permite extraer los compuestos más polares tales como antocianinas, saponinas y taninos (Azmir et al., 2013). Este hecho también fue encontrado por Chew et al. (2011), donde obtuvieron mejor resultados de extracción al usar EtOH-H₂O (40-60, v/v) frente a EtOH 100%, Rosso y Toro (2011) también obtuvo mayor

rendimiento al usar EtOH-H₂O (50-50, v/v), y encontró menor concentración al usar H₂O y EtOH al 100%.

3.2. Cuantificación de fenoles totales

En la tabla 3 se presenta la concentración de fenoles totales, determinados por el método Folin – Ciocalteu, donde se observa que los tratamientos con mayor contenido fenólico fueron aquellos que se utilizaron EtOH-H₂O (50-50, v/v) como solvente de extracción, sin encontrar efecto significativo al usar diferentes temperaturas de extracción, con valores de 2841, 3113 y 3084 mg EAG/100g de b.s para las temperaturas de 20, 40 y 60 °C, respectivamente. En cambio, los extractos obtenidos con EtOH y H₂O al 100% presentaron menor contenido fenólico. Este comportamiento también fue encontrado por Rosso y Toro (2011); Zhao y Hall (2008), esto es debido a que existen compuestos fenólicos con diferente polaridad que pueden ser extraídos de mejor manera al combinar solventes de diferente polaridad.

Tabla 3. Contenido de fenoles totales en la pulpa de café en los diferentes tratamientos.

Solvente	Relación (v/v)	Temperatura (°C)	Fenoles totales mg EAG/100 g b.s
EtOH	100	20	254 ± 2 ^d
		40	402 ± 20 ^d
		60	1024 ± 39 ^c
EtOH-H ₂ O	50-50	20	2841 ± 353 ^a
		40	3113 ± 239 ^a
		60	3084 ± 92 ^a
H ₂ O	100	20	933 ± 33 ^c
		40	1323 ± 27 ^c
		60	2059 ± 186 ^b

Las letras iguales en los valores de la misma columna significan que no hay diferencia significativa entre ellos (p>0.05).

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

En la figura 16 se presenta una comparación de los resultados alcanzados frente a estudios previos en pulpa de café. Días y Meneses (2011) encontraron un resultado menor de 1125 mg EAG/100 g b.s, quienes utilizaron mezcla de solventes hidroalcoholicas (70-30, v/v), pero a temperatura ambiente. Cortés Meza (2017) también obtuvo valores inferiores con un resultado de 1054 mg EAG/100 g b.s de pulpa de café, en esta investigación utilizó H₂O 100%

a 60-65°C, este resultado se puede explicar debido a que al usar solamente H₂O, se puede dejar de lado los compuestos con menor polaridad (Azmir et al., 2013; Gómez Romero, 2010).

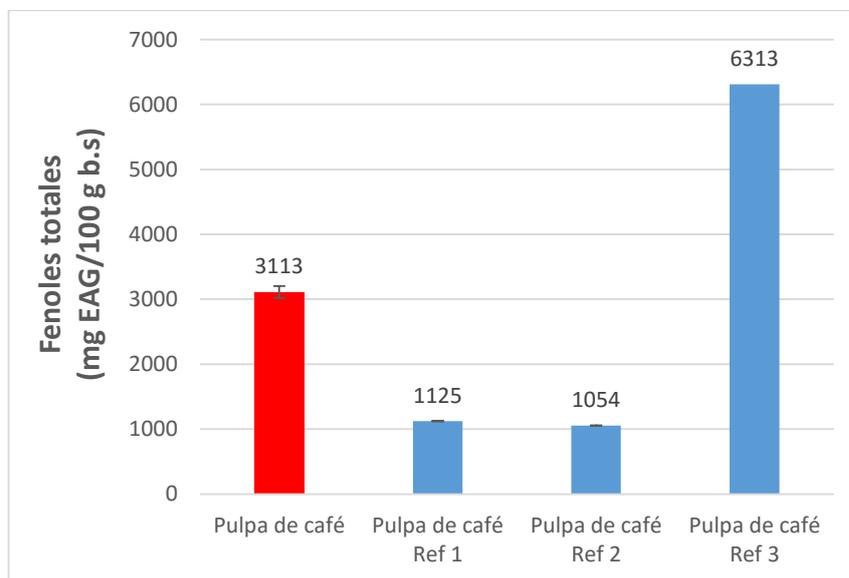


Figura 16: Fenoles totales de la pulpa de café.

Fuente. 1: Días y Meneses (2011)

Fuente. 2: Cortés Meza (2017)

Fuente. 3: Tobón y de la Cruz (2015)

Elaboración: El autor.

Fuente: El autor

Sin embargo, Tobón y de la Cruz (2015) encontraron un contenido de fenoles totales mayor (6313 mg EAG/100 g b.s), utilizando los mismos solventes EtOH-H₂O (50-50, v/v), pero realizaron el proceso de extracción asistida por ultrasonido a diferencia del presente estudio en el que se empleó maceración dinámica. De acuerdo a Azmir et al. (2013); Yang y Zhang (2008) el ultrasonido produce cavitación (producción de burbujas), mejorando la eficacia de extracción de compuestos orgánicos como inorgánicos; adicionalmente provoca la inflamación de las células permitiendo la ruptura de las paredes celulares provocando mejor difusión y penetración del disolvente (Rodríguez Carmona, 2016). También Yang y Zhang (2008) demostraron que la aplicación del método ultrasonido asistido es más eficaz que la maceración dinámica. Pero a nivel industrial la extracción asistida por ultrasonido es limitada debido a su mayor costo.

En la figura 17 se presenta la comparación del contenido de F.T con muestras de cacao y subproductos de mango, manteniendo el mismo método de extracción (EtOH-H₂O en proporciones 50-50 v/v y temperatura de 60°C). Como se puede apreciar, el cacao tiene mayor contenido fenólico, seguido de la pulpa del café y subproductos del mango (Guamán Gonzales

& Castillo Carrion, 2017; Martínez Morales & Martínez Espinosa, 2016). Cabe indicar que estas muestras son ampliamente reconocidas por su potencial como fuente de compuestos fenólicos (García Bacallao, Vicente García Gómez, Rojo Domínguez, & Sánchez García, 2001; Lecumberri et al., 2007; Veintimilla Gualán & Meneses Chamba, 2013).

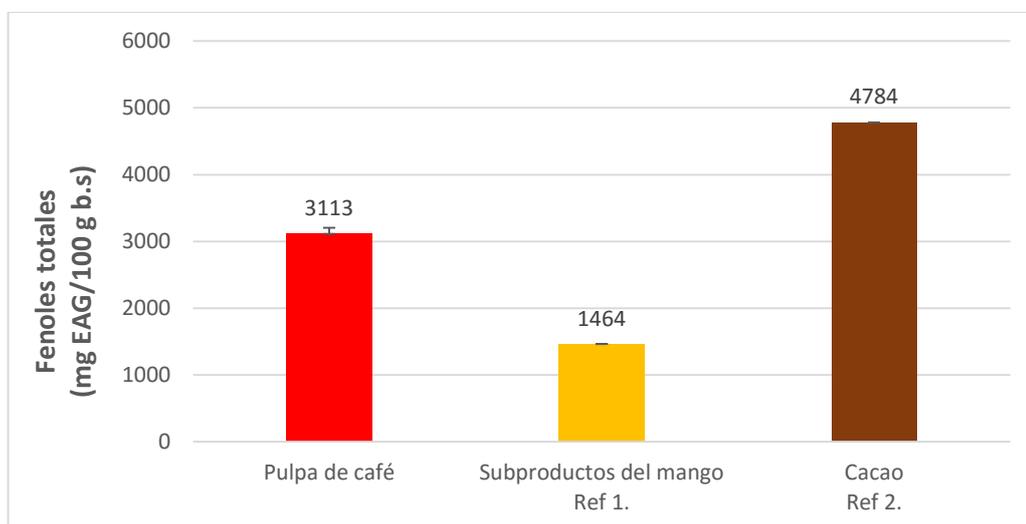


Figura 17: Fenoles totales de la pulpa de café comparada con subproductos del mango y cacao aplicando la misma técnica de extracción.

Fuente 1: Martínez Morales y Martínez Espinosa (2016)

Fuente 2: Guamán Gonzales y Castillo Carrion (2017)

Elaboración: El autor.

Los sistemas de solventes más utilizados en la extracción de compuestos en alimentos son agua, metanol, etanol, acetona y acetato de etilo (Dhar et al., 2017). El presente estudio concuerda con resultados alcanzados en previas investigaciones, donde se ha demostrado que se debe emplear dos mezclas de solventes con diferente polaridad para facilitar la extracción de los compuestos antioxidantes (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007). Además Dhar et al. (2017) demostró que al usar mezclas hidroalcohólicas se logra mayor capacidad antioxidante y contenido fenólico, comparada con los resultados alcanzados al emplear solvente puro o al 80%. Alvis, Martínez, y Arrazola (2012) también encontraron mayor capacidad antioxidante al combinar dos solventes de diferente polaridad, frente H₂O al 100%. En la figura 18 se observa el contenido fenólico de pulpa café comparada con subproductos de diversas frutas, los cuales se obtuvieron por mezclas hidroalcohólicas.

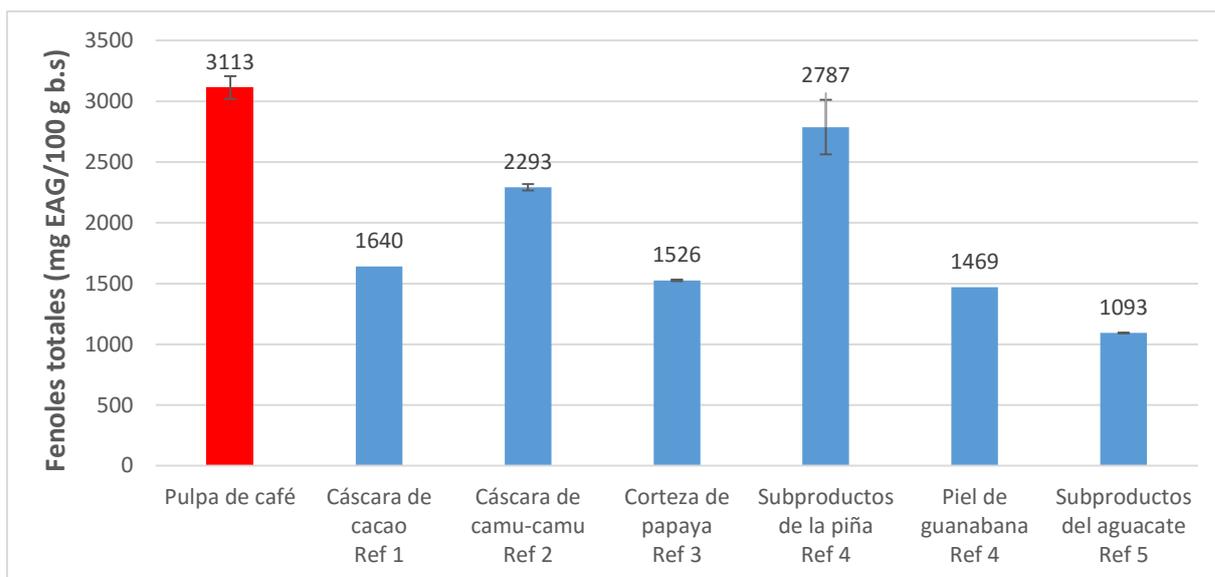


Figura 18: Fenoles totales de la pulpa de café comparada con otros subproductos de frutos.

