

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E**  
**INGENIERÍA DE ALIMENTOS**



**“DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CLOROGÉNICO Y CAFEICO, CAFEÍNA,  
POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES  
VARIETADES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)”**

**TESIS**

**Para optar el título de:**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Presentado por:**

**MARIALENA DEL ROCÍO FÉLIX ZAMORA**

**Tingo María - Perú**

**2009**

F60

F35

Félix Zamora, Marialena del Rocío

Determinación de Ácidos Clorogénico y Cafeico, Cafeína, Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante de Tres Variedades de Café (*Coffea arabica L.*). Tingo María, 2009

82 h.; 22 cuadros; 17 fgrs.; 61 ref.; 30 cm.

Tesis ( Ing. Industrias Alimentarias ) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María ( Perú ). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias

COFFEA ARABICA L / CAFÉ ANTIOXIDANTE /ÁCIDO CLOROGÉNICO  
Y CAFEICO / CAFEÍNA / POLIFENOLES TOTALES / VARIEDADES  
TINGO MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**Tingo María**  
**FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156  
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

---

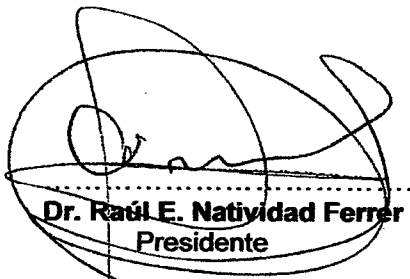
**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 24 de Abril de 2009, a horas 6:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentada por la Bach. **FÉLIX ZAMORA, Marialena del Rocío**, titulada:

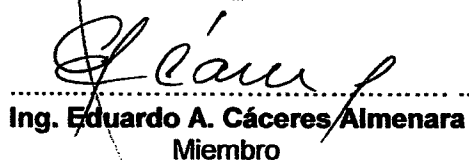
**“DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CLOROGÉNICO Y CAFEICO, CAFEÍNA, POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES VARIEDADES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)”**

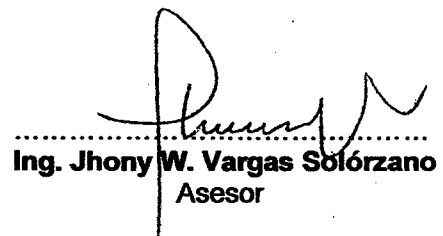
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **MUY BUENO**, en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 24 de Abril de 2009

  
.....  
**Dr. Raúl E. Natividad Ferrer**  
Presidente

  
.....  
**Ing. Yolanda J. Ramírez Trujillo**  
Miembro

  
.....  
**Ing. Eduardo A. Cáceres Almenara**  
Miembro

  
.....  
**Ing. Jhony W. Vargas Solórzano**  
Asesor

## **DEDICATORIA**

**A Dios,**

por ser mi guía incondicional, por estar siempre a mi lado  
y nunca abandonarme en los momentos  
más difíciles.

**A mis padres Ritmand y Delia,**

por su cariño, comprensión y el apoyo innegable durante  
todos los años de mis estudios.

**A mi amada madre Delia,**

por todo su amor y constante apoyo durante todo el  
camino de mi vida y por confiar en mí, a pesar de la distancia.

**A mis queridas hermanas: Yenny, Jessy, Jhade y Yashirita,**

por acompañarme durante todo el camino de mi vida  
y animarme a seguir adelante.

**A Marco,**

por su constante cariño, su apoyo intelectual,  
su comprensión en todo momento y su sencillez.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero dar gracias a Dios por la fortaleza que me ha dado a través de todo el camino que he recorrido y permitirme realizar una de mis metas anheladas, a todas las personas que de alguna manera u otra, formaron parte de esta investigación, de manera especial:

Al Ing° **JHONY VARGAS SOLÓRZANO**; asesor, por su incalculable aporte intelectual compartida en todo momento en la investigación.

Al Ph.D. **MANUEL SANDOVAL CHACÓN**; quien compartió su sabiduría intelectual y fue guía del presente trabajo de investigación.

A la Ing° **VANESSA MELCHOR SANDOVAL**; por la orientación y enseñanza en el presente trabajo de investigación.

Al Ing° **JUAN VILLANUEVA TIBURCIO**; por compartir sus conocimientos intelectuales.

A la Blga. **NYDIA ELESPURU**; por la gran amistad brindada, por su apoyo desinteresado y su paciencia.

A la Ing° **YOLANDA RAMÍREZ TRUJILLO**; por su apoyo en la redacción.

A la Sra. **DIANA**; por la paciencia y la gran ayuda brindada.

Al personal de laboratorio de la Universidad Nacional Agraria de la Selva por las facilidades brindadas en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, por las facilidades para tener acceso a su planta.

A los bach. **Karem y Elaine García Villegas, Marco Usquiano Saavedra, Manuel Mariñas Pérez, Victor Quintana Loya, Zandra Valencia Delgado, Oscar Sulca Tanta, Helmut Calvay Verastegui, Daniza Domínguez Rengifo, Lidia Morales, Henry Revilla, Justo Carrión Roque, Félix Coaricona Chura, Johan Vela Romero, Heber Cornelio**; con quienes compartimos momentos gratos en la ejecución de nuestro trabajo de investigación.

A mi gran amiga **Gisela Gamonal Ramírez**, por permitirme compartir una linda amistad en todos estos años.

## ÍNDICE GENERAL

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Coffea arabica</i> L.....	3
2.1.1 Origen .....	3
2.1.2 Descripción botánica.....	3
2.1.3 Clasificación taxonómica.....	4
2.1.4 Composición química del café verde oro .....	5
2.2 VARIEDADES DE <i>Coffea arabica</i> L. ....	6
2.2.1 Variedad Caturra.....	6
2.2.2 Variedad Bourbon .....	7
2.2.3 Variedad Typica .....	7
2.3 COSECHA Y POS COSECHA .....	8
2.3.1 Despulpado.....	9
2.3.2 Fermentación .....	9
2.3.3 Lavado .....	9
2.3.4 Secado.....	10
2.3.5 Almacenamiento .....	10
2.4 TOSTADO.....	12
2.5 ÁCIDOS CLOROGÉNICO Y CAFEICO.....	15
2.6 CAFEÍNA.....	16
2.7 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES .....	18

2.7.1 Radicales libres.....	18
2.7.2 Antioxidantes .....	21
2.8 COMPUESTOS FENÓLICOS .....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN .....	25
3.2 MATERIA PRIMA .....	25
3.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS .....	26
3.3.1 Equipos de laboratorio .....	26
3.3.2 Materiales de laboratorio.....	27
3.3.3 Reactivos .....	28
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	29
3.4.1 Cuantificación de ácido clorogénico y ácido cafeico .....	29
3.4.2 Cuantificación de cafeína.....	29
3.4.3 Cuantificación de polifenoles totales.....	29
3.4.4 Evaluación de la actividad antioxidante .....	29
3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	30
3.5.1 Obtención del café verde oro .....	30
3.5.2 Obtención de los granos de café tostado.....	30
3.5.3 Preparación de la solución stock .....	33
3.5.4 Cuantificación de ácido clorogénico y ácido cafeico .....	33
3.5.5 Cuantificación de cafeína.....	34
3.5.6 Cuantificación de polifenoles totales.....	34
3.5.7 Evaluación de la actividad antioxidante .....	35



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
4.1 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO (5-ACQ).....	38
4.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CAFEICO .....	45
4.3 CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA.....	49
4.4 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....	54
4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE AL RADICAL DPPH .....	60
4.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE AL RADICAL PEROXILO.....	65
V. CONCLUSIONES .....	70
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO .....	82

## ÍNDICE DE CUADROS

Nº	Pag.
1	Composición química del café verde oro en base seca.....5
2	Composición química del café tostado en base seca..... 14
3	Radicales libres derivados del oxígeno..... 19
4	Otras especies de radicales libres.....20
5	Contenido de ácido clorogénico (mg/g m. s.) <sup>1</sup> por condición.....39
6	Contenido de ácido clorogénico (mg/g m. s.) <sup>1</sup> por variedad.....41
7	Contenido de ácido clorogénico en los tratamientos.....44
8	Contenido de ácido cafeico (mg/g m. s.) <sup>1</sup> por condición.....45
9	Contenido de ácido cafeico (mg/g m. s.) <sup>1</sup> por variedad.....47
10	Contenido de ácido cafeico en los tratamientos.....48
11	Contenido de cafeína (mg/g m. s.) <sup>1</sup> por condición.....49
12	Contenido de cafeína (mg/g m. s.) <sup>1</sup> por variedad.....51
13	Contenido de cafeína en los tratamientos.....53
14	Contenido de polifenoles totales (mg eq.CAT/g m. s.) <sup>1</sup> por condición.....55
15	Contenido de polifenoles totales (mg eq.CAT/g m. s.) <sup>1</sup> por variedad.....57
16	Contenido de polifenoles totales en los tratamientos.....59
17	Coeficiente de Inhibición IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup> por condición.....60
18	Coeficiente de Inhibición IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup> por variedad.....62
19	Coeficiente de Inhibición IC <sub>50</sub> de los tratamientos.....64
20	Coeficiente de Inhibición IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup> por condición.....65
21	Coeficiente de Inhibición IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup> por variedad.....67
22	Coeficiente de Inhibición IC <sub>50</sub> en los tratamientos.....69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Pag.
1. Flujograma del beneficio del café para vía seca y vía húmeda .....	11
2. Estructura química del ácido quínico, cafeico y clorogénico (5-ACQ) .....	16
3. Estructura química de la cafeína. ....	17
4. Flujograma para la obtención del café verde oro por vía húmeda. ....	31
5. Flujograma para la obtención del café tostado. ....	32
6. Contenido de ácido clorogénico de los extractos por condición. ....	39
7. Contenido de ácido clorogénico de los extractos por variedad. ....	41
8. Contenido de ácido cafeico de los extractos por condición. ....	46
9. Contenido de ácido cafeico de los extractos por variedad. ....	47
10. Contenido de cafeína de los extractos por condición. ....	50
11. Contenido de cafeína de los extractos por variedad. ....	51
12. Contenido de polifenoles de los extractos por condición. ....	55
13. Contenido de polifenoles de los extractos por variedad. ....	57
14. Coeficiente de inhibición de los extractos por condición. ....	61
15. Coeficiente de inhibición de los extractos por variedad. ....	63
16. Coeficiente de inhibición de los extractos por condición. ....	66
17. Coeficiente de inhibición de los extractos por variedad. ....	67

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Huánuco, Perú. Los objetivos fueron cuantificar el contenido de ácido clorogénico 5-ACQ, ácido cafeico y cafeína por HPLC, cuantificar el contenido de polifenoles totales y evaluar la actividad antioxidante empleando dos métodos *in Vitro*: DPPH y peroxilo en granos de tres variedades de café (Caturra rojo, Bourbon y Typica) verde oro y tostado de los campos de cultivo del caficultor Ezequiel Bravo Condezo, del caserío Simón Bolívar, distrito de Hermilio Valdizán, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, cultivado a 1300 m.s.n.m.