Fuente. 1: Sotelo, Alvis, y Arrázola (2017)

Fuente. 2: Jáuregui, Ramos-Escudero, Ureta, Castañeda, y Caparó (2009)

Fuente. 3: Idárraga Vélez (2015)

Fuente. 4: Silva et al. (2014)

Fuente. 5: Polania Barreto (2014)

Elaboración: El autor.

3.3. Cuantificación de antioxidantes

3.3.1. Método FRAP y DPPH

En la tabla 4 se presenta la capacidad antioxidante (C.A) de los extractos, medida por los métodos FRAP y DPPH. Con las condiciones de concentración del solvente EtOH-H₂O (50-50, v/v), temperatura de extracción de 60°C, se consiguió el mayor poder de reducción férrica y mayor capacidad inhibitoria del radical DPPH (190 µmol E.T/ g b.s para FRAP; y 220 µmol E.T/ g b.s para DPPH). Este incremento de C.A. puede atribuirse al aumento de temperatura, lo cual promueve la formación de compuestos antioxidantes por ejemplo las melanoidinas de color café que provienen de la reacción de Maillard. (Pérez-Hernández, Chávez-Quiroz, Medina-Juárez, & Meza, 2013).

Tabla 4. Capacidad de antioxidantes en la pulpa de café deshidratada mediante método.

Solvente	Relación (v/v)	Temperatura (°C)	FRAP (μmol E.T/ g b.s)	DPPH (μmol E.T/ g b.s)
EtOH	100	20	20 ± 1 ^f	13 ± 1 ^f
		40	35 ± 3 ^d	28 ± 2 ^e
		60	43 ± 1 ^c	35 ± 3 ^e
EtOH-H ₂ O	50-50	20	155 ± 2 ^b	163 ± 3 ^c
		40	158 ± 3 ^b	198 ± 5 ^b
		60	190 ± 1 ^a	220 ± 9 ^a
H ₂ O	100	20	25 ± 1 ^e	13 ± 1 ^f
		40	28 ± 1 ^e	14 ± 1 ^f
		60	41 ± 2 ^c	50 ± 3 ^d

Las letras iguales en los valores de la misma columna significan que no hay diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$).

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Las mezclas de disolventes EtOH-H₂O, presentaron mayor capacidad antioxidante frente al EtOH y H₂O puros. Similar resultados fueron reportados por Gozzi y Diaz (2011) donde encontró que un incremento gradual de EtOH frente al uso de H₂O al 100% logra mayor capacidad antioxidante. Chew et al. (2011) reportó mayor C.A al incrementar la temperatura a 65 °C a diferencia de 25, 35, 45, 55 °C, además evaluaron el uso de solventes EtOH-H₂O, obteniendo mejor extracción de antioxidantes al usar EtOH hasta el 60 %, para ello realizó ensayos a diferentes concentraciones de EtOH 20, 40, 60, 80 y 100 %; Zhao y Hall (2008) también encontraron mayor C.A en la mezcla EtOH-H₂O (60-40, v/v) frente al uso de EtOH al 100% y en concentraciones inferiores; Alvis et al. (2012) al combinar EtOH-H₂O (50-50, v/v), obtuvo mayor C.A frente a EtOH de 0-100%, estos estudios corroboran con la presente investigación al encontrar menor C.A al usar H₂O y EtOH al 100%

El EtOH es un solvente que tiene la capacidad de formar puentes hidrógenos y ceder protones al igual que el H₂O, pero a diferencia del H₂O presenta un polo lipofílico que permite disolver moléculas no polares y así mejoran la captación de antioxidantes de diferente polaridad; además el EtOH estabiliza las estructuras menos polares como flavonoides, y al donar sus electrones reaccionan con los radicales libres transformándolos en estructuras más estables y junto con el H₂O producen un medio isotónico evitando el estrés oxidativo (Alvis et al., 2012; Ana María Mesa-Vanegas et al., 2015; Ortiz Pérez, 2017)

De acuerdo a la figura 19 se observa que según el método FRAP y DPPH la actividad antioxidante de la pulpa de café es de 190 $\mu\text{mol TE/g}$ para FRAP y 220 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para DPPH es similar a los valores reportados por Días y Meneses (2011) con 208 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en FRAP y 183 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en DPPH en la pulpa de café donde uso extracción hidroalcoholica mejorando la C.A; sin embargo Fonseca-García et al. (2014) usó en la técnica de extracción una temperatura de 90°C proporcionándole C.A inferior de 72 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en FRAP y 32 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en DPPH, esto es debido que al emplear una temperatura muy elevada se pueden degradar los compuestos fenólicos (Gómez Romero, 2010), además al utilizar como solvente H₂O 100% proporcionando menor C.A, ya el agua tiene menor afinidad por los antioxidantes poco polares como algunos polifenoles y flavonoles (Azmir et al., 2013).

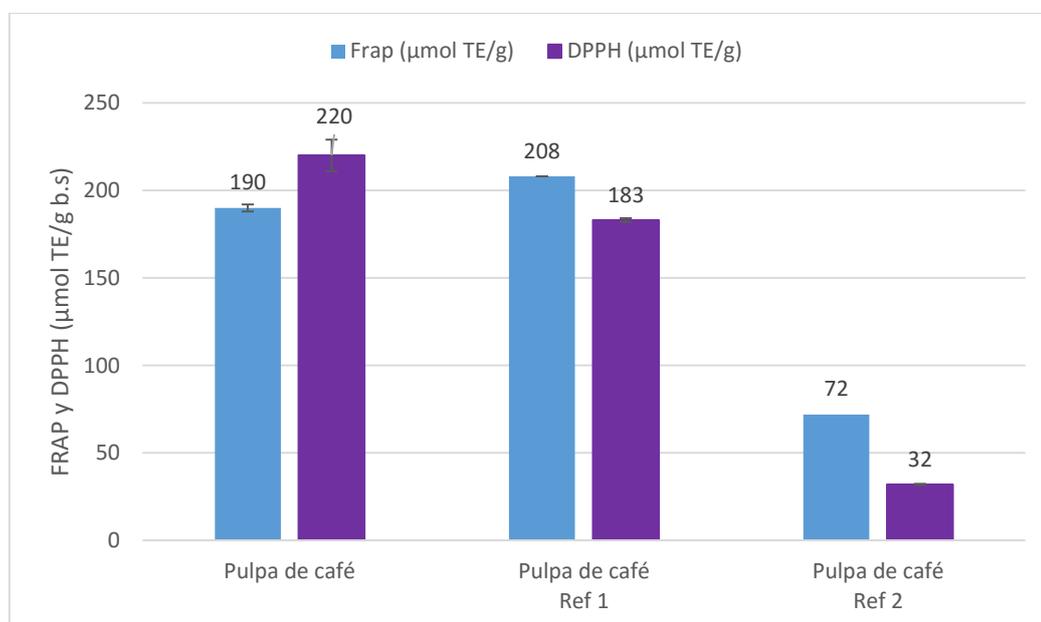


Figura 19: Capacidad antioxidante por el método FRAP y DPPH en la pulpa de café.

Fuente. 1: Días y Meneses (2011)

Fuente. 2: Fonseca-García et al. (2014)

Elaboración: El autor.

En la figura 20 se compara el poder de reducción férrica antioxidante y la capacidad inhibitoria del radica DPPH de la presente investigación (190 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para FRAP y 220 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para DPPH) con otros subproductos de las frutas obtenidos por mezclas hidroalcoholicas. La pulpa café contiene mayor C.A que la piel de guayaba ya que Figueroa Hurtado et al. (2012) obtuvieron 58 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en FRAP y 73 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en DPPH, Además, Obaco et al. (2011) encontraron una C.A inferior en la cáscara de cacao (13 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para FRAP y 100 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para DPPH). Paute y Guamán (2016) también

obtuvieron en la vena de tamarindo valores inferiores para FRAP y DPPH de 24 y 33 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$, respectivamente. Macas y Meneses (2017) encontraron menor C.A en la corteza de mango 151 y 147 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ en FRAP y DPPH. Sin embargo Ochoa Guindulán y Oria Almudi (2016) obtuvieron mayor C.A en la corteza del achotillo con valores de 350 μmol y 380 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para FRAP y DPPH.

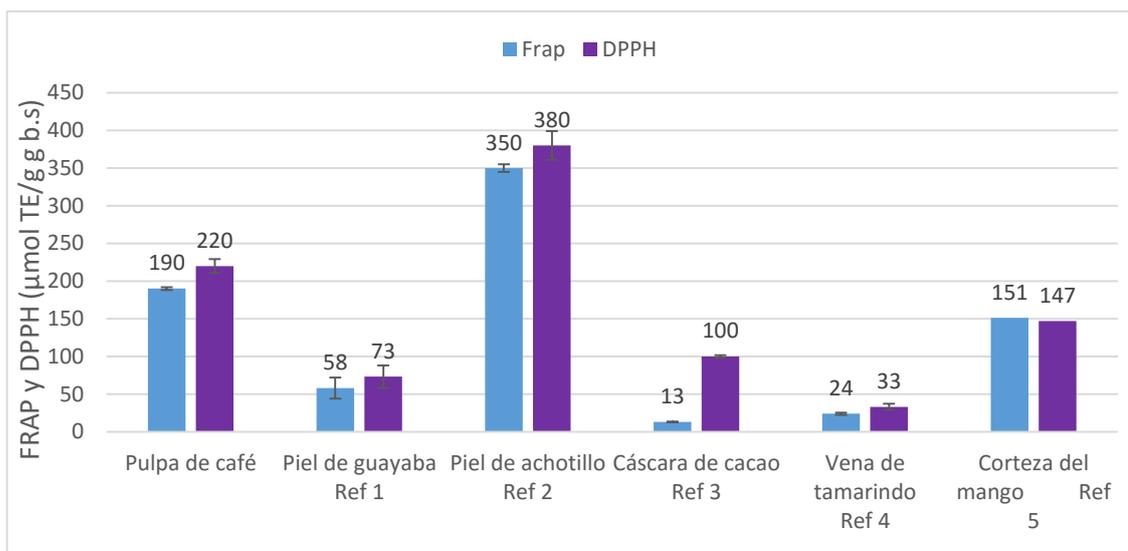


Figura 20: Capacidad antioxidante por el método FRAP y DPPH en la pulpa de café y subproductos de algunos frutos.

Fuente. 1: Figueroa Hurtado et al. (2012)

Fuente. 2: Ochoa Guindulán y Oria Almudi (2016)

Fuente. 3: Obaco et al. (2011)

Fuente. 4: Paute y Guamán (2016)

Fuente. 5: Macas y Meneses (2017)

Elaboración: El autor.