La determinación de ácido clorogénico 5-ACQ, ácido cafeico y cafeína se realizó por HPLC, para el ácido clorogénico 5-ACQ y ácido cafeico se cuantificó en un sistema de gradiente binario a una longitud de onda de 330 nm y para la cafeína se cuantificó a una longitud de onda de 270 nm, el volumen de inyección para las muestras de café y para los estándares fue de 20  $\mu$ l. Para la cuantificación de polifenoles totales se determinó mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu a una longitud de onda de 700 nm. La capacidad antioxidante se evaluó empleando dos métodos *in vitro*: DPPH y peroxilo, para el método DPPH las muestras de 25  $\mu$ l de muestra (30, 100 y 300  $\mu$ g/ml) fueron reaccionadas con 975  $\mu$ l de DPPH (100  $\mu$ M), la

absorbancia fue registrada cada 15 minutos a una longitud de onda de 515 nm. y para el método radical peroxilo las muestras de 10  $\mu$ l de muestra (10, 30 y 80  $\mu$ g/ml) se hicieron reaccionar con 990  $\mu$ l de reactivo peroxilo a una longitud de onda de 414 nm. La actividad antioxidante del café fue calculada por su capacidad de inhibir al radical DPPH y al radical peroxilo, y expresada en IC<sub>50</sub>.

La variedad Caturra verde oro presentó mayor contenido de ácido clorogénico 5-ACQ, ácido cafeico y cafeína (117,001  $\pm$  0,884; 5,890  $\pm$  0,076 y 22,355  $\pm$  0,181 mg/g m. s.) ( $p < 0,05$ ), las variedades Caturra y Bourbon verde oro presentaron mayor contenido de polifenoles totales (80,579  $\pm$  1,164 y 78,464  $\pm$  0,768 mg eq, CAT/g m. s.) ( $p < 0,05$ ), las variedades Bourbon y Typica verde oro presentaron mayor capacidad de inhibir al radical DPPH (140,946  $\pm$  0,4669 y 142,612  $\pm$  0,250  $\mu$ g/ml) ( $p < 0,05$ ) y las variedades Caturra, Bourbon y Typica tostado presentaron mayor capacidad de inhibir al radical peroxilo (34,981  $\pm$  0,3152, 34,863  $\pm$  0,3982 y 34,081  $\pm$  0,3648  $\mu$ g/ml) ( $p < 0,05$ ). El proceso de tostado reduce la capacidad antioxidante del café si se compara con la del café verde oro, debido a la pérdida de sus compuestos fenólicos y la formación de otros antioxidantes menos activos.

## SUMMARY

The present research work was done in the Center for Research on Amazonian Natural Products in the Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Huánuco, Perú. The objectives were to quantify the content of chlorogenic acid 5-ACQ, caffeic acid and caffeine for HPLC, to quantify the total amount of the polyphenols and to evaluate the antioxidant activity using two *in vitro* methods: DPPH and peroxilo in grains of three coffee varieties (red Caturra, Bourbon and Typica) green gold and roasted from fields of the caficultor Ezequiel Bravo Condezo, of the hamlet Simón Bolívar, Hermilio Valdizán's district, Leoncio Prado's province, Huánuco's department, cultivated 1300 m.s.n.m.

The determination of chlorogenic acid 5-ACQ, caffeic acid and caffeine was realized by HPLC, for the chlorogenic acid 5-ACQ and caffeic acid was quantified in a system of binary gradient to a wavelength of 330 nm and for the caffeine it was quantified to a wavelength of 270 nm, the volume of injection for the samples of coffee and for the standards was of 20  $\mu$ l. For the quantification of total polyphenols by the spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu to a wavelength of 700 nm. The antioxidant capacity was evaluated using two *in vitro* methods: DPPH and peroxilo, for the method DPPH the samples of 25  $\mu$ l of sample (30, 100 and 300  $\mu$ g/ml) were reacted by 975  $\mu$ l of DPPH (100  $\mu$ M), the absorbance was registered every 15 minutes to a

wavelength of 515 nm. and for the radical method peroxilo 10 ul of sample (10, 30 and 80 µg/ml) they made the samples of react with 990 µl of reagent peroxilo to a wavelength of 414 nm. The antioxidant activity of the coffee was calculated by its aptitude to disable the radical DPPH and the radical peroxilo, then expressed in IC<sub>50</sub>.

The variety Caturra - green gold have showed higher content of chlorogenic acid 5-ACQ, caffeic acid and caffeine (117,001 ± 0,884; 5,890 ± 0,076 and 22,355 ± 0,181 mg/g m. s.) (p<0,05), the varieties green Caturra and Bourbon showed higher content of total polyphenols (80,579 ± 1,164 and 78,464 ± 0,768 mg eq, CAT/g m. s.) (p<0,05), the varieties Bourbon and Typica presented major aptitude to disable the radical DPPH (140,946 ± 0,4669 and 142,612 ± 0,250 µg/ml) (p<0,05) and the varieties Caturra, Bourbon and brown Typica presented major aptitude to disable the radical peroxilo (34,981 ± 0,3152, 34,863 ± 0,3982 and 34,081 ± 0,3648 µg/ml) (p<0,05). The roasted process reduces the antioxidant capacity of coffee when compared to the green coffee gold, due to the loss of phenolic compounds and formation of other antioxidants less active.

## I. INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es un producto agrícolas de importancia en el mercado internacional y uno de los cultivos tropicales perennes con mayor área cultivada. En el Perú existen varios lugares de cultivo de café orgánico, entre los más importantes se encuentra la región Huánuco, provincia de Leoncio Prado, distrito de Hermilo Valdizán. En dicho distrito, predomina la siembra de variedades de porte bajo y alta productividad, como Caturra, y de porte alto como Typica y Bourbon, las cuales cubren más del 70 % del área cafetalera; el desarrollo y el manejo del café no termina con el procesamiento, es importante conocer cada una de las características del café verde y tostado, ya que la producción es muy competitiva y se hace necesario crear nuevas formas de comercialización.

El café tiene sustancias antioxidantes (FARAH y MARINO, 2006), además de la cafeína, tiene muchos otros compuestos bioactivos tales como los ácidos clorogénico y cafeico, entre cientos de otros formados en el café tostado. Los antioxidantes naturales constituidos por los polifenoles presentes en el café y otras plantas con alto contenido de polifenoles actúan como protectores de la salud humana previniendo enfermedades cardiovasculares y crónico degenerativas.



En tal sentido los objetivos del presente trabajo fueron:

- Cuantificar el contenido de ácido clorogénico, ácido cafeico y cafeína por HPLC en granos de tres variedades de café verde oro y tostado.
- Cuantificar el contenido de polifenoles totales en granos de tres variedades de café verde oro y tostado.
- Evaluar la actividad antioxidante en granos de tres variedades de café verde oro y tostado empleando dos métodos *in Vitro*: DPPH y peroxilo.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Coffea arabica* L.

#### 2.1.1 Origen

El lugar de origen del café arábico posiblemente sea Etiopía, país donde se inició su cultivo, una evidencia que corrobora esta hipótesis es que en las áreas montañosas de este país y áreas vecinas de Sudán actualmente el café Arábico crece en forma silvestre sobre los 1500 m.s.n.m.

La fecha de inicio de su cultivo se estima que fue a inicios del siglo VIII, luego por varios siglos (hasta el siglo XV) el cultivo se mantuvo como un monopolio de los árabes en las cercanías del mar Rojo, con una fuerte expansión hacia Yemen (ex Arabia del Sur) en el siglo XIV, y hacia el Oriente Medio durante el siglo XV (León, 2000; Anthony *et al.*, 1999 citados por CÁRDENAS, 2007).

#### 2.1.2 Descripción botánica

Arbusto leñoso, hasta de 7 metros de altura. Tallo delgado y recto. Hojas perennes, opuestas, lanceoladas. Flores sésiles, infundibuliformes, blancas, fragantes, reunidas en racimos axilares. Frutos en forma de drupas, las drupas poseen dos huesos que contienen una semilla cada uno. Cada semilla está provista de un pequeño embrión y de un albumen córneo (plano por un lado, convexo por el otro), con un pliegue ventral o surco. Esta envuelta

por una fina película plateada llamada tegumento (FONNEGRA y JIMÉNEZ, 2007).

La parte comestible está constituida por el albumen de la semilla. Los frutos se desarrollan muy lentamente (entre 6 y 8 meses como mínimo), de color primero verde, después amarillo y al final rojo en la madurez (ARVY *et al.*, 2007).

### 2.1.3 Clasificación taxonómica

El café pertenece a la familia *Rubiaceae*, en la cual se han identificado dos géneros: *Coffea* y *Psilanthus*. ALVARADO y ROJAS (1998), clasifican al café de la siguiente manera.

Reino	Plantae
División	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliata</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Especie (s)	<i>arabica, canephora, liberica, dewevrei</i>

### 2.1.4 Composición química del café verde oro

El café está compuesto por más de 1000 sustancias químicas distintas incluyendo aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, polisacáridos, azúcares, triglicéridos, ácido linoleico, diterpenos (cafestol y kahweol), ácidos volátiles (fórmico y acético) y no volátiles (láctico, tartárico, pirúvico, cítrico), compuestos fenólicos (ácido clorogénico), cafeína, sustancias volátiles (sobre 800 identificadas de las cuales 60-80 contribuyen al aroma del café), vitaminas, minerales (Spiller, 1998 citado por GOTTELAND y DE PABLO, 2007).

Cuadro 1. Composición química del café verde oro en base seca.

COMPONENTE	CAFÉ VERDE (%)
Cafeína	1,2
Trigonelina	1,0
Minerales	4,2
Ceniza	4,2
Ácido clorogénico total	6,5
Ácidos Alifáticos	1,0
Ácido quínico	0,4
Sacarosa	8,0
Azúcares reductores	0,1
Polisacáridos	44,0
Lignina	3,0
Pectina	2,0
Proteína	11,0
Aminoácidos libres	0,5
Lípidos	16,0

Fuente: Smith, 1989.

## 2.2 VARIEDADES DE *Coffea arabica* L.

Las variedades más conocidas son "Typica" y "Borbón" pero se han desarrollado de estas muchas cepas y cultivares diferentes, como Caturra (Brasil, Colombia), Mundo Novo (Brasil), Tico (Centro-América), el enano San Ramón y la Montaña Azul jamaicana (VARNAM *et al.*, 1996).

### 2.2.1 Variedad Caturra

La variedad Caturra es una mutación de la variedad Bourbon, descubierta en el estado de Minas Gerais, Brasil. Se describe como una planta de porte bajo, menor que Typica, de forma cilíndrica o redondeada y densamente frondosa; las hojas tiernas son de color verde claro pero las maduras son más grandes, anchas, redondeadas, con margen más ondulado y de una coloración más oscura (Zamarripa y Escamilla, 2002 citado por GUTIÉRREZ, 2004). El ángulo de las ramas jóvenes es semejante al del Typica y forma en promedio un ángulo de 66 grados con el tallo principal. El porte reducido de la variedad Caturra constituye una de sus grandes ventajas, ya que facilita la recolección (Bertrand *et al.*, 1997 citado por SANTACREO, 1999). Es una variedad de gran adaptación, alta producción y tolerancia al sol, aunque susceptible a plagas (Zamarripa y Escamilla, 2002 citado por GUTIÉRREZ, 2004).

### **2.2.2 Variedad Bourbón**

La variedad Bourbón, es una mutación de la variedad Typica, fue seleccionada inicialmente en el Brasil, se cree que vino de Abisinia y de la Isla Reunión, antes llamada Bourbón. Alcanza la misma altura que la variedad Typica, porte alto, de forma menos cónica. Ramificaciones secundarias más abundantes y bandolas más verticales que en el Typica, formando en promedio un ángulo de 58 grados con el tallo, entrenudos menos largos y mayor cantidad de axilas florales. Las hojas son más anchas y onduladas, así mismo el grano es más pequeño y redondo.

Es una variedad precoz en iniciar la producción con una maduración temprana y uniforme (Bertrand *et al.*, 1997 citado por SANTACREO, 1999).

### **2.2.3 Variedad Typica**

La variedad typica, comúnmente llamada criollo, indio o arábigo, es originaria de Etiopía, y se introdujo a América en 1915 (Zamarripa y Escamilla, 2002 citado por GUTIÉRREZ, 2004)

Su reconocimiento es muy fácil, ya que, a diferencia de otras variedades, los brotes nuevos de las hojas son de color bronceado. Se caracteriza por tener de 2 a 3 metros de altura, ramas primarias levemente caídas o de tendencia a ser horizontales, formando ángulos de 50 a 70 grados con el tallo, hojas elípticas y más alargadas que en otras variedades. Los granos son grandes y de forma alargada y la maduración es temprana y

uniforme (Bertrand *et al.*, 1997 citado por SANTACREO, 1999). Se considera una variedad de baja producción y de alta calidad (Zamarripa y Escamilla, 2002 citado por GUTIÉRREZ, 2004)

### **2.3 COSECHA Y POS COSECHA**

La cosecha se inicia cuando la cáscara del fruto ha tomado color de cereza. La tarea es delicada, por cuanto se debe tener cuidado de no dañar las hojas, los botones o cortar la fruta inmadura, pues existen diferencias significativas en la calidad de la bebida. El beneficio del café consiste en una serie de procedimientos que ayudan a liberar el café de los cuatro envoltorios que lo protegen: la cáscara de cereza o pulpa, el mucílago que envuelve los dos granos, el pergamino, y la fina película sedosa que protege el “grano oro” (WAGNER y VON ROTHKIRCH, 2001). El rendimiento que se obtiene al procesar el café es del 20% en peso. Una vez recolectado el grano de café se lleva a las centrales de beneficio o, como ocurre en muchos casos, son los mismos productores quienes realizan el beneficiado del café (IHCAFE, 2005).

Existen dos métodos de beneficiado del café, mediante vía seca (café natural) y mediante vía húmeda (café lavado) (Figura 1). El beneficiado en seco se suele emplear sobre todo en Brasil, y aun así tiende a sustituirse por el beneficiado en húmedo, debido a la menor calidad final del grano de café. El inconveniente que presenta el beneficiado en húmedo es la gran cantidad de agua que requiere.

A continuación se describen las diferentes etapas del beneficiado húmedo.

### **2.3.1 Despulpado**

El despulpado consiste en remover el epicarpio y parte del mesocarpio (pulpa) del fruto, con el fin de repropiciar una aceleración del proceso de descomposición del mucílago y evitar el manchado del café pergamino por dispersión de los pigmentos antociánicos presentes en el epicarpio del fruto. El despulpado del café maduro debe hacerse durante las primeras 8 horas luego de la cosecha. Este proceso se realiza a través del uso de una “despulpadora” con el objetivo de eliminar la pulpa de la cereza y dejar el grano al descubierto (ANACAFE, 1999).

### **2.3.2 Fermentación**

La fermentación consiste en depositar el café despulpado en pilas de fermentación con el objetivo de descomponer el mucílago (sustancias pépticas, azúcares reductores y no reductores, ácidos orgánicos) que quedó adherido al pergamino (NATIVIDAD *et al.*, 2007). La duración de esta operación depende de las temperaturas ambientales, estado de madurez del fruto y microorganismos presentes, por lo general, este proceso dura entre 12 - 48 horas (ANACAFE, 1999).

### **2.3.3 Lavado**

El lavado consiste en la inmersión y paso de los granos por una corriente de agua limpia, con el fin de eliminar los productos que resultan de la degradación del mucílago en la fase de fermentación (ANACAFE, 1999). El



café lavado o pergamino húmedo debe pasar de inmediato a la etapa de secado. Se debe evitar almacenar el pergamino húmedo o retardar el paso al proceso de secado (PUERTA, 1999).

#### **2.3.4 Secado**

El secado consiste en bajar el contenido de humedad presente (55% aproximadamente) en el pergamino húmedo de café hasta 12%. Esto con el fin de asegurar la conservación, impidiendo el desarrollo de mohos y bacterias durante el almacenamiento. La determinación de la humedad durante y al final del secado puede hacerse manualmente o con medidores de humedad (ANACAFE, 1999).

Existen dos formas de secado, a pleno sol o en secadores mecánicos con cámaras de combustión (ANACAFE, 1999). En el secado a pleno sol se debe evitar temperaturas superiores a 49 °C (*C. arabica* L.) para evitar la ruptura del pergamino protector o cambios en la composición química del grano (Wintgens, 2004 citado por CÁRDENAS, 2007).

#### **2.3.5 Almacenamiento**

Una vez seco el grano, o sea, con un contenido de 10 a 12% de humedad, puede almacenarse en pergamino o en oro, sin riesgo para su calidad. Este puede almacenarse en sacos, a granel o en silos (ALVARADO y ROJAS, 1998).

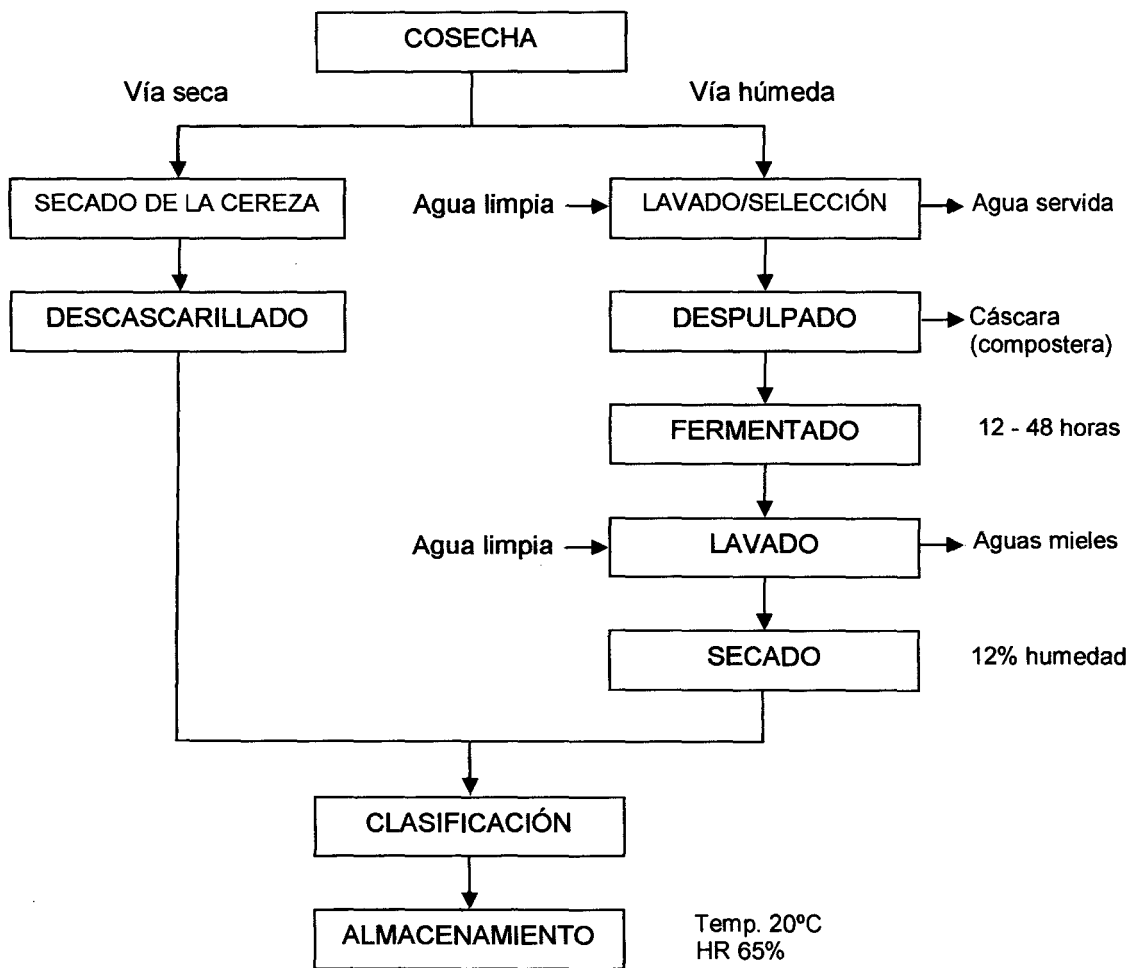


Figura 1. Flujograma del beneficio de café por vía seca y vía húmeda.

Fuente: Natividad, 2007.

## 2.4 TOSTADO

Es un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura, necesario para el desarrollo del sabor y aroma características de la bebida, durante el cual se producen en la zona térmica de 200 a 250 °C profundas transformaciones químicas en los granos de café verde, así como cambios físicos en su estructura (Mayer *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2002 citados por ROJAS, 2005).