En la figura 21, se compara la C.A de la pulpa del café, subproductos del mango y cacao resultante de los métodos FRAP y DPPH, al emplear la misma técnica de extracción que es EtOH-H₂O en relaciones 50-50 (v/v), los cuales evidenciaron como resultado un óptimo tratamiento por mostrar mayor actividad antioxidante, mayor rendimiento de extracción y mayor capacidad de contenido fenólico, se observa que el cacao tiene mayor actividad antioxidante con 454 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para DPPH y 356 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para FRAP, seguida de la pulpa del café con 220 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para DPPH y 190 para FRAP, finalmente en subproductos del mango con 178 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para DPPH y 118 $\mu\text{mol E.T/g b.s}$ para FRAP (Guamán Gonzales & Castillo Carrion, 2017; Martínez Morales & Martínez Espinosa, 2016).

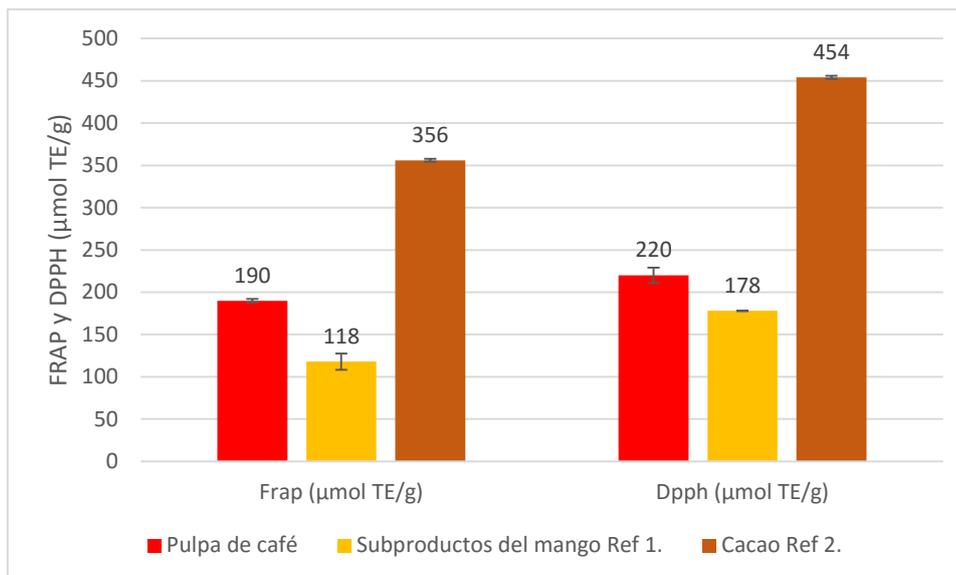


Figura 21: Capacidad antioxidante medida mediante los métodos FRAP y DPPH, en la pulpa de café comparada con subproductos del mango y cacao aplicados con la misma técnica de extracción.

Fuente. 1: Martínez Morales y Martínez Espinosa (2016)

Fuente. 2: Guamán Gonzales y Castillo Carrion (2017)

Elaboración: El autor.

3.3.1.1. IC_{50} y AAI

En la tabla 5 se presentan los resultados de IC_{50} ($34 \mu\text{g/mL}$) presentes en la pulpa de café, siendo $34 \mu\text{g}$ de extracto requeridos para inhibir 1 mL de DPPH. Según la clasificación de Ramos et al. (2003); Tovar del Río (2013) presenta un potencial antioxidante moderado por encontrarse en valores en un rango de $30 - 100 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 5. IC_{50} y AAI de la pulpa del café.

TRATAMIENTO CON SOLVENTE	TEMPERATURA (°C)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	AAI
EtOH-H ₂ O (50-50)	60 °C	34 ± 5	0.68 ± 0.1

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

En la figura 22 se presenta una comparación de los resultados logrados en la presente investigación frente a resultados de alimentos, frutas y subproductos de frutas. Jeton y Piercosimo (2014) han reportado valores similares en el mortiño con $47 \mu\text{g/mL}$, Matute y Bernardo (2014) lograron resultados afines en la uvilla con $32 \mu\text{g/mL}$, todos considerados como fuentes potenciales de compuestos fenólicos.

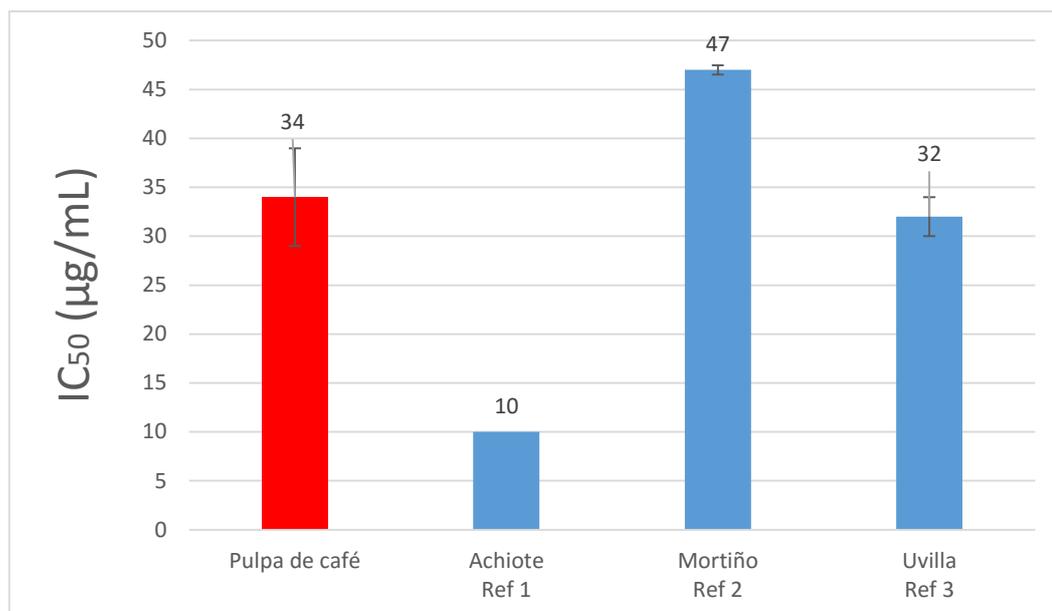


Figura 22: IC₅₀ de la pulpa de café comparada con otros frutos y subproductos de frutos.

Fuente. 1: Doroteo, Terry, Díaz, Vaisberg, y Rojas (2012)

Fuente. 2: Jeton y Piercosimo (2014)

Fuente. 3: Matute y Bernardo (2014)

Elaboración: El autor.

Sin embargo Doroteo et al. (2012) alcanzaron en el achiote un IC₅₀ de 10 µg/mL, por ende considerándolo como alimento con un alto potencial antioxidante, por encontrarse en valores menores a 30 µg/mL a diferencia de la pulpa de café que tiene un potencial antioxidante moderado (Tovar del Río, 2013).

Como se observa en la figura 23, Martínez Morales y Martínez Espinosa (2016) y Guamán Gonzales y Castillo Carrion (2017) emplearon el mismo método de extracción de la presente investigación, en subproductos del mango y cacao, reportando volares de IC₅₀ de 65 y 81 µg/mL respetivamente, considerados por poseer un potencial antioxidante moderado de acuerdo a su IC₅₀ por presentar valores de 30 – 100 µg/mL al igual que la pulpa de café (34 µg/mL) (Tovar del Río, 2013)

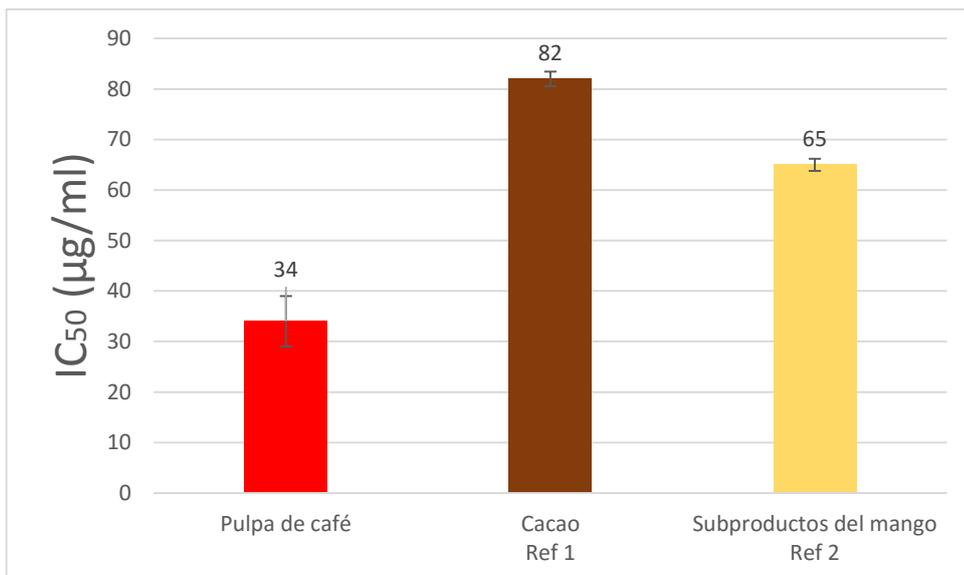


Figura 23: . IC₅₀ en la pulpa de café comparada con subproductos del mango y cacao usados en la misma matriz.

Fuente. 1: Guamán Gonzales y Castillo Carrion (2017)

Fuente. 2: Martínez Morales y Martínez Espinosa (2016)

Elaboración: El autor.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a los tratamientos aplicados, la mezcla EtOH-H₂O en proporciones 50-50 v/v y temperatura de extracción de 60 °C, permitieron la mejor extracción de compuestos fenólicos, presentando mayor capacidad de reducción férrica y del radical libre DPPH.
- El contenido fenólico en la pulpa de café fue de 3113 mg EAG/100 g de b.s, la C.A fue de 190 y 220 µmol E.T/ g b.s para FRAP y DPPH, respectivamente.
- Los resultados obtenidos tanto en IC₅₀ como en AAI, demuestran que la pulpa de café posee un potencial antioxidante moderado por tener un IC₅₀ 34 µg/mL y un AAI de 0.68 por lo que se puede considerar como fuente alternativa de antioxidantes.

RECOMENDACIONES

Debido al contenido fenólico y capacidad antioxidante que presenta la pulpa de café, se recomienda para investigaciones futuras:

- Continuar con la identificación de compuestos mediante HPLC.
- Estudios de aislamiento de compuestos de interés mediante cromatografía en columna con solventes de diferente polaridad.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de la pulpa de café.

BIBLIOGRAFÍA

- Agudo, L. (2014). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos.
- Álvarez, E., Jimenez, O. J., Posada, C. M., Rojano, B. A., García, C. M., y Diego, L. (2009). Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Vitae*, 15(1).
- Alvis, A., Martínez, W., y Arrazola, G. (2012). Obtención de extractos hidro-alcohólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como antioxidante natural. *Información tecnológica*, 23(2), 3-10.
- Aristizabal, C., y Duque, H. (2006). Caracterización del proceso de beneficio de café en cinco departamentos cafeteros de Colombia.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., et al. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Baggio, J., Lima, A., Mancini Filho, J., y Fett, R. (2007). Identification of phenolic acids in coffee (*coffea arabica*) Dust and its antioxidant activity. *Italian journal of food science*, 19(2).
- Bello, J. (2006). La ciencia de los alimentos saludables: una panorámica actual.
- Benzie, I. F., y Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cerón, A. M. R., y Uribe, S. T. (2011). Optimización de las condiciones de extracción sólido-líquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha (*Mangifera indica*. Var. Magdalena River) y ajustes de sus parámetros cinéticos. *Tesis previa a la optención al título de Ingeniero Químico*.
- Cortés Meza, S. A. (2017). *Determinación de antioxidante en subproductos de café producido y comercializado en Risaralda (Colombia)*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Chaves, G. E. R. (2006). *Café, ambiente y sociedad en la cuenca del río Virilla, Costa Rica (1840-1955)*: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Chew, K., Khoo, M., Ng, S., Thoo, Y., Wan Aida, W., y Ho, C. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4).
- Desarrollo-GIZ, C. A. a. (2013). Catálogo de Maquinarias y Equipos para Procesamiento de Café.