Muchos cambios físicos y químicos complejos ocurren además del cambio obvio en color de verde al marrón. En la primera etapa del tueste, se pierde el agua libre; en la segunda ocurren reacciones químicas complejas, la deshidratación, la fragmentación, la recombinación, y la polimerización. Varios de estos cambios se asocian a la reacción de Maillard y conducen a la formación de compuestos de bajo peso molecular, tales como bióxido de carbono y agua libre, compuestos aromáticos y del sabor. Además, se generan materiales coloreados de alto peso molecular, solubles y parcialmente insolubles en agua (melanoidinas) (Parliment, 2000 citado por ROJAS, 2005).

Los mecanismos de la formación de los constituyentes volátiles presentes en el aroma del café son extremadamente complejos y hay claramente un grado amplio de interacción entre todas las rutas implicadas. Los principales mecanismos y cambios en la composición que ocurren durante el tostado. Según Illy y Viani (1995) y Fennema (2000), citados por ROJAS (2005), incluyen:

- Reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático entre sustancias con contenido de nitrógeno, aminoácidos y proteínas, pero también trigonelina, serotonina, y carbohidratos.

- Degradación de Strecker de aminoácidos (vía reacción de Maillard). Degradación de aminoácidos a aldehídos, amoníaco, y bióxido de carbono; por las desaminación y descarboxilación de un  $\alpha$ -aminoácido. Cada aminoácido produce su aldehído específico, con su aroma característico.

- Formación de compuestos de azufre de bajo peso molecular que contribuyen al sistema global del aroma. Ejemplo: el metional producido en la degradación de Strecker se descompone fácilmente dando metanotiol (metilmercaptano), que se oxida a disulfuro de dimetilo.

- Degradación de proteínas y aminoácidos individuales. Hay una destrucción de arginina, y pérdidas sustanciales de cisteina, lisina, metionina, serina y treonina. Degradación de aminoácidos azufrados.

- Degradación de trigonelina. Bajo las condiciones de acidez suave que prevalecen durante el tostado del café, la trigonelina se desmetila a ácido nicotínico, produciéndose un incremento de 30 veces en la concentración. Es también conocido, que la termólisis de la trigonelina genera piridinas, pirroles, y compuestos bicíclicos; además la descarboxilación de la trigonelina es otra fuente de bióxido de carbono generado durante el tueste.

- Degradación de azúcares. Azúcares no volátiles (pentosas, hexosas, disacáridos) son degradados por calentamiento para producir productos con aroma a caramelo, y color oscuro. Ejemplos de los aromáticos incluyen: Furanol, maltol, cicloteno, compuestos dicarbonilos como diacetilo.

- Degradación de lípidos. La autooxidación de ácidos grasos insaturados, principalmente los de cadena larga (C<sub>18</sub>) produce aldehídos insaturados.

- Degradación de ácidos fenólicos, particularmente de un segmento del ácido quínico.

La composición final de los compuestos volátiles del café tostado depende de varios factores. Éstos incluyen: la especie y variedad de café, condiciones climáticas y suelo durante el crecimiento, almacenamiento (después de la cosecha y tostado), tiempo y temperatura de tueste y por último el equipo utilizado para el tueste (Dark y Nursten, 1985 citado por ROJAS, 2005). En el cuadro 2, se muestra la composición química de los granos de café tostado.

Cuadro 2. Composición química del café tostado en base seca.

COMPONENTE	CAFÉ TOSTADO (%)
Cafeína	1,0
Trigonelina	0,5 - 1,0
Minerales	3,5 - 4,5
Ácido clorogénico total	1,2 - 2,3
Ácidos Alifáticos	1,0 - 1,5
Oligosacáridos	0 - 3,5
Polisacáridos totales	24,0 - 39,0
Proteína	13,0 - 15,0
Aminoácidos libres	No detectado
Lípidos	14,5 - 20,0

Fuente: Smith, 1989.

## 2.5 ÁCIDOS CLOROGÉNICO Y CAFEICO

Los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres, que derivan de la unión éster entre el ácido cafeico y el ácido quínico (Figura 2). Dentro de los ácidos clorogénicos más comunes se encuentran algunos monoesteres de ácido cafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, ácidos p-cumaroilquínicos y ácidos cafeoilferuloilquínicos siendo el 5-ACQ es de mayor cantidad en los granos de café. La bebida de café es una de las principales fuentes de ácido clorogénico de consumo diario. Su contenido varía en función de la especie entre el 6 - 8 % en base de la materia seca. Los ácidos clorogénicos se encuentran en la superficie del grano de café con la cera cuticular en el citoplasma adyacente a la pared celular del endosperma parénquimático. Se ha asociado a los ácidos clorogénicos con el sabor amargo y astringente de la bebida de café (FARAH y MARINO, 2006). La explicación más aceptada ante esta afirmación, es que durante el tostado del grano los ácidos clorogénicos sufren una hidrólisis que libera residuos de ácido quínico y compuestos fenólicos, responsables del incremento del sabor amargo en la bebida. También, se ha identificado que los ácidos clorogénicos pueden servir como inductores de resistencia a enfermedades como *Hemileia vastatrix Berk* y *Ceratocystis fimbriata* (GONZÁLEZ *et al.*, 1999).

El ácido cafeico, es un compuesto fenólico natural, (anteriormente llamado ácido carbónico), que se encuentra en muchas frutas, vegetales y hierbas, como el café, aunque en cantidades diferentes dependiendo de la planta. El ácido cafeico ha demostrado actuar como un inhibidor de

cancerígenos, también es conocido como un antioxidante *in Vitro* y también *in Vivo* (Olthof *et al.*, 2001 citado por GOTTELAND y DE PABLO, 2007).

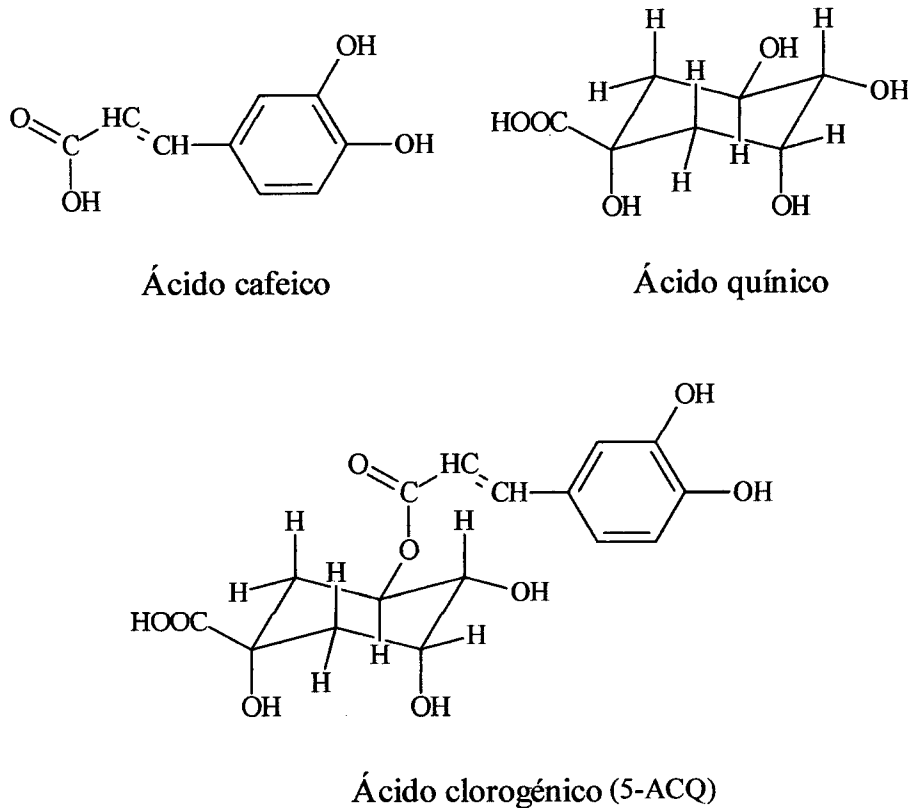


Figura 2. Estructura química del ácido quínico, cafeico y clorogénico (5-ACQ).

## 2.6 CAFEÍNA

La cafeína (figura 3) fue descubierta por un químico alemán Friedrich Ferdinand Runge, en 1819. Él acuñó el término "kaffein", un compuesto químico, que se convirtió en inglés caffeine (WEINBERG, 2001).

La cafeína (1,3,7 - trimetilxantina) es el compuesto característico del café, junto con la teofilina y la teobromina. Es el alcaloide responsable de

las propiedades estimulantes atribuidas al café. La cafeína se ha asociado principalmente al amargo de la bebida. Sin embargo, los resultados han sido diversos. Clifford (1987), menciona que no existe asociación real entre cafeína y amargo de bebida, ya que se ha encontrado persistencia en el amargo de la bebida en cafés descafeinados. Vaast y Bertrand (2005), en un estudio realizado en Nicaragua no encontró diferencias entre el contenido de cafeína de cafés de alta y baja calidad de taza. De forma similar, Avelino *et al.*, (2005) no encontró ninguna relación entre cafeína con el amargo y las demás características organolépticas de taza en la zona del Valle Central de Costa Rica (LARA, 2005)

La cafeína se encuentra en cantidades variables en los granos, hojas y frutos de algunas plantas, donde actúa como un pesticida natural que paraliza y mata a los insectos que se alimentan de algunas de las plantas (FRISCHKNECHT *et al.*, 1986). Un alto nivel de cafeína también se ha encontrado en el suelo que rodea las plantas del café (BAUMANN, 1984).

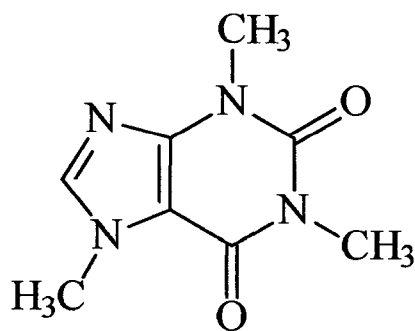


Figura 3. Estructura química de la cafeína.



## 2.7 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

### 2.7.1 Radicales libres

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies.

En el año de 1954, la Doctora Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez, que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de patologías (GARCÍA *et al.*, 2001).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula. El desbalance entre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno Reactivo (EROs) y la defensa antioxidante, provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (VILLANUEVA, 2003).

Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales

como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas (GARCÍA *et al.*, 2004). En los cuadros 3 y 4, se muestran algunas especies de radicales libres, causantes de muchos daños al organismo.

Cuadro 3. Radicales libres derivados del oxígeno.

Radical	Nombre	Características
$O_2$	Oxígeno molecular	A pesar de su carácter radicalario, es estable y moderadamente agresivo.
$O_2^-$	Anión superóxido	Otra variedad de oxígeno molecular que se forma a partir de $O_2$ normal por captura de un electrón.
$H_2O_2$	Peróxido de Hidrógeno	No es un radical, pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el fierro y cobre.
$HO^-$	Hidroxilo	Es el más reactivo y se ha relacionado con el daño sufrido directamente a las proteínas, membranas celulares, ADN y lípidos.
$ROO^-$	Peroxilo	Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos.
$ROOH$	Hidroperóxidos	Por ejemplo Lípido - OOH y Timina - OOH.

Fuente: Villanueva, 2003.

Cuadro 4. Otras especies de radicales libres.

Radical	Nombre	Características
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado directamente con la patología de varios desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer.
$\text{H}^\cdot$	Átomo de Hidrógeno	Es el radical libre más simple.
$\text{RS}^\cdot$	Tiol	Nombre general para un grupo de radicales con un electrón desapareado ubicado en el sulfuro.
$\text{RO}^\cdot$	Alcoxil	Radical ubicado en el oxígeno, formado durante el rompimiento de peróxidos orgánicos.
$\text{CCl}_3$	Triclorometil	Radical desapareado; el $\text{CCl}_3$ se forma durante el metabolismo de $\text{CCl}_4$ y contribuye al efecto tóxico de éste solvente.
$\text{NO}^\cdot$ y $\text{NO}_2^\cdot$	Óxidos de nitrógeno	Ambos son radicales libres; en $\text{NO}^\cdot$ se forma in vivo del aminoácido L-arginina. El $\text{NO}_2^\cdot$ se forma cuando el $\text{NO}^\cdot$ reacciona con el $\text{O}_2$ , así mismo es causado por la contaminación del aire y el humo, por la combustión de materiales orgánicos.

Fuente: Villanueva, 2003.

### 2.7.2 Antioxidantes

Se definen como aquellas sustancias que presentes en bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación (GARCÍA *et al.*, 2001; VELÁSQUEZ, 2004). Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre no toxico. Así cuando se incrementa la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar al ambiente redox intra o extracelular (VELÁSQUEZ, 2004).

Los procesos de antioxidantes incluyen: inhibición de radicales para prevenir su propagación, hidrólisis enzimática de enlaces ésteres para remover ácidos grasos peroxidados de lípidos, quelamiento de iones metálicos de transición y reducción de peróxidos por catálisis enzimática (Thomas, 2000 reportado por VILLANUEVA, 2003).

- **Principales antioxidantes**

Los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el complejo glutatión peroxidasa (GPx).

La SOD es la responsable de la reacción de dismutación del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , que en reacciones posteriores, catalizadas por la catalasa o por la GPx, se convierte en  $H_2O$  y  $O_2$ .

La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su función principal consiste en eliminar el  $H_2O_2$  generado de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GPx degrada el  $H_2O_2$  citoplasmático.

Los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras.

Las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes o captadores de radicales libres como son: vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno, ferritina, ceruloplasmina, selenio, glutatión reducido (GSH), manganeso, ubiquinona, zinc, ácido úrico, flavonoides, coenzima Q, melatonina, bilirrubina, taurina, cisteína, entre otros (VILLANUEVA, 2003).

- **Antioxidantes sintéticos**

En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica. Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butilhidroxianisol y Butilhidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad (VILLANUEVA, 2003).

## **2.8 COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por los productos de origen vegetal. En su estructura química tienen en común la existencia de anillos aromáticos con grupos hidroxilos que van a ser los

responsables de su actividad. Existen distintos tipos de compuestos fenólicos, entre los que se pueden destacar los siguientes: ácidos fenólicos, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, entre los que se encuentran los flavonoles, flavanonas, isoflavonas, estilbenos, cumarinas y antocianinas (MANACH *et al.*, 2004).

Los compuestos fenólicos poseen propiedades beneficiosas para la salud humana debido a su potente actividad antioxidante y al amplio número de propiedades farmacológicas que presentan (SCALBERT *et al.*, 2005).

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y hortalizas. Tienen distintas funciones en los productos vegetales que van desde la pigmentación para que se produzca su polinización y la diseminación de sus semillas, así como funciones de defensa frente a insectos y animales herbívoros. Además las sustancias fenólicas juegan un papel muy relevante en la calidad de los productos hortofrutícolas. Están relacionadas con el color de los mismos pues muchas de ellas son pigmentos antociánicos (responsables de la pigmentación de las uvas, ciruelas, fresas, etc.) y otros son susceptibles de oxidarse enzimáticamente para dar lugar al pardeamiento de los tejidos, lo que generalmente conduce a una pérdida de calidad. Además tienen un papel destacado en el sabor y aroma de algunos de estos productos (MANACH *et al.*, 2004).

En los granos de café, los compuestos fenólicos están presentes principalmente como una familia de ésteres formados por ácidos hidroxicinámicos y ácido quínico, conocidos como los ácidos clorogénico. Otros compuestos fenólicos, como los taninos, antocianinas y ligninas también están

presentes en las semillas de café, aunque en pequeñas cantidades. Además, estos compuestos tienen varias propiedades beneficiosas para la salud en gran medida por su potente actividad antioxidante (FARAH y MARINO, 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo se ejecutó en los laboratorios de Biotecnología, Análisis de Alimentos y el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva y en la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, en Tingo María, ubicada a 652 m.s.n.m., a 09° 18' 00" de latitud Sur, a 75° 53' 00" de latitud Oeste, con una temperatura media de 22 a 25 °C y una humedad relativa promedio de 89%, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco.

#### **3.2 MATERIA PRIMA**

Se utilizó como materia prima los granos de café (*Coffea arabica* L.) de las variedades Caturra rojo, Bourbon y Typica, las cuales fueron recolectados en los meses de junio - julio (2008) de los campos de cultivo del caficultor Ezequiel Bravo Condezo, del caserío Simón Bolívar, distrito de Hermilio Valdizán, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, cultivado a 1300 m.s.n.m.



### 3.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

#### 3.3.1 Equipos de laboratorio

- Balanza analítica de Digital Precisión, ESJ-210 (0,0001g) Massachusetts.
- Baño maría con termostato de GEMMYCO, YCW-010E, Taiwan.
- Centrífuga de Hettich, MIKRO 22R, Alemania.
- Desionizador de Barnstead, EASY PURE<sup>®</sup>-RF/UV, USA.
- Homogenizador de Scientifid Indrutries, Vortex-genie<sup>®</sup>2, Nueva York.
- Refrigeradora de LG, Icebean door cooling, Corea.
- Refrigeradora de Electrolux, Firgidaire Frost free, Canadá.
- Microondas de Cheff Samsung, Tailandia.
- Selladora de WJ, China.
- Potenciómetro de Jenway, 3510 pH Meter, Inglaterra.
- Tostadora de café IMSA, E-2, de laboratorio, a gas propano.
- Molino de acero inoxidable IMSA.
- Espectrofotómetro UV-VIS de Thermo Electro Corporation, GENESYS 6, USA.
- HPLC de Shimadzu Scientific, MD, USA, equipado con: bomba modelo LC-10ATVP, columna modelo PHENOMENEX GEMINI/C-18/110A/5µm/250x46.0MM, horno de columna modelo CTO-10 UV-VIS modelo SPD-10AVVP, controlador modelo SCL-10AVP y un inyector de muestra de capacidad de 20 µl.

### 3.3.2 Materiales de laboratorio

- Matraces de 50 y 250 ml
- Probetas de 10, 50, 100 y 1000 ml
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250, 500, y 1000 ml
- Fiolas de 10, 25, 50 y 1000 ml
- Bolsas de polietileno de densidad media.
- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Termómetro de Hg, 0 - 100 °C
- Micropipetas de 10 - 100  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l
- Tips de 100 y 1000  $\mu$ l
- Portatips.
- Tubos de plástico de 15 y 50 ml
- Cubetas de poliestireno (12,5x12,5x45 mm) de 1,5 ml de capacidad.
- Papel filtro N° 40
- Frascos de plástico con tapa.
- Recipiente de aluminio N° 22
- Mortero de porcelana.
- Mechero de Bunsen.
- Campana de vidrio.
- Placas petri.

### 3.3.3 Reactivos

- 1,1-Diphenyl -2- picrylhydrazyl (DPPH). Approx. 90%. Sigma Chemical CO.
- 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline - 6 - sulfonic acid) diammonium icr. 98%. (ABTS) Sigma Chemical Co.
- 2,2-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride. (ABAP) Wako Chemical.
- Cloruro de sodio. Scharlau Chemie S.A.
- Fosfato de sodio hepta hidratado. G. Colman Inc.
- Fosfato de potasio. Scharlau Chemie S. A.
- (+) - catechin hydrate minimum 98%. Sigma Chemical Co.
- Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu. Merck KGaA.
- Carbonato de sodio decahidrato. Scharlau Chemie S. A.
- Ácido cafeico. Sigma-Aldrich CO.
- Ácido clorogénico. Minimum 95% titration. Sigma-Aldrich CO.
- Fosfato dihidrógeno de potasio. Scharlau Chemie S. A.
- Ácido orto-fosfórico 85%. Merck KGaA.
- Metanol 99.9 %, para HPLC en gradiente, Scharlau Chemie S. A.
- Ácido acético, Scharlau Chemie S. A.
- Metanol y etanol de grado industrial.

## **3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

### **3.4.1 Cuantificación de ácido clorogénico (5-ACQ) y ácido cafeico**

Se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), y se siguió el método descrito por LEUCUTA *et al.*, (2005).

### **3.4.2 Cuantificación de cafeína**

Se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), y se siguió el método descrito por DING *et al.*, (1999).

### **3.4.3 Cuantificación de polifenoles totales**

Se realizó mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, reportado por SANDOVAL *et al.*, (2001).

### **3.4.4 Evaluación de la actividad antioxidante**

Para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso del café verde y tostado se utilizaron los siguientes métodos.

- **Radical 2,2 - diphenyl -1- picrylhidrazyl (DPPH)**

Se evaluó mediante el método descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.*, (1995), inhibición del radical DPPH, modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001).

- **Radical peroxilo**

Se empleó el método TRAP (Poder Total de Actividad Reductora) descrito por BARTOZ *et al.*, (1998), modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001).

### **3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

#### **3.5.1 Obtención del café verde oro**

Los frutos fueron recolectados, con el mismo grado de madurez, y se llevó a cabo el beneficio mediante vía húmeda (Figura 4) para la obtención del café pergamino. Los granos de café fueron secados al sol hasta alcanzar una humedad de 10 - 12 % (Anexo-XII). Posteriormente el café pergamino se empacó en bolsas de polietileno y se almacenó. El trillado fue realizado antes de cada análisis.