- Dhar, G., Akther, S., Sultana, A., May, U., Islam, M. M., Dhali, M., et al. (2017). Effect of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant capacities of *Artocarpus chaplasha* and *Carissa carandas* fruits from Bangladesh. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol, 5(03)*, 039-044.
- Días, A. T., y Meneses, M. Á. (2011). Pulpa de café (*Coffea arabica* L): como fuente alternativa de antioxidantes *Tesis de grado*.
- Doroteo, V. H., Terry, C., Díaz, C., Vaisberg, A., y Rojas, R. (2012). Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). *Revista de la Sociedad Química del Perú, 78(4)*, 254-263.
- Elejalde Guerra, J. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. Paper presented at the Anales de Medicina Interna.
- Figueroa Hurtado, J. G., Armijos Piedra, M. A., y Pérez Cuenca, E. L. (2012). Efecto del tamaño de partícula sobre la capacidad antioxidante de un subproducto de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, III*.
- Fira, F. I. e. R. c. I. A. (2015). Panorama Agroalimentario (Café). *FIRA, I*, 36.
- Fonseca-García, L., Calderón-Jaimes, L. S., y Rivera, M. E. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia). *Vitae, 21(3)*.
- García Bacallao, L., Vicente García Gómez, L., Rojo Domínguez, D. M., y Sánchez García, E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas, 20(3)*, 231-235.
- García Bure, C. A. (2014). Estudio de factibilidad del diseño de una planta productora de etanol para biocombustible, aprovechando el mucílago y pulpa de café en el distrito de San Ignacio–Cajamarca.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- Garmendia, G., y Vero, S. (2006). Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura, 197*, 18-27.
- Gómez Romero, M. (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales*: Granada: Universidad de Granada.
- Gotteland, M., y de Pablo, S. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista chilena de nutrición, 34(2)*, 105-115.
- Gozzi, I. M. S., y Diaz, E. (2011). Variabilidad de la capacidad antioxidante de extractos foliares de arándano *vaccinium ashei* obtenidos en diferentes condiciones de extracción.

- Guamán Gonzales, K. E., y Castillo Carrion, M. J. (2017). Determinación de la calidad fenólica del cacao. *Universidad Técnica Particular de Loja, Tesis de grado*.
- Guerreo, E., Carlos, A., Alzate, T., Luz, M., Rojano, B. A., y Arteaga, D. M. (2013). Nueva fuente de antioxidantes para el control de pardeamiento enzimático: una alternativa para la reducción de pérdidas en poscosecha de frutas.
- Gutiérrez Zavala, Á., Ledesma Rivero, L., García García, I., y Grajales Castillejos, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista cubana de salud publica*, 33(1), 0-0.
- Herrejon Herrejon, J., López Rojas, X. M., Reséndiz López, M., Rojas, V., y Érica, P. (2010). *Italia como oportunidad de mercado para el café de Veracruz*.
- Idárraga Vélez, Á. M. (2015). *Producción de biomoléculas con aplicaciones cosméticas a partir de residuos de frutas*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.
- Jáuregui, A. M. M., Ramos-Escudero, F., Ureta, C. A.-O., Castañeda, B. C., y Caparó, F. L. (2009). Evaluación de compuestos con actividad biológica en cáscara de camu camu, guinda, tomate de árbol y carambola, cultivadas en Perú. *Rev Soc Quim Perú*, 75, 4.
- Jeton, J., y Piercosimo, T. (2014). Desarrollo de bebidas con potencial antioxidante y antirradicalario a partir de frutos ecuatorianos. *Universidad del Azuay, Tesis previa a la obtención del título en Ingeniero en alimentos*.
- Larraín, R., Schaefer, D., Richards, M., y Reed, J. (2008). Finishing steers with diets based on corn, high-tannin sorghum or a mix of both: Color and lipid oxidation in beef. *Meat science*, 79(4), 656-665.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., y Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food chemistry*, 104(3), 948-954.
- Lopez Dominguez, L. G., y Zurita Herrera, G. (2009). Análisis estadístico de la producción de café en el Ecuador.
- López, T., Prado-Barragán, A., Nevárez-Moorillón, G., Contreras, J., Rodríguez, R., y Aguilar, C. (2013). Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido. *CyTA-Journal of Food*, 11(4), 359-365.
- Macas, G., y Meneses, M. (2017). *Optimización de las condiciones de atomización de antioxidantes obtenidos de los subproductos de mango (*Mangifera indica* L.)*. Universidad técnica particular de Loja, Ecuador-Loja.
- Martínez Morales, E. S., y Martínez Espinosa, R. I. (2016). Calidad fenólica de los subproductos de mango. *Universidad Técnica Particular de Loja*.
- Matute, C., y Bernardo, O. (2014). *Variación del potencial antioxidante durante la maduración de uvilla (*Physalis peruviana* L) y su estabilidad frente a tratamientos térmicos*. Universidad del Azuay.

- Mesa-Vanegas, Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Trujillo, S., y Rojano, B. (2010). Antioxidant activity and total phenols content from some species of *Calophyllum* genus. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2).
- Mesa-Vanegas, A. M. a., Zapata-Uribe, S. n., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., y Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1).
- Niseteo, T., Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., y Budeč, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food chemistry*, 134(4), 1870-1877.
- Obaco, D. C., Pineda Ilanos, I. C., y Figueroa Hurtado, J. G. (2011). *Los residuos de cacao (Theobroma cacao L.) como fuente alternativa de antioxidantes*. (Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Industrias Agropecuaria), Universidad técnica particular de Loja, Ecuador-Loja.
- Ochoa Guindulán, A., y Oria Almudi, R. (2016). Determinación de compuestos fenólicos y estudio de la actividad antioxidante de la piel de Rambután. *Universidad de Zaragoza*.
- Ortiz Pérez, T. A. (2017). *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de diferentes extractos de Chuquiragua (Chuquiragua jussieui) obtenidos mediante secado por aspersión*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- Paute, A., y Guamán, M. (2016). *Optimización de la extracción de antioxidantes en subproducto de tamarindo (Tamarindus indica L.)*. Universidad técnica particular de Loja, Ecuador-Loja.
- Pérez-Hernández, L. M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. Á., y Meza, N. G. (2013). Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. *Biotechnia*, 15(1), 51-56.
- Pérez-Jiménez, J., y Saura-Calixto, F. (2007). *Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas*. Paper presented at the V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Cartagena.
- Polania Barreto, W. (2014). *Actividad antioxidante de residuos del aguacate Hass (Persea americana Mill. var Hass) sometidos a extracciones clásicas ya fluidos presurizados*. Universidad Nacional de Colombia.
- Proecuador. (2013). Análisis Sectorial del café. *Instituto de promoción de exportaciones e inversiones, I*.

- Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, A., Rodriguez, C., y Rivero, R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 87(2), 241-246.
- Rathinavelu, R., y Graziosi, G. (1967). Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. *Organización Internacional del Café. ED*, 5(4).
- Riobó, P., y Franco, R. (2013). CAFÉ, ciencia y salud.
- Rodríguez Carmona, O. Y. (2016). Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, wereque y raíz de nopal.
- Rodríguez, N., y Zambrano, D. (2013). Los subproductos del café: fuente de energía renovable.
- Rodríguez Valencia, N. (1999). *Manejo de residuos en la agroindustria cafetera*. Paper presented at the Feria y Seminario Internacional. Gestión Integral de Residuos Sólidos y Peligrosos Siglo XXI.
- Rosso, A. M., y Toro, S. (2011). Optimización de las condiciones de extracción sólido-líquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha (*Mangifera indica*. Var. Magdalena River) y ajuste de sus parámetros cinéticos. *Tesis previa a la optención al título de Ingeniero Químico*.
- Scherer, R., y Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- Silva, L. M. R., de Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., de Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., et al. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*, 143, 398-404.
- Slinkard, K., y Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Sogi, D. S., Siddiq, M., Greiby, I., y Dolan, K. D. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tommy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food chemistry*, 141(3), 2649-2655.
- Sotelo, L., Alvis, A., y Arrázola, G. (2017). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124-134.
- Spigno, G., y De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Swain, T., y Hillis, W. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68.

- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 669-675.
- Tobón, A., y de la Cruz, N. (2015). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo.
- Tovar del Río, J. (2013). *Determinacion de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Veintimilla Gualán, M. G., y Meneses Chamba, M. A. (2013). Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de mango *Universidad Técnica Particular de Loja, Tesis de grado*.
- Wagner, R. (2001). *Historia del café de Guatemala*: Villegas Asociados.
- Yang, Y., y Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(4), 308-313.
- Zhao, B., y Hall, C. A. (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food chemistry*, 108(2), 511-518.

ANEXOS

ANEXO A: Determinación de humedad de la pulpa de café deshidratada.

Se empleó la siguiente Fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \left(\frac{\text{P inicial muestra} - \text{P final muestra}}{\text{P muestra}} \right) * 100\%$$

Se tomó como ejemplo el primer valor de la tabla A.1, se sigue el mismo procedimiento para los demás valores, al final se sacó un promedio, el resultante es el valor del porcentaje de humedad.

$$\% \text{ de humedad} = \left(\frac{5.02 \text{ g} - 4.98 \text{ g}}{5.02 \text{ g}} \right) * 100$$

% de humedad = 0.79 %

Tabla A.1: Humedad de la pulpa de café deshidratada.

Muestra	Peso cápsula (g)	Peso inicial muestra (g)	Peso cápsula + muestra (g)	Peso final muestra (g)	Humedad (%)
1	127.90	5.02	132.92	4.98	0.79
2	89.64	5.01	94.65	4.97	0.90
3	91.38	5.03	96.41	4.98	0.87
				Humedad de muestra	0.85

Elaboración: El autor.

ANEXO B: Rendimiento de extracción.

Se tomó como ejemplo el primer valor de la tabla B.1, donde se calculó el rendimiento de extracción:

$$0.0043 \text{ g} \text{ ----- } 2 \text{ mL}$$

$$X \text{ ----- } 20 \text{ mL}$$

$$X = 0.043 \text{ g}$$

$$0.043 \text{ g} \text{ ----- } 1.02 \text{ g}$$

$$X \text{ ----- } 100 \text{ g}$$

$$\mathbf{X = 4.2 \% \text{ (Rendimiento)}}$$

Donde:

2 mL = alícuota tomada del extracto para eliminar el solvente y medir el rendimiento de extracción (proceso de concentración de los extractos)

20 mL = volumen total del extracto

0.0043 g = peso del extracto libre del solvente

Tabla B.1: Concentración de los extractos.