#### **3.5.2 Obtención del café tostado**

Se pesaron 100 g de café verde oro y fueron introducidos en el cilindro giratorio de la tostadora de café en el laboratorio de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, la temperatura de tueste fue de 180 - 210 °C por un tiempo de 3 - 4 minutos, dependiendo de la variedad de café utilizada. Luego de la molienda fueron oreados por 12 horas, inmediatamente se empacaron en bolsas de polietileno sin dejar espacio de aire y almacenados en una campana de vidrio para evitar el ingreso de humedad (Figura 5).

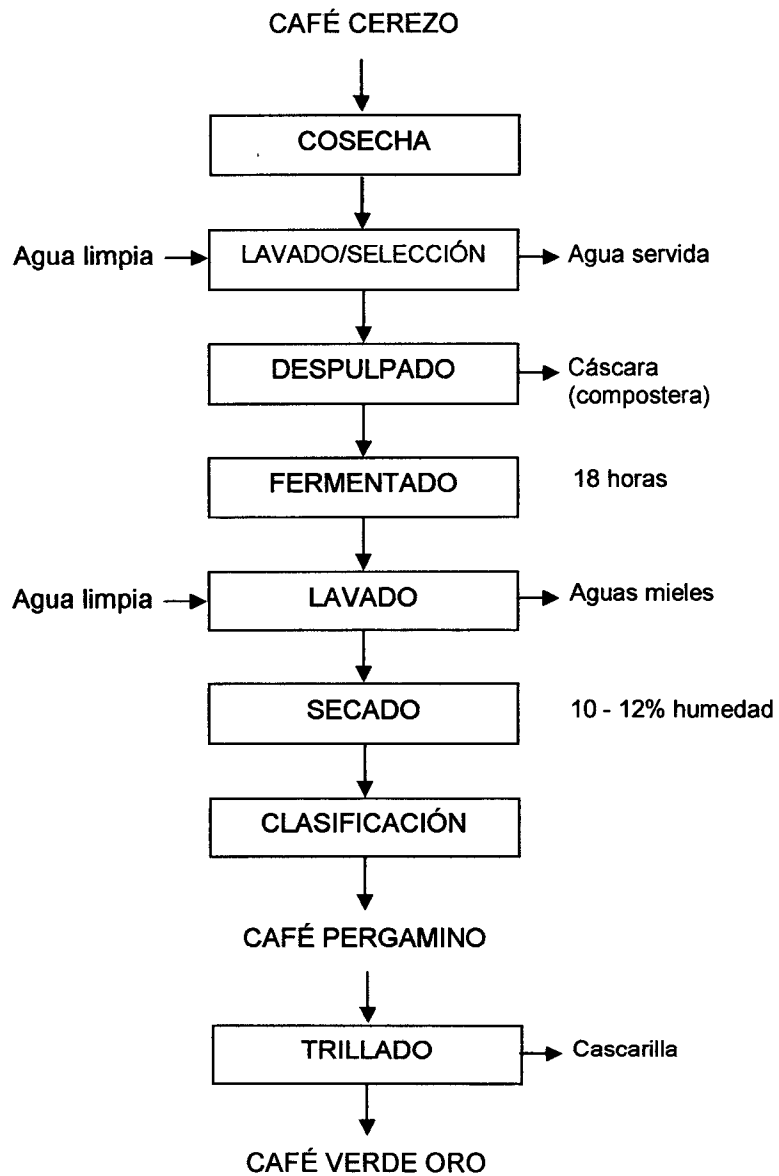


Figura 4. Flujograma para la obtención del café verde oro por vía húmeda.

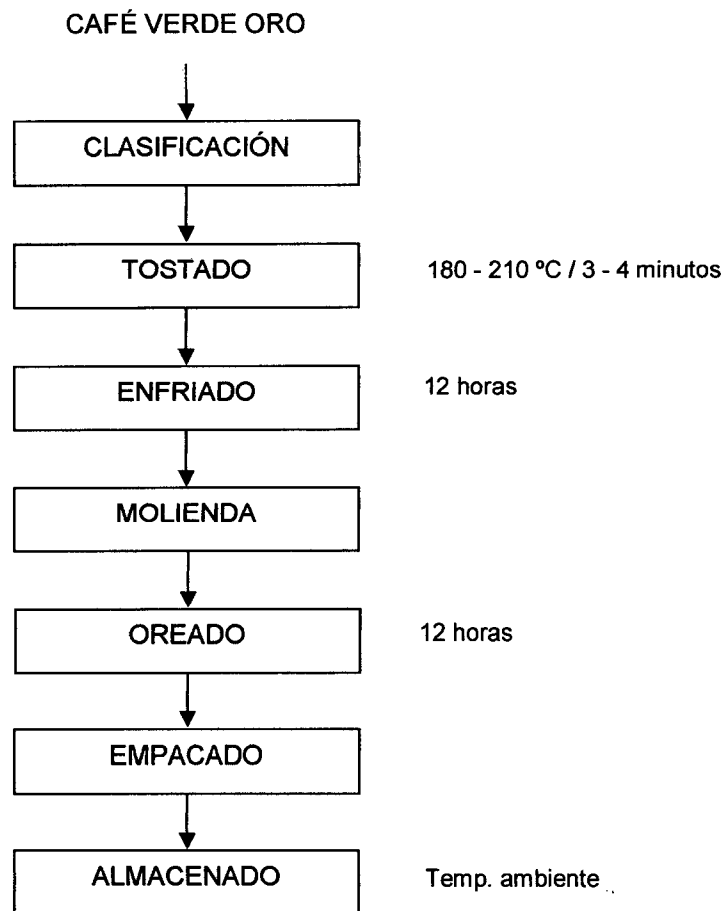


Figura 5. Flujograma para la obtención del café tostado.

### **3.5.3 Preparación de la solución stock**

Se pesó 1 g de muestra molida y se añadió 20 ml de agua hirviente desionizada (50 mg/ml), luego la solución stock se llevó a baño maría (90-95 °C) por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se pasaron a unos microtubos y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos a una temperatura de 4 °C.

### **3.5.4 Cuantificación de ácido clorogénico (5-ACQ) y ácido cafeico**

La fase móvil fluyó en un sistema de gradiente binario preparado con metanol (solvente A) y solución buffer (solvente B). La solución buffer fue preparado disolviendo fosfato dihidrógeno de potasio (40mM) en agua y el pH de la solución fue ajustado a 2,3 con ácido ortofosfórico al 85%. El programa de gradiente inició con un gradiente lineal de 5% del solvente A a 42% solvente A. La velocidad de flujo fue de 1ml/minuto y el volumen de inyección de 20 µl. La detección del ácido clorogénico y el ácido cafeico se realizó a una longitud de onda de 330 nm, usando un detector UV - VIS.

La concentración de la muestra estándar de ácido clorogénico y ácido cafeico fue de 1000 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente, disolviéndose en metanol grado HPLC las concentraciones para levantar la curva estándar fueron de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/ml para el ácido clorogénico y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µg/ml para el ácido cafeico.

De la solución stock se prepararon las soluciones de trabajo de 1 mg/ml para el café verde y 2,5 mg/ml para el café tostado, y se filtraron



mediante una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectados al HPLC. Las absorbancias registradas fueron reemplazados en la ecuación de la recta y los resultados de expresaron en mg de ácido clorogénico o ácido cafeico/g de café.

### **3.5.5 Cuantificación de cafeína**

Para la fase móvil se usó una solución de metanol, agua y ácido acético a una proporción de 30:70:0,1 (v/v), la velocidad de flujo fue de 0,8 ml/min y el volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{l}$ . La detección de la cafeína se realizó a una longitud de onda de 270 nm, usando un detector UV - VIS.

La concentración de la muestra estándar de cafeína fue de 1000  $\mu\text{M}$ , disolviéndose en metanol grado HPLC, las concentraciones para levantar la curva estándar fueron de 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$ .

De la solución stock, se preparó una solución de trabajo de 2,5 mg/ml tanto para el café verde como para el tostado, y se filtraron mediante una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectados al HPLC. Los resultados se expresaron en mg de cafeína/g de café.

### **3.5.6 Cuantificación de polifenoles totales**

Para levantar la curva estándar se prepararon concentraciones de 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000  $\mu\text{M}$ . Se hizo reaccionar en un tubo 1,58 ml de agua desionizada y 20  $\mu\text{l}$  de solución estándar con 100  $\mu\text{l}$  de solución de fenol Folin-Ciocalteu, para neutralizar la reacción se agregó 300  $\mu\text{l}$  de bicarbonato de

sodio (20%), para completar la reacción se dejó reposar por dos horas a temperatura ambiente. La absorbancia fue monitoreada a 700 nm.

De la solución stock se prepararon soluciones de trabajo para las reacciones *in vitro* de: 1, 5 y 10 mg/ml. Se siguió el mismo proceso, reemplazando los 20 µl por solución de muestra. Las absorbancias se reemplazaron en la ecuación de la recta y los resultados se expresaron en mg eq.CAT/g de café.

### 3.5.7 Evaluación de la actividad antioxidante

- **Radical 2,2 - diphenyl -1- picrylhidrazyl (DPPH)**

Se preparó una solución stock, y de ésta solución se prepararon soluciones de trabajo a concentraciones de: 30, 100, 300 µg/ml. A partir de estas soluciones de trabajo se hizo reaccionar 25 µl de la solución de trabajo con 975 µl de DPPH (100 µM) en metanol. La reacción *in Vitro*, se generó en una microcubeta de poliestireno (12,5 x 12,5 x 45 mm), la absorbancia fue monitoreada a 515 nm, a intervalos de 30 segundos durante 10 minutos. Para la determinación de la actividad antioxidante, los resultados fueron expresados en términos de IC<sub>50</sub> (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

El porcentaje de inhibición del radical DPPH fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = [(Abs. \text{ DPPH} - Abs. \text{ muestra}) / Abs. \text{ DPPH}] \times 100$$

Donde:

Abs. <sub>DPPH</sub> es la absorbancia de reacción con DPPH.

Abs. <sub>muestra</sub> es la absorbancia de la reacción de la muestra a los 10 minutos.

El coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) se determinó mediante un análisis de regresión del porcentaje de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

- **Radical peroxilo**

Se preparó una solución stock (50 mg/ml), y de esta solución stock se prepararon soluciones de trabajo a concentraciones de: 10, 30 y 80 µg/ml. A partir de estas soluciones de trabajo se hicieron reaccionar 10 µl de la solución de trabajo con 990 µl de reactivo peroxilo. La reacción *in Vitro*, se generó en una microcubeta de poliestireno (12,5 x 12,5 x 45 mm), y la absorbancia fue monitoreada a 414 nm, a intervalos de 30 segundos durante 10 minutos. Para la determinación de la actividad antioxidante, los resultados fueron expresados en términos de IC<sub>50</sub> (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

El porcentaje de inhibición del radical peroxilo fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición Peroxilo} = [(Abs. \text{ Peroxilo} - Abs. \text{ muestra}) / Abs. \text{ Peroxilo}] \times 100$$

Donde:

Abs. Peroxilo es la absorbancia de reacción con el radical Peroxilo.

Abs. muestra es la absorbancia de la reacción de la muestra a los 10 minutos.

Donde el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) se determinó mediante un análisis de regresión del porcentaje de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical peroxilo (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO (5-ACQ)**

En el Anexo-II, se muestra la curva de calibración para cuantificar ácido clorogénico, con una ecuación de  $y = 2,3275x - 24,256$  y un  $r^2 = 0,9977$ , las lecturas de las absorbancias se interpolaron en la curva de calibración, estos datos se multiplicaron por el factor de dilución (FD verde: 1000, FD tostado: 400) para así obtener la concentración real de ácido clorogénico.

#### **4.1.1 Contenido de ácido clorog. respecto a la condición de grano**

Los resultados que se muestran en el cuadro 5 y figura 6, se realizaron según el ANVA (Anexo-VIa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las condiciones de grano verde y tostado. La prueba de tuckey indica que la mayor cantidad de ácido clorogénico se presenta en el grano verde, además existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el contenido de ácido clorogénico entre las variedades de grano verde como también existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) para las variedades de grano tostado, siendo muy inferior a la condición de grano verde.

Cuadro 5. Contenido de ácido clorogénico (mg/g m. s.)<sup>1</sup> por condición.

Condición de grano	Variedad			Promedio
	Caturra	Bourbón	Typica	
Verde	117,001 ± 0,884 <sup>a</sup>	72,770 ± 0,241 <sup>b</sup>	71,995 ± 0,328 <sup>b</sup>	87,256 ± 7,443 <sup>a</sup>
Tostado	11,148 ± 0,134 <sup>d</sup>	12,945 ± 0,031 <sup>c</sup>	13,913 ± 0,094 <sup>c</sup>	12,668 ± 0,408 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3, p < 0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

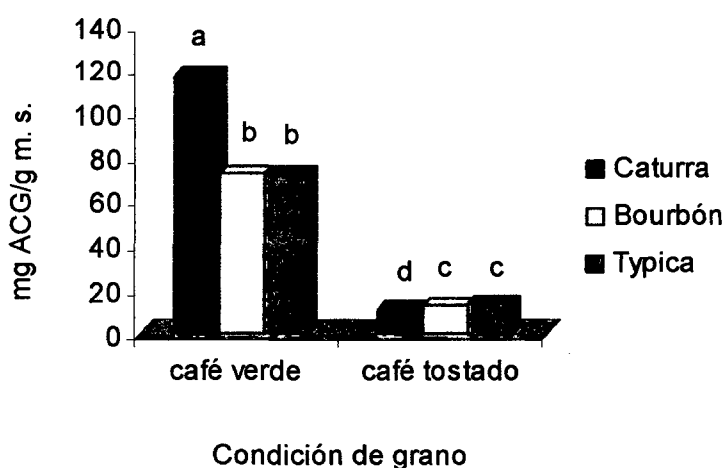


Figura 6. Contenido de ácido clorogénico de los extractos por condición.

FARAH y MARINO (2006), mencionan que los ácidos clorogénicos, que están presentes en altas concentraciones en las semillas de café verde (hasta 14% en base seca), tienen una marcada influencia en la determinación de la calidad del café y juegan un papel importante en la formación del sabor y aroma del café.

En total de ácidos clorogénicos en los granos de café verde ordinario, en base seca, puede variar entre el 40 y el 84 mg/g m. s. en *Coffea*

*arabica*. El 5-ACQ es el único responsable de alrededor de 56 - 62 % del total de ácidos clorogénicos en los granos de café verde (FARAH y MARINO, 2006).

Después del tostado las muestras reportaron menor cantidad de ácido clorogénico, la variedad Caturra perdió 90,5 %, la variedad Typica 80,7 %, y la variedad Bourbon 82,2 %, siendo la variedad Caturra la que tuvo mayor pérdida de ácido clorogénico en comparación a las otras variedades. Es preciso resaltar que el tostado en las muestras analizadas fue un tostado medio (180 - 210 °C por 3-4 minutos), dando un color marrón. Según TRUGO, (1984) el efecto del tostado sobre la composición de los ácidos clorogénico produce una pérdida de 80,9 % para *Coffea arabica*.

Según Clarke y Macrae (1985), reportado por FARAH y MARINO (2006), el contenido de ácido clorogénico en el café tostado oscila entre 10 - 40 mg/g m. s., los resultados encontrados por tanto, coinciden con los valores reportados en la literatura. TRUGO (1984), indica que debido a su inestabilidad térmica, los ácidos clorogénicos pueden ser casi completamente degradados en derivados de fenol cuando se presentan condiciones de intenso tostado. Durante el tostado, una parte de los ácidos clorogénicos son isomerizados, otra parte son transformados en quinolactonas debido a la deshidratación y la formación de un vínculo intramolecular, y parte es hidrolizado y degradado en compuestos de bajo peso molecular.

#### 4.1.2 Contenido de ácido clorogénico respecto a las variedades

Los resultados que se muestran en el cuadro 6 y figura 7, se realizaron según el ANVA (Anexo-VIa) donde se observa que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades de café analizadas.

Cuadro 6. Contenido de ácido clorogénico (mg/g m. s.)<sup>1</sup> por variedad.

Condición de grano	Variedad		
	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	117,001 ± 0,884 <sup>a</sup>	72,770 ± 0,241 <sup>b</sup>	71,995 ± 0,328 <sup>b</sup>
Tostado	11,148 ± 0,134 <sup>d</sup>	12,945 ± 0,031 <sup>c</sup>	13,913 ± 0,094 <sup>c</sup>
<b>Promedio</b>	<b>64,075 ± 23,673<sub>a</sub></b>	<b>42,858 ± 13,378<sub>a</sub></b>	<b>42,954 ± 12,988<sub>a</sub></b>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3,  $p < 0,05$ . Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

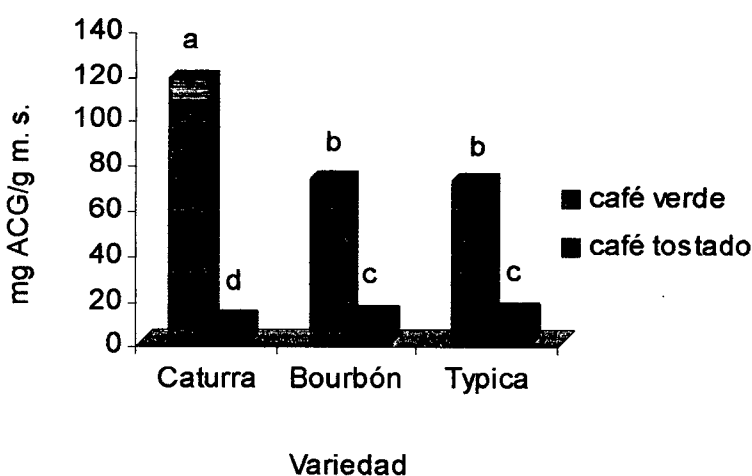


Figura 7. Contenido de ácido clorogénico de los extractos por variedad.



FARAH y MARINO (2006), mencionan que el contenido total de ácido clorogénico en los granos de café verde puede variar de acuerdo a la genética, las especies y cultivares, grado de maduración y, menos importante, las prácticas agrícolas, clima y el suelo. Humphrey y Macrae (1987), reportado por FARAH y MARINO (2006), agregan que inclusive se les relaciona con la resistencia a algunas enfermedades.

Estudios sobre los mecanismos de defensa de los frutos, han comparado el contenido de los pigmentos del fruto en el sector insolado y sano. Por ejemplo, se ha observado en manzanas Braeburn que los antioxidantes carotenoides ( $\beta$ -caroteno) y fenoles (ácido clorogénico), aumentan sustancialmente en la cara expuesta al sol de un fruto. El ácido clorogénico puede aumentar hasta seis veces en el sector asoleado comparado con el lado sombreado. Igualmente la concentración de flavonoides es cinco veces mayor en la cara soleada en comparación a la cara sombreada del fruto (MERZLYAK *et al.*, 2002).

CLIFFORD y RAMÍREZ (1991), reportaron para la variedad Caturra 46,3 mg/g m. s. y para la variedad Bourbon 47,7 mg/g m. s. de ácido clorogénico (5-CQA). VAAST y BERTRAND (2005), encontraron para granos de café verde de la variedad Caturra, procedentes de Costa Rica cantidades de ácido clorogénico total de 76,2 mg/g m. s. y MARTÍN *et al.*, (1998) encontraron cantidades de ácido clorogénico total de 39,5 mg/g m. s. en la variedad Caturra producidos en Nicaragua, como también FRANCA *et al.*, (2005) encontraron cantidades de ácido clorogénico total de hasta 23,9 mg/g m. s. en la variedad

Caturra procedentes de Brasil. Como puede observarse los granos de café verde analizados superan en contenido a lo reportado en bibliografía.

MONTAVÓN *et al.*, (2003) mencionan que en una cierta etapa antes de la madurez, el contenido de ácido clorogénico comienza a disminuir debido a una oxidación. Según MENEZES (1994), desde este punto, se observa una asociación inversa entre los niveles de ácido clorogénico y la maduración de los frutos de café. Algunos autores reportaron un total del 8,7 % (bs) de ácido clorogénico para semillas de *C. arabica* inmaduro (de frutas verdes oscuras), mientras las semillas de frutas sobre-maduras presentaron niveles tan bajo como 1,3 %.

MAIOCCHI *et al.*, (1998) encontraron un contenido de ácido clorogénico (5-ACQ) por HPLC en yerba mate (*Ilex dumosa*) de  $55,7 \pm 2,0$  mg/g m. s., realizada mediante infusión. LYON y BARKER (2006), cuantificaron ácido clorogénico (5-ACQ) mediante HPLC en hojas de la patata (*Solanum tuberosum*) obteniendo concentraciones en el rango de 48 - 327 mg/g en peso fresco según la posición y edad de las hojas.