Muestra #	Peso muestra (g)	Solvente (v/v)	T (°C)	Alícuota (mL)	Vial vacío desecado a 3 h (g)	Vial + muestra a 6 h (g)	Diferencia (g)	Rendimiento (%)
1	1.02	100% ETANOL	20°C	2	9.915	9.919	0.00430	4.2
2	1.01			2	10.023	10.027	0.00434	4.3
3	1.03			2	10.073	10.077	0.00394	3.8
4	1.02	50%:50% AGUA:ETANOL		2	9.998	10.025	0.02695	26.4
5	1.01			2	9.942	9.967	0.02510	24.8
6	1.02			2	9.919	9.948	0.02875	28.2
7	1.03	100% AGUA		2	9.979	10.004	0.02461	23.9
8	1.01			2	10.001	10.026	0.02545	25.2
9	1.01			2	10.116	10.140	0.02385	23.6
10	1.03	100% ETANOL	40°C	2	10.557	10.561	0.00344	3.3
11	1.02			2	10.182	10.185	0.00342	3.3
12	1.03			2	10.103	10.107	0.00347	3.3
13	1.02	50%:50% AGUA:ETANOL		2	10.100	10.129	0.02913	28.5
14	1.02			2	9.875	9.908	0.03260	31.9
15	1.03			2	9.867	9.897	0.03034	29.4
16	1.03	100% AGUA		2	10.022	10.047	0.02479	24.1
17	1.02			2	9.966	9.996	0.02959	29.1
18	1.02			2	10.114	10.141	0.02742	26.9
19	1.01	100% ETANOL	60°C	2	9.893	9.905	0.01180	11.7
20	1.01			2	10.212	10.222	0.01012	10.1
21	1.03			2	9.909	9.921	0.01199	11.6
22	1.01	50%:50% AGUA:ETANOL		2	10.045	10.073	0.02850	28.2
23	1.02			2	10.013	10.046	0.03377	33.1
24	1.03			2	10.045	10.078	0.03331	32.3
25	1.02	100% AGUA		2	10.038	10.066	0.02851	27.9
26	1.01			2	9.867	9.896	0.02861	28.3
27	1.03			2	10.098	10.128	0.03009	29.2

Elaboración: El autor

ANEXO C: Cuantificación de contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu.

1. Preparación de reactivos

- Preparación de solución Folin- Ciocalteu a 0.25 N

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C₁= Concentración del reactivo (2 N)

V₁= Alícuota a tomar para obtener la concentración deseada

C₂= Concentración deseada (0.25 N)

V₂= Volumen que se desea preparar

Ejemplo:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{0.25 \text{ N} * 10 \text{ mL}}{2 \text{ N}}$$

$$V_1 = 1.25 \text{ ml de Folin}$$

Se tomó 1.25 mL del reactivo Folin y llevó a un aforo de 10 mL con agua destilada para obtener Folin a 25 N.

- Preparación de carbonato de sodio (Na₂CO₃) a 1 N

PM (Na₂CO₃) a 1 N	106 g/mL
Equivalente químico	53 g/mol
Volumen a preparar	25 mL

$$\begin{array}{l} 53 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ N} \text{ ----- } 100 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 1 \text{ N} \text{ ----- } 25 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = \frac{53 \text{ g} * 25 \text{ mL} * 1 \text{ N}}{1000 \text{ mL} * 1 \text{ N}}$$

$$x = 1.325 \text{ g Na}_2\text{CO}_3$$

Se pesó 1.325 g de carbonato de sodio y aforó a 25 mL con agua destilada para obtener carbonato de sodio a 1 N.

2. Preparación de estándares de ácido gálico para la curva de calibración

- Solución madre de ácido gálico

Pureza de ácido gálico	97.5 %
Masa de ácido gálico	0.020 g
Volumen a preparar	10 mL

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{SM} = \frac{\text{masa de ácido gálico} * \text{pureza de ácido gálico}}{\text{volumen a preparar}}$$

$$C_{SM} = \frac{0.020 \text{ g} * 0.975}{10 \text{ mL}}$$

$$C_{SM} = 0.00195 \frac{\text{g}}{\text{mL}} * 1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

$$C_{SM} = 1.95 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ de ácido gálico.}$$

- **Preparación de estándares**

Se aplicó la siguiente formula

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

Donde:

C_{SM}: Concentración de la solución madre

V_{SM}: Volumen de la solución madre

C_E: Concentración deseada de estándar

V_E: Volumen a preparar del estándar

Como ejemplo se tomó el segundo valor de la tabla C.1, se continua con el mismo procedimiento para los demás estándares.

$$V_{SM} = \frac{C_E * V_E}{C_{SM}}$$

$$V_{SM} = \frac{0.010 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 10 \text{ mL}}{1.95 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}$$

VSM = 0.05 ml de solución madre A.G

Se tomó 0.05 mL de solución madre y llevó a un aforo de 10 mL con agua destilada.

Tabla C.1: Estándares de ácido gálico para F.T

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)	Absorbancias
E1	0.00	10	0.00	0.012
E2	0.05	10	0.010	0.048
E3	0.10	10	0.020	0.072
E4	0.20	10	0.039	0.132
E5	0.30	10	0.059	0.221
E6	0.40	10	0.078	0.301
E7	0.50	10	0.098	0.372

Elaboración: El autor.

3. Curva de calibración

Se construyó la curva de calibración con los valores de la tabla C.1 en el eje de x las concentraciones de los estándares y en el eje de la y las absorbancias.

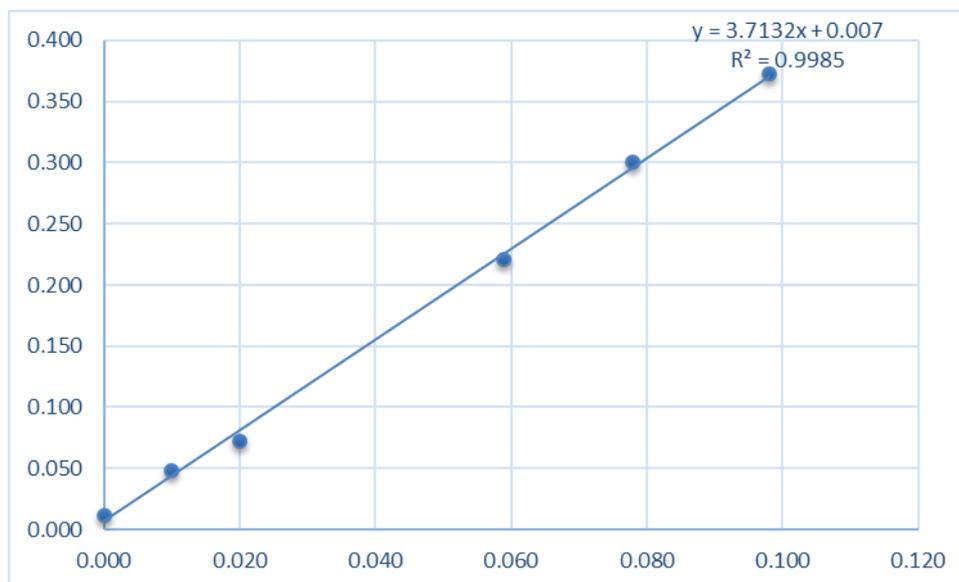


Figura C.1: Curva de calibración de fenoles totales.

Elaboración: El autor.

Pendiente	3.7132 mL/mg
Intersección	0.007
R²	0.9985

4. Cuantificación del contenido fenólico de los extractos

De acuerdo a la ecuación de la recta se calcula la concentración del contenido fenólico en los extractos, como ejemplo se tomó el primer valor de la tabla C.2

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

Se despejo la fórmula:

$$y = 3.7132 \text{ mL/mg (X)} + 0.007 (X)$$

$$x = \frac{0.489 - 0.007}{3.7132 \text{ mL/mg}}$$

$$x = 0.129 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ EAG}$$

Se multiplicó por el factor de dilución:

$$x = 0.129 * 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ EAG} * \text{F.D}$$

$$x = 0.129 * 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ EAG} * 1$$

$$x = 0.129 \text{ mg/mL EAG}$$

La extracción se llevó a cabo con un volumen de 20 mL de solvente:

$$0.129 \text{ mg} \text{-----} 1 \text{ mL}$$

$$X \text{-----} 20 \text{ mL (Volumen extracto)}$$

$$X = 2.59 \text{ mg EAG}$$

Los resultados son expresados en mg EAG/100 g de muestra

$$2.59 \text{ mg EAG} \text{-----} 1.02 \text{ g (peso de muestra)}$$

$$X \text{-----} 100 \text{ g}$$

$$\mathbf{X = 255 \text{ mg EAG/100g}}$$

Tabla C.2: Cuantificación de fenoles totales de cada uno de los extractos

Muestra #	Peso muestra (g)	Absorbancia	Solvente (v/v)	T (°C)	(y+b)/m	F.D (mL)	* F.D	mg EAG/ 1 g (20 mL)	mg EAG/100 g b.s	Promedio mg EAG/100 g b.s
1	1.02	0.489	100% ETANOL	20°C	0.130	1	0.13	3	255	254
2	1.01	0.487			0.129	1	0.13	3	256	
3	1.03	0.488			0.130	1	0.13	3	252	
4	1.02	0.240	50%:50% AGUA:ETANOL		0.063	20	1.25	25	2461	2841
5	1.01	0.303			0.080	20	1.59	32	3157	
6	1.02	0.282			0.074	20	1.48	30	2904	
7	1.03	0.094	100% AGUA		0.023	20	0.47	9	910	933
8	1.01	0.093			0.023	20	0.46	9	917	
9	1.01	0.098			0.025	20	0.49	10	971	
10	1.03	0.046	100% ETANOL	40°C	0.011	20	0.21	4	408	402
11	1.02	0.043			0.010	20	0.19	4	380	
12	1.03	0.047			0.011	20	0.22	4	418	
13	1.02	0.295	50%:50% AGUA:ETANOL		0.078	20	1.55	31	3042	3113
14	1.02	0.327			0.086	20	1.72	34	3380	
15	1.03	0.286			0.075	20	1.50	30	2918	
16	1.03	0.133	100% AGUA		0.034	20	0.68	14	1318	1323
17	1.02	0.135			0.034	20	0.69	14	1352	
18	1.02	0.130			0.033	20	0.66	13	1299	
19	1.01	0.099	100% ETANOL	60°C	0.025	20	0.50	10	981	1024
20	1.01	0.104			0.026	20	0.52	10	1035	
21	1.03	0.108			0.027	20	0.54	11	1056	
22	1.01	0.302	50%:50% AGUA:ETANOL		0.079	20	1.59	32	3146	3084
23	1.02	0.289			0.076	20	1.52	30	2978	
24	1.03	0.306			0.081	20	1.61	32	3127	
25	1.02	0.186	100% AGUA		0.048	20	0.96	19	1890	2059
26	1.01	0.197			0.051	20	1.02	20	2026	
27	1.03	0.223			0.058	20	1.16	23	2259	

Elaboración: El autor.

ANEXO D: Cuantificación de capacidad antioxidante por medio del método FRAP.

1. Preparación de reactivos usados para la solución de trabajo de FRAP

- **Buffer de acetato a 30 mmol** (16 mL de ácido acético/L + 3.1 g de acetato de sodio/L)

Se preparó 200 mL de cada solución

$$\begin{array}{l} 16 \text{ mL CH}_3\text{COOH} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 200 \text{ mL} \\ \mathbf{X = 3.2 \text{ mL de CH}_3\text{COOH}} \end{array}$$

Se tomó 3.2 mL de CH₃COOH y llevó a un aforo de 200 mL con agua destilada

$$\begin{array}{l} 3.1 \text{ g de C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 200 \text{ mL} \end{array}$$

$$\mathbf{X = 0.62 \text{ g} = 620 \text{ mg de CH}_3\text{COOH}}$$

Se pesó 620 mg de CH₃COOH y llevó a un aforo de 200 mL con agua destilada

- **HCl a 0.04 mol**

PM. HCl	36.46 g/mol
Densidad	1.19 mg/mL
Pureza	97 %
Volumen deseado	25 mL

$$36.46 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ mL}$$

$$X \text{ ----- } 0.04 \text{ mol} \text{ ----- } 25 \text{ mL}$$

$$X = \frac{36.46 \text{ g} * 0.040 \text{ mol} * 25 \text{ mL}}{1 \text{ mol} * 1000 \text{ mL}}$$

$$X = 0.0364 \text{ g de HCl}$$

Como el HCl es líquido se aplicó la siguiente fórmula para saber que volumen mL de HCl se debe tomar.

$$V = \frac{m}{\delta}$$

$$V = \frac{0.0364 \text{ g}}{1.19 \frac{\text{g}}{\text{mL}}}$$

$$V = 0.0306 \text{ mL de HCl}$$

se corrigió de acuerdo a la pureza del HCl (37 %)

$$X = \frac{0.0306 \text{ mL} * 100 \%}{37 \%}$$

$$\mathbf{X = 0.0828 \text{ ml} = 82.8 \mu\text{l de HCl}}$$

Se tomó 82.8 μl de HCl y llevar a un aforo de 25 mL con agua destilada

- **Solución TPTZ a 0.01 mol**

PM. C₁₈H₁₂N₆	312.33 g/mol
Volumen deseado	25 mL

$$312.33 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ mL}$$

$$X \text{ ----- } 0.01 \text{ mol} \text{ ----- } 25 \text{ mL}$$

$$X = \frac{312.33 \text{ g} * 0.010 \text{ mol} * 25 \text{ mL}}{1 \text{ mol} * 1000 \text{ mL}}$$

$$\mathbf{X = 0.078 \text{ g} = 78 \text{ mg de TPTZ}}$$

Los 78 mg de TPTZ se aforaron a 25 mL con la solución de HCl 0.04 mol

- **Solución de clorura férrico a 0.04 mol**

PM. FeCl₃·6 H₂O	270.37 g/mol
Volumen deseado	25 mL

$$\begin{array}{l} 270.37 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 0.020 \text{ mol} \text{ ----- } 25 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = \frac{270.37 \text{ g} * 0.020 \text{ mol} * 25 \text{ mL}}{1 \text{ mol} * 1000 \text{ mL}}$$

$$\mathbf{X = 0.135 \text{ g} = 135 \text{ mg de cloruro férrico}}$$

Se pesó 135 mg de FeCl₃·6 H₂O y aforó a 25 mL con agua destilada

2. Preparación de estándares y solución madre de trolox.

- **Solución madre de trolox**

Para conocer la concentración de la solución madre trolox (0.0125 mg aforados a 50 mL de metanol), se calcula:

PM. Trolox	250.29 g/mol
Volumen deseado	50 mL
Masa	0.0125 g

$$250.29 \text{ g} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$0.0125 \text{ g} \text{ ----- } 50 \text{ mL} \text{ -----}$$

$$X = \frac{250.29 \text{ g} * 1 \text{ mol} * 1000 \text{ mL}}{0.0125 \text{ g} * 50 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración Trolox} = 0.000998 \text{ mol} = 998.84 \mu\text{mol de trolox}$$

El reactivo de Trolox tiene una pureza de 97 % se realizó el siguiente ajuste de pureza

$$X = \frac{998.84 \mu\text{mol} * 100}{97}$$

$$\mathbf{\text{Concentración solución madre de Trolox} = 1029.73 \mu\text{mol de trolox}}$$

- **Preparación de estándares:**

Se aplicó la siguiente fórmula, para conocer que volumen se debe tomar de solución madre, como ejemplo se tomó el primer valor de la tabla D.1

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

Donde:

C_{SM}: Concentración de la solución madre

V_{SM}: Volumen de la solución madre

C_E: Concentración deseada de estándar

V_E: Volumen a preparar del estándar

Ejemplo

$$V_{SM} = \frac{C_E * V_E}{C_{SM}}$$

$$V_{SM} = \frac{20.59 \mu\text{mol} * 10 \text{ mL}}{1029.73 \mu\text{mol}}$$

VSM = 0.2 ml de solución madre

Se debe tomar 0.2 mL de solución madre y llevar a un aforo de 10 mL con agua destilada, el mismo procedimiento se siguió con los demás estándares.

Tabla D.1: Estándares de Trolox.

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (μmol/L)	Absorbancias
E1	0.2	10	20.59	0.104
E2	1	10	102.97	0.243
E3	2	10	205.95	0.471
E4	3	10	308.92	0.713
E5	4	10	411.89	0.926
E6	5	10	514.87	1.107
E7	6	10	617.84	1.239
E8	7	10	720.81	1.472
E9	8	10	823.79	1.570

Elaboración: El autor.

3. Curva de calibración

Se construyó la curva de calibración con los estándares de trolox de la tabla D.1.

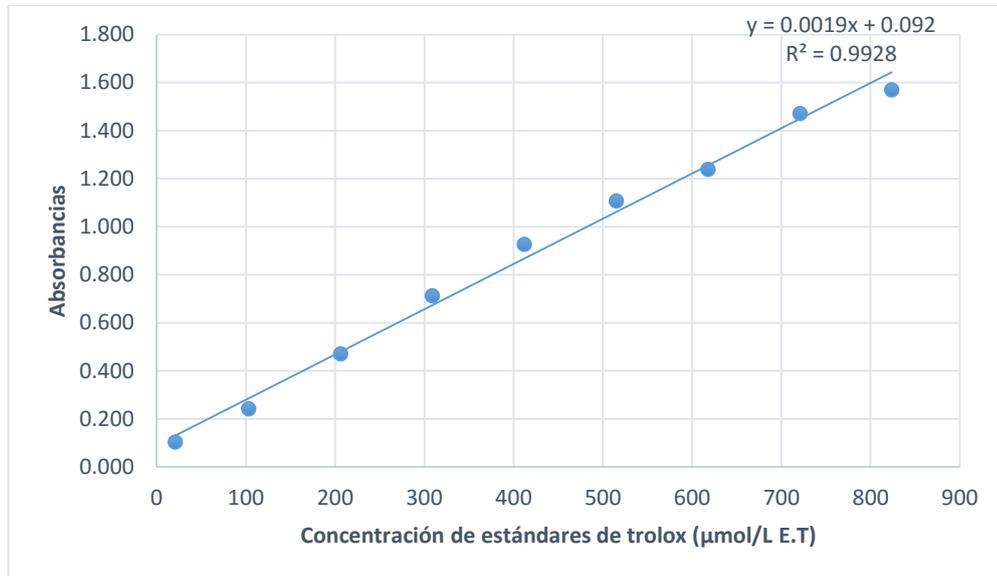


Figura D.1: Curva de calibración de FRAP

Elaboración: El autor

Pendiente	0.0019 L/μmol E.T
Intersección	0.092
R²	0.9928

4. Capacidad antioxidante de los extractos por medio del método FRAP

Ejemplo con el primer valor de la tabla D.2

De acuerdo a la ecuación de la recta se calculó la concentración del contenido fenólico en los extractos

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

Se despeja la fórmula

$$y = 0.0019 x + 0.092$$

$$x = \frac{0.2849 - 0.092}{0.0019 \frac{\text{L}}{\mu\text{mol}} \text{ E. T}}$$

$$x = 102 \mu\text{mol E. T/L}$$

Se multiplica por el factor de dilución en este caso es 10

$$x = 102 \mu\text{mol E. T/L} * 10$$

$$x = 1020.23 \mu\text{mol E. T/L}$$

Como la extracción se llevó a cabo con un volumen de 20 mL de solvente, se calcula la concentración en el mismo volumen

$$1020.23 \mu\text{mol E. T} \text{ ----- } 1000 \text{ mL}$$

$$X \text{----- } 20 \text{ mL (Volumen extracto)}$$

$$X = 20.40 \mu\text{mol E. T}$$

Se calcula la concentración de acuerdo al peso real tomado para el proceso de extracción.

$$20.40 \text{ mg} \text{ ----- } 1.02 \text{ g (peso de muestra)}$$

$$X \text{----- } 1 \text{ g}$$

Concentración = 20 $\mu\text{mol E.T/ g de b.s}$

Tabla D.2: Capacidad antioxidante de los extractos por medio del método FRAP.

Muestra #	Peso muestra (g)	Absorbancia	Solvente (v/v)	T (°C)	(y+b)/m	F.D	* FD	µmol E.T/1g muestra (20mL)	µmol E.T/1 g b.s	Promedio µmol E.T/1 g b.s
1	1.02	0.2840	100% ETANOL	20 °C	102	10	1020	20.40	20.00	20
2	1.01	0.2880			104	10	1041	20.83	20.62	
3	1.03	0.2750			972	10	972	19.44	18.88	
4	1.02	0.8410	50%:50% AGUA:ETANOL		398	20	7959	159.18	156.05	155
5	1.01	0.8260			390	20	7800	155.99	154.44	
6	1.02	0.8390			397	20	7938	158.75	155.64	
7	1.03	0.3310	100% AGUA		127	10	1270	25.39	24.65	25
8	1.01	0.3270			125	10	1249	24.97	24.72	
9	1.01	0.3420			133	10	1328	26.56	26.30	
10	1.03	0.4240	100% ETANOL	40 °C	176	10	1764	35.28	34.25	35
11	1.02	0.4060			166	10	1668	33.36	32.71	
12	1.03	0.4570			193	10	1939	38.78	37.65	
13	1.02	0.8580	50%:50% AGUA:ETANOL		407	20	8140	162.79	159.60	158
14	1.02	0.8360			395	20	7906	158.11	155.01	
15	1.03	0.8600			408	20	8160	163.21	158.46	
16	1.03	0.3620	100% AGUA		143	10	1435	28.69	27.85	28
17	1.02	0.3510			137	10	1376	27.52	26.98	
18	1.02	0.3610			142	10	1429	28.58	28.02	
19	1.01	0.5040	100% ETANOL	60 °C	218	10	2189	43.78	43.34	43
20	1.01	0.4950			214	10	2141	42.82	42.40	
21	1.03	0.5120			223	10	2231	44.63	43.33	
22	1.01	1.0015	50%:50% AGUA:ETANOL		483	20	9664	193.28	191.37	190
23	1.02	1.0053			485	20	9704	194.096	190.29	
24	1.03	1.0036			484	20	9687	193.73	188.09	
25	1.02	0.4980	100% AGUA		215	10	2157	43.14	42.29	41
26	1.01	0.4550			192	10	1929	38.57	38.19	
27	1.03	0.4910			212	10	2120	42.40	41.16	

Elaboración: El autor

ANEXO E: Capacidad antioxidante mediante el método DPPH.

1. Preparación de estándares y solución madre de trolox para DPPH.

- Solución madre de trolox

Para conocer la concentración de la solución madre Trolox (0.0125 mg aforados a 50 mL de metanol), se calculó:

PM. Trolox	250.29 g/mol
Volumen deseado	50 mL
Masa	0.0125 g

$$\begin{array}{l} 250.29 \text{ g} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \\ 0.0125 \text{ g} \text{ ----- } 50 \text{ mL} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = \frac{250.29 \text{ g} * 1 \text{ mol} * 1000 \text{ mL}}{0.0125 \text{ g} * 50 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración Trolox} = 0.000998 \text{ mol} = 998.84 \text{ } \mu\text{mol de trolox/L}$$

El reactivo de Trolox tiene una pureza de 97 % se realizó el ajuste de pureza

$$X = \frac{998.84 \text{ } \mu\text{mol} * 100 \%}{97 \%}$$

Concentración solución madre de Trolox = 1029.73 $\mu\text{mol de trolox/L}$

2. Preparación de estándares:

Se usó como ejemplo el primer valor de la tabla E.1 y se aplicó la siguiente fórmula

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

Donde:

C_{SM}: Concentración de la solución madre

V_{SM}: Volumen de la solución madre

C_E: Concentración deseada de estándar

V_E: Volumen a preparar del estándar

Ejemplo

$$V_{SM} = \frac{C_E * V_E}{C_{SM}}$$

$$V_{SM} = \frac{20.59 \mu\text{mol} * 10 \text{ mL}}{1029.73 \mu\text{mol}}$$

VSM = 0.2 ml de solución madre

Se tomó 0.2 mL de solución madre y aforó a 10 mL con agua destilada, el mismo procedimiento se usó para los demás estándares.

Tabla E.1: Estándares de trolox para DPPH.

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (μmol/L)	Absorbancias
E1	0.20	10	20.59	0.876
E2	1.00	10	102.97	0.785
E3	2.00	10	205.95	0.699
E4	3.00	10	308.92	0.573
E5	4.00	10	411.89	0.462
E6	5.00	10	514.87	0.370
E7	6.00	10	617.84	0.248
E8	7.00	10	720.81	0.115
E9	8.00	10	823.79	0.096

Elaboración: El autor.

3. Curva de calibración para DPPH

Se construyó la curva de calibración con los valores de la tabla E.1.

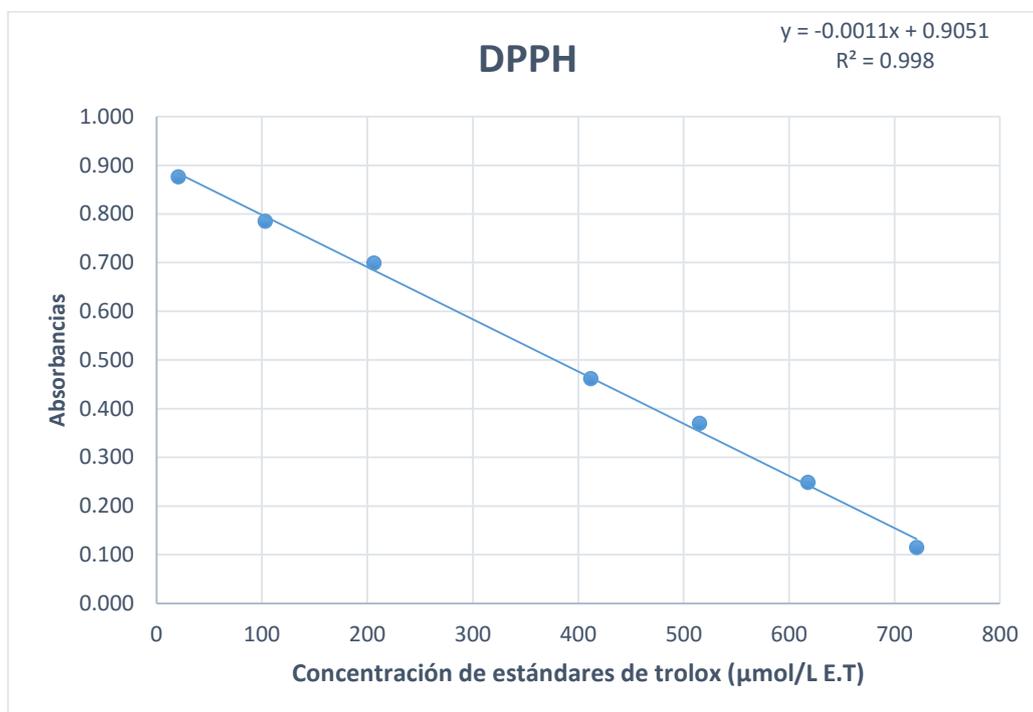


Figura E.1: Curva de calibración para DPPH

Elaboración: El autor

Pendiente	-0.0011 L/µmol E.T
Intersección	0.9051
R²	0.998

4. Capacidad antioxidante de los extractos por medio del método DPPH

Se usó como ejemplo el primer valor de la tabla del E.2.

De acuerdo a la ecuación de la recta se calcula la concentración del contenido fenólico en los extractos

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

se despejó en la fórmula

$$y = - 0.0011 x + 0.9051$$

$$x = \frac{0.203 - 0.9051}{- 0.0011 \frac{\text{L}}{\mu\text{mol}} \text{ E. T}}$$

$$x = 655 \mu\text{mol E. T/L}$$

Se multiplicó por el factor de dilución.

$$x = 655 * \text{F.D}$$

$$x = 655 * 1$$

$$x = 655 \mu\text{mol E. T/L}$$

Como la extracción se llevó a cabo con un volumen de 20 mL de solvente. se calculó la concentración en el mismo volumen

$$655 \mu\text{mol E. T/L} \text{ ----- } 1000 \text{ mL}$$

$$X \text{----- } 20 \text{ mL (Volumen extracto)}$$

$$X = 13.10 \mu\text{mol E. T/g b.s}$$

Se calculó la concentración de acuerdo al peso real tomado para el proceso de extracción.

$$13.10 \mu\text{mol E. T} \text{ ----- } 1.02 \text{ g (peso de muestra)}$$

$$X \text{----- } 1 \text{ g}$$

$$\mathbf{X = 12.84 \mu\text{mol E. T/de b.s}}$$

Tabla E.2: Capacidad antioxidante de los extractos de acuerdo al método DPPH.

Muestra #	Peso muestra (g)	Absorbancia	Solvente (v/v)	T (°C)	(y+b)/m	F.D	* F.D	µmol E.T/1g muestra (20mL)	µmol E.T/1 g b.s	Promedio (µmol E.T/1 g b.s)
1	1.02	0.203	100% ETANOL	20°C	655	1	655	13	13	13
2	1.01	0.210			648	1	648	13	13	
3	1.03	0.207			651	1	651	13	13	
4	1.02	0.453	50%:50% AGUA:ETANOL		422	20	8436	169	165	163
5	1.01	0.473			403	20	8063	161	160	
6	1.02	0.455			419	20	8399	168	165	
7	1.03	0.178	100% AGUA		678	1	678	14	13	13
8	1.01	0.174			682	1	682	14	14	
9	1.01	0.175			681	1	681	14	13	
10	1.03	0.739	100% ETANOL	40°C	155	10	1550	31	30	28
11	1.02	0.764			132	10	1316	26	26	
12	1.03	0.757			138	10	1382	28	27	
13	1.02	0.380	50%:50% AGUA:ETANOL		490	20	9798	196	192	198
14	1.02	0.355			513	20	10264	205	201	
15	1.03	0.348			520	20	10395	208	202	
16	1.03	0.168	100% AGUA		688	1	688	14	13	14
17	1.02	0.159			696	1	696	14	14	
18	1.02	0.152			702	1	702	14	14	
19	1.01	0.696	100% ETANOL	60°C	195	10	1951	39	39	35
20	1.01	0.714			178	10	1783	36	35	
21	1.03	0.730			163	10	1634	33	32	
22	1.01	0.339	50%:50% AGUA:ETANOL		528	20	10563	211	209	220
23	1.02	0.291			573	20	11459	229	225	
24	1.03	0.282			581	20	11627	233	226	
25	1.02	0.617	100% AGUA		269	10	2688	54	53	50
26	1.01	0.628			259	10	2585	52	51	
27	1.03	0.645			243	10	2427	49	47	

Elaboración: El autor

ANEXO F: Determinación del método I_{c50} y AAI.

1. Concentraciones de cada extracto

Se seleccionaron los extractos con mayor capacidad antioxidante que corresponden a la muestra 22, 23 y 24. Se usó como ejemplo el primer valor de la tabla F.2, en donde se determina la concentración inicial de cada extracto mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = \left(\frac{\text{P final} - \text{P vacío}}{\text{P alícuota}} \right)$$

Se reemplazó en la ecuación

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = \left(\frac{10.073 \text{ g} - 10.045 \text{ g}}{2 \text{ mL}} \right)$$

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = 0.01425 \frac{\text{g de extracto}}{\text{mL}} * 1000000 \frac{\mu\text{g}}{1\text{g}}$$

$$\text{Concentración } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 14250 \frac{\mu\text{g de extracto}}{\text{ml}}$$

Tabla F.2: Concentración de los extractos con mejor capacidad antioxidante.

Muestra #	Peso muestra (g)	Solvente (v/v)	T (°C)	Alícuota (mL)	Vial vacío desecado a 3 h (g)	Vial + muestra a 6 h (g)	Diferencia (g)	Concentración (μg de extracto/mL)
22	1.01	50%:50% AGUA:ETANOL		2	10.045	10.073	0.02850	14250
23	1.02			2	10.013	10.046	0.03377	16885
24	1.03			2	10.045	10.078	0.03331	16655

Elaboración: El autor.

2. Porcentaje de inhibición de DPPH y concentración de muestras diluidas, provenientes de las muestras 22, 23, 24 tratadas con etanol-agua 50/50 (v/v) a 60 °C.

Como ejemplo se usó el extracto 22 el cual tiene una concentración de 14250 $\mu\text{g/mL}$ (tabla E.2), a partir de esta concentración se calculó la concentración de las diluciones, con la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

De donde:

C₁: Concentración calculada

V₁: Volumen total de la dilución del extracto

C₂: Concentración del extracto

V₂: Volumen tomado del extracto, para su dilución

Como ejemplo se usó el segundo valor de la tabla F.3:

$$C_1 = \frac{C_2V_2}{V_1}$$

$$C_1 = \frac{7125 \mu\text{g de extracto/mL} * 1 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}$$

$$C_1 = 3563 \frac{\mu\text{g de extracto}}{\text{ml}}$$

Seguidamente se realizó el ajuste de volumen a la concentración calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Ajuste de Volumen} = \text{Concentración} * \frac{0.09 \text{ mL (alícuota de muestra)}}{3.6 \text{ mL (Solución de Trabajo)}}$$

$$\text{Ajuste de Volumen} = 3563 \frac{\mu\text{g de extracto}}{\text{ml}} * \frac{0.09 \text{ mL (alícuota de muestra)}}{3.6 \text{ mL (Solución de Trabajo)}}$$

$$\text{Concentración de la dilución 1} = 89.063 \frac{\mu\text{g de extracto}}{\text{ml}}$$

3. Porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras diluidas

Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs } 0 - \text{Abs } 1}{\text{Abs } 0} * 100$$

Donde:

Abs 0: Absorbancia de la solución de trabajo (0.631)

Abs 1: Absorbancia de la muestra

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{0.631 - 0.259}{0.631} * 100$$

% Inhibición = 59 %

Tabla F.3: Concentración y porcentaje de inhibición de las muestras diluidas.

Muestra	Dilución	Peso muestra (g)	Concentración de extracto diluido ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración calculada del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	Abs 30 min	Abs 60 min	Abs 90 min	Abs 150 min	Abs 210 min	Abs 270 min	% Inhibición
22	1	1.01	7125	178.125	0.131	0.121	0.105	0.104	0.104	0.102	-
	2	1.01	3563	89.063	0.108	0.075	0.072	0.072	0.072	0.072	89
	3	1.01	1781	44.531	0.379	0.334	0.308	0.268	0.259	0.259	59
	4	1.01	891	22.266	0.485	0.472	0.454	0.435	0.435	0.433	31
	5	1.01	445	11.133	0.553	0.545	0.521	0.513	0.499	0.498	21
	6	1.01	223	5.566	0.579	0.578	0.553	0.543	0.543	0.543	14
	7	1.01	111	2.783	0.595	0.584	0.577	0.565	0.565	0.563	11
23	1	1.02	8443	211.063	0.11	0.096	0.092	0.092	0.093	0.091	.
	2	1.02	4221	105.531	0.115	0.094	0.085	0.084	0.083	0.083	87
	3	1.02	2111	52.766	0.368	0.347	0.319	0.275	0.265	0.264	58
	4	1.02	1055	26.383	0.487	0.471	0.454	0.437	0.435	0.435	31
	5	1.02	528	13.191	0.533	0.522	0.494	0.494	0.493	0.492	22
	6	1.02	264	6.596	0.577	0.56	0.562	0.56	0.558	0.556	12
	7	1.02	132	3.298	0.606	0.582	0.577	0.571	0.569	0.566	10
24	1	1.03	8328	208.188	0.137	0.123	0.113	0.095	0.094	0.092	.
	2	1.03	4164	104.094	0.127	0.105	0.086	0.08	0.08	0.079	87
	3	1.03	2082	52.047	0.374	0.352	0.326	0.305	0.298	0.298	53
	4	1.03	1041	26.023	0.475	0.443	0.438	0.433	0.432	0.432	32
	5	1.03	520	13.012	0.543	0.543	0.515	0.502	0.5	0.498	21
	6	1.03	260	6.506	0.574	0.564	0.562	0.56	0.556	0.554	12
	7	1.03	130	3.253	0.58	0.578	0.577	0.577	0.576	0.575	9

Elaboración: El autor

4. Obtención del parámetro IC₅₀

Para calcular el valor de IC₅₀, se realizó gráficamente, construyendo una curva polinómica con las concentraciones calculada del extracto en $\mu\text{g/ml}$ en el eje de X, y en el eje Y el % de inhibición de DPPH (tabla E.3). Como se trabajó por triplicado se obtuvo tres muestras (22, 23, 24) las cuales fueron tratadas con EtOH-H₂O (50/50, v/v), ya que este fue el óptimo tratamiento. A continuación, se tiene el ejemplo con la muestra 22.

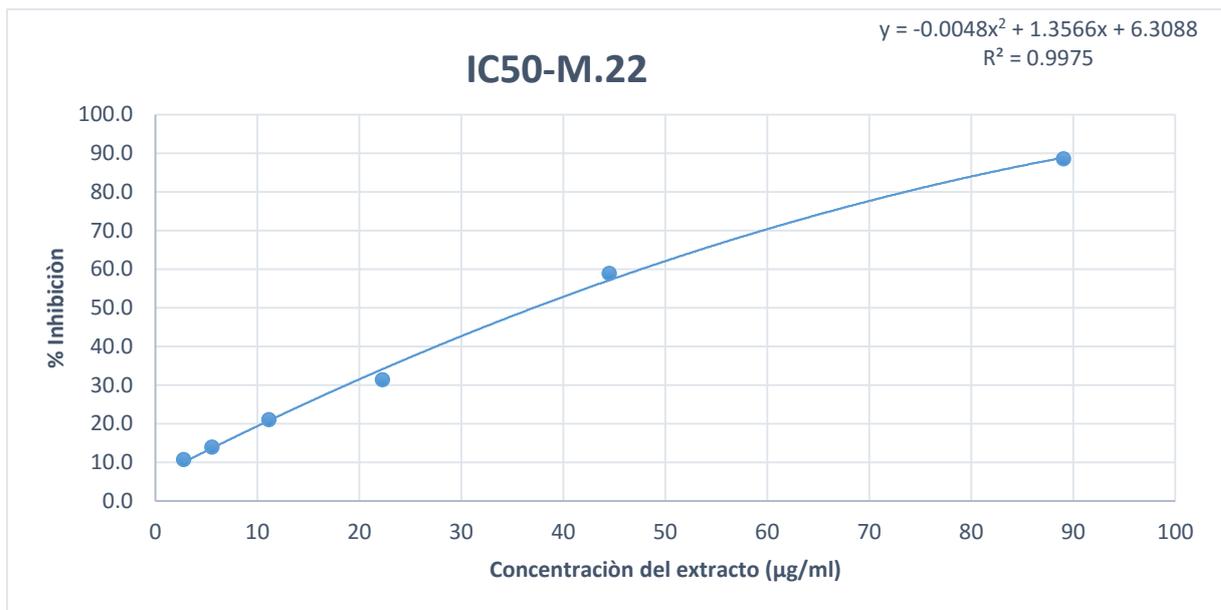


Figura E.2: IC₅₀ de la muestra 22.

Elaboración: El autor.

a	-0.0048 (mL/µg) ² *%
b	1.3566 (mL/µg)*%
c	6.3088 %

De la gráfica se obtuvo una ecuación polinómica

$$y = ax^2 + bx + c$$

Se reemplaza e iguala la ecuación, donde (y) equivale a 50, por la concentración necesaria para disminuir DPPH en un 50%.

$$50 = -0.0048 x^2 + 1.3566 x + 6.3088$$

$$0.0048 x^2 - 1.3566 x - 44 = 0$$

Se reemplazó los valores en una ecuación cuadrática

$$X = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$IC50 = \frac{1.3566 - \sqrt{(-1.3566)^2 - 4(0.0048 * -44)}}{2 * 0.0048}$$

$$IC50 = 29.19 \mu\text{g/ml}$$

5. Determinación de AAI, se obtuvo mediante la siguiente fórmula

$$AAI = \frac{\text{Concentración DPPH en To (Solución de Trabajo)}}{IC50(\mu\text{g/ml})}$$

Se partió del peso del DPPH usado para la preparación de la solución de trabajo sobre el volumen de aforo (25 mL de etanol)

$$5.9148 \text{ mg de DPPH} \text{ ----- } 25 \text{ mL}$$

$$X \text{-----} 1 \text{ mL}$$
$$X = 0.236 \text{ mg de DPPH/mL}$$

Se dividió por el F.D (10)

$$0.236 \text{ mg de DPPH} / 10 = 0.0236 \text{ mg de DPPH/mL}$$

$$0.0236 \text{ mg de DPPH} * 1000 = 23.659 \mu\text{g de DPPH/mL}$$

Se calcula el ajuste de volumen:

$$\text{Ajuste de Volumen} = \text{Concentración} * \frac{3.51 \text{ mL (volumen de solución de trabajo)}}{3.6 \text{ mL (Volumen de reacción)}}$$

$$\text{Ajuste de Volumen} = 23.659 \mu\text{g de DPPH/mL} * \frac{3.51 \text{ mL (volumen de solución de trabajo)}}{3.6 \text{ mL (Volumen de reacción)}}$$

$$\text{Concentración de solución de DPPH en tiempo cero} = 23.06 \mu\text{g de DPPH/ml}$$

Se reemplaza en la fórmula.

$$AAI = \frac{23.06 \mu\text{g de DPPH/mL}}{29.19 \mu\text{g de DPPH/mL}}$$

$$AAI = 0.79$$

Tabla F.2: Resultados de IC₅₀ y AAI

EXTRACTO	TRATAMIENTO CON SOLVENTE	TEMPERATURA	IC ₅₀ (μg/mL)	AAI
22	Etanol/Agua (50:50)	60 ° C	29.19	0.79
23	Etanol/Agua (50:50)	60 ° C	34.32	0.67
24	Etanol/Agua (50:50)	60 ° C	38.89	0.59
PROMEDIO			34.13	0.68

Elaboración: El autor.

ANEXO G: Análisis estadístico

ANOVA unidireccional: FT vs. Codificación

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Condiciones	8	30891584	3861448	152.25	0.000
Error	18	456514	25362		
Total	26	31348098			

S = 159.3 R-cuad. = 98.54% R-cuad. (ajustado) = 97.90%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Condiciones	N	Media	Agrupación
50%:50% AGUA:ETANOL - 40°C	3	3113.0	A
50%:50% AGUA:ETANOL - 60°C	3	3083.9	A
50%:50% AGUA:ETANOL - 20°C	3	2840.7	A
100% AGUA - 60°C	3	2058.7	B
100% AGUA - 40°C	3	1322.9	C
100% ETANOL - 60°C	3	1024.0	C
100% AGUA - 20°C	3	932.6	C
100% ETANOL - 40°C	3	402.1	D
100% ETANOL - 20°C	3	254.0	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Condiciones

ANOVA unidireccional: DPPH vs. Codificación

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Condiciones	8	178468.3	22308.5	1328.65	0.000
Error	18	302.2	16.8		
Total	26	178770.5			

S = 4.098 R-cuad. = 99.83% R-cuad. (ajustado) = 99.76%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Condiciones	N	Media	Agrupación
50%:50% AGUA:ETANOL - 60°C	3	219.87	A
50%:50% AGUA:ETANOL - 40°C	3	198.41	B
50%:50% AGUA:ETANOL - 20°C	3	163.25	C
100% AGUA - 60°C	3	50.34	D
100% ETANOL - 60°C	3	35.22	E
100% ETANOL - 40°C	3	27.58	E
100% AGUA - 40°C	3	13.59	F
100% AGUA - 20°C	3	13.39	F
100% ETANOL - 20°C	3	12.78	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Condiciones

ANOVA unidireccional: FRAP vs. Codficiación

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Condiciones	8	114147.5	14268.4	5747.89	0.000
Error	18	44.7	2.5		
Total	26	114192.2			

S = 1.576 R-cuad. = 99.96% R-cuad. (ajustado) = 99.94%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Condiciones	N	Media	Agrupación
50%:50% AGUA:ETANOL - 60°C	3	189.92	A
50%:50% AGUA:ETANOL - 40°C	3	157.69	B
50%:50% AGUA:ETANOL - 20°C	3	155.38	B
100% ETANOL - 60°C	3	43.03	C
100% AGUA - 60°C	3	40.55	C
100% ETANOL - 40°C	3	34.87	D
100% AGUA - 40°C	3	27.62	E
100% AGUA - 20°C	3	25.23	E
100% ETANOL - 20°C	3	19.84	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Condiciones