ZVALETA *et al.*, (2004) cuantificaron ácido clorogénico (5-ACQ) por HPLC en 8 alimentos peruanos encontrando para el huacatay (*Tagetes elliptico*) 1,68 mg/g m. s., olluco (*Ullucus tuberosus*) 14,71 µg/g m. s., sachatomate (*Cyphomandra Betacea*) 210,91 µg/g m. s., sachapapa morada (*Discorea trifida*) 5,40 µg/g m. s., pituca (*Colocasia esculente*) 0,21 µg/g m. s., sachaculantro (*Eryngium foetidum* L.) 13,57 mg/g m. s., aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) 1,37 µg/g m. s., tumbo (*Passiflora quadrangularis*) 93,26 µg/g m. s.

Observándose que los granos de café verde analizados presentan mayor contenido de ácido clorogénico en comparación a la yerba mate, a las hojas de la patata y los 8 alimentos peruanos; por el contrario en los granos tostados, se obtuvieron cantidades inferiores a la yerba mate, las hojas de la patata; siendo superior a los 8 alimentos peruanos.

#### 4.1.3 Contenido de ácido clorogénico respecto a los tratamientos

En el cuadro 7 se muestran los resultados del contenido de ácido clorogénico con respecto a los tratamientos.

Cuadro 7. Contenido de ácido clorogénico en los tratamientos.

Tratamiento	Condición * Variedad	mg ACG/g m. s. <sup>1</sup>
T1	Verde, Caturra	117,001 ± 0,884 <sup>a</sup>
T2	Verde, Bourbon	72,770 ± 0,241 <sup>b</sup>
T3	Verde, Typica	71,995 ± 0,328 <sup>b</sup>
T4	Tostado, Caturra	11,148 ± 0,134 <sup>d</sup>
T5	Tostado, Bourbon	12,945 ± 0,031 <sup>c</sup>
T6	Tostado, Typica	13,913 ± 0,094 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3, p<0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa.

Según el cuadro 7 y el análisis de varianza (Anexo-VIb) se puede observar diferencia significativa (p<0,05) entre tratamientos, donde el T1 es superior al T2 y T3, el T2 y T3 son estadísticamente iguales y superiores al T5 y T6 y estos a la vez superior al T4.

## 4.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CAFEICO

En el Anexo-III, se muestra la curva de calibración para cuantificar ácido cafeico, con una ecuación de  $y = 5,9911x - 0,1721$  y un  $r^2 = 0,9977$ , las lecturas de las absorbancias se interpolaron en la curva de calibración, estos datos se multiplicaron por el factor de dilución (FD verde: 1000, FD tostado: 400) para así obtener la concentración real de ácido cafeico.

### 4.2.1 Contenido de ácido cafeico respecto a la condición de grano

Los resultados que se muestran en el cuadro 8 y figura 8, se realizaron según el ANVA (Anexo-VIIa), donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las condiciones de grano verde y tostado. La prueba de tuckey indica un mayor contenido de ácido cafeico en el grano verde, además existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el contenido de ácido cafeico entre las variedades de grano verde y tostado.

Cuadro 8. Contenido de ácido cafeico (mg/g m. s.)<sup>1</sup> por condición.

Condición de grano	Variedad			Promedio
	Caturra	Bourbón	Typica	
Verde	5,890 ± 0,076 <sup>a</sup>	3,879 ± 0,035 <sup>b</sup>	3,416 ± 0,008 <sup>c</sup>	4,395 ± 0,381 <sup>a</sup>
Tostado	1,506 ± 0,042 <sup>f</sup>	1,890 ± 0,019 <sup>e</sup>	2,100 ± 0,025 <sup>d</sup>	1,832 ± 0,088 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3, p < 0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

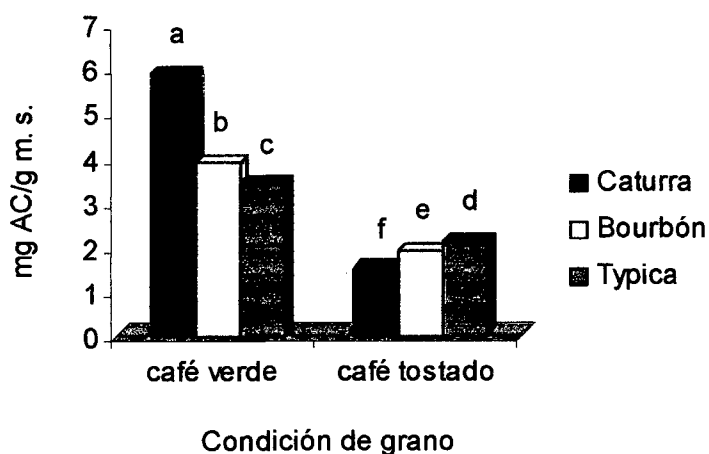


Figura 8. Contenido de ácido cafeico de los extractos por condición.

Clifford (1987), reportado por FARAH y MARINO (2006), mencionan que el ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico y quínico se pueden encontrar en los granos de café verde en su forma libre y en pequeñas cantidades.

Luego del tostado las muestras analizadas presentaron menor cantidad de ácido cafeico, siendo la variedad Caturra la que tuvo mayor pérdida de ácido cafeico (74,43 %), las variedades Bourbon y Typica perdieron 51,3 y 38,5 % respectivamente, mucho menos que la variedad Caturra.

#### 4.2.2 Contenido de ácido cafeico respecto a las variedades

Los resultados que se muestran en el cuadro 9 y figura 9, se realizaron según el ANVA (Anexo-VIIa) donde se observa que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades analizadas.

Cuadro 9. Contenido de ácido cafeico (mg/g m. s.)<sup>1</sup> por variedad.

Condición de grano	Variedad		
	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	5,890 ± 0,076 <sup>a</sup>	3,879 ± 0,035 <sup>b</sup>	3,416 ± 0,008 <sup>c</sup>
Tostado	1,506 ± 0,042 <sup>f</sup>	1,890 ± 0,019 <sup>e</sup>	2,100 ± 0,025 <sup>d</sup>
<b>Promedio</b>	<b>3,698 ± 0,981<sup>a</sup></b>	<b>2,885 ± 0,445<sup>a</sup></b>	<b>2,758 ± 0,295<sup>a</sup></b>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3, p < 0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

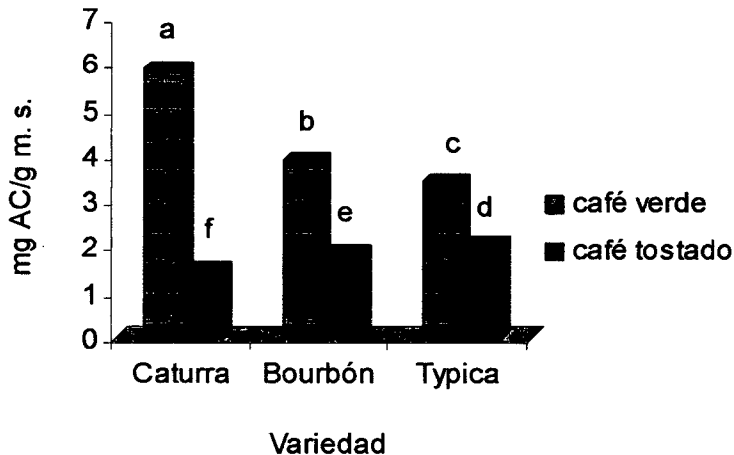


Figura 9. Contenido de ácido cafeico de los extractos por variedad.

ZVALETA *et al.*, (2004) cuantificaron ácido cafeico por HPLC en alimentos peruanos y encontraron para el huacatay (*Tagetes elliptico*) 3,98 mg/g m. s., sachatomate (*Cyphomondra Betacea*) 8,62 µg/g m. s., sachapapa morada (*Discorea trifida*) 0,46 µg/g m. s., pituca (*Colocasia esculente*) 0,014 µg/g m. s., sachaculantro (*Eryngium foetidum* L.) 0,95 mg/g m. s., aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) 3,85 µg/g m. s., tumbo (*Passiflora quadrangularis*) 5,56

$\mu\text{g/g m. s.}$  Los granos de café verde y tostado analizadas presentaron valores inferiores al huacatay, pero superiores a los demás alimentos peruanos.

#### 4.2.3 Contenido de ácido cafeico respecto a los tratamientos

En el cuadro 10 se muestran los resultados del contenido de ácido cafeico con respecto a los tratamientos.

Cuadro 10. Contenido de ácido cafeico en los tratamientos.

Tratamiento	Condición * Variedad	mg AC/g m. s. <sup>1</sup>
T1	Verde, Caturra	5,890 $\pm$ 0,076 <sup>a</sup>
T2	Verde, Bourbón	3,879 $\pm$ 0,035 <sup>b</sup>
T3	Verde, Typica	3,416 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup>
T4	Tostado, Caturra	1,506 $\pm$ 0,042 <sup>f</sup>
T5	Tostado, Bourbón	1,890 $\pm$ 0,019 <sup>e</sup>
T6	Tostado, Typica	2,100 $\pm$ 0,025 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Datos expresados en media  $\pm$  SE, n = 3, p<0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa.

Según el cuadro 10 y el análisis de varianza (Anexo-VIIb) se puede observar diferencia significativa (p<0,05) entre tratamientos, resultando el T1 con mayor contenido de ácido cafeico, seguido del T2; el T3 es superior al T6, T5 y T4.

### 4.3 CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA

En el Anexo-IV, se muestra la curva de calibración para cuantificar cafeína, con una ecuación de  $y = 0,6318x - 0,4454$  y un  $r^2 = 0,9976$ , las lecturas de las absorbancias obtenidas se interpolaron en la curva de calibración, estos datos se multiplicaron por el factor de dilución (FD verde y tostado: 400) para así obtener la concentración real de cafeína.

#### 4.3.1 Contenido de cafeína respecto a la condición de grano

Los resultados que se muestran en el cuadro 11 y figura 10, se realizaron según el ANVA (Anexo-VIIIa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las condiciones de grano verde y tostado. La prueba de tuckey indica mayor cantidad de cafeína en el grano verde, además no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el contenido de cafeína entre las variedades Bourbon y Typica de grano verde, como también no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades Caturra y Typica de grano tostado.

Cuadro 11. Contenido de cafeína (mg/g m. s.)<sup>1</sup> por condición.

Condición de grano	Variedad			Promedio
	Caturra	Bourbón	Typica	
Verde	22,355 ± 0,181 <sup>a</sup>	15,075 ± 0,543 <sup>b</sup>	14,258 ± 0,087 <sup>b,c</sup>	17,229 ± 1,298 <sup>a</sup>
Tostado	13,571 ± 0,128 <sup>c,d</sup>	11,325 ± 0,356 <sup>e</sup>	12,915 ± 0,108 <sup>d</sup>	12,604 ± 0,352 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Datos expresados en media ± SE, n = 3, p < 0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.



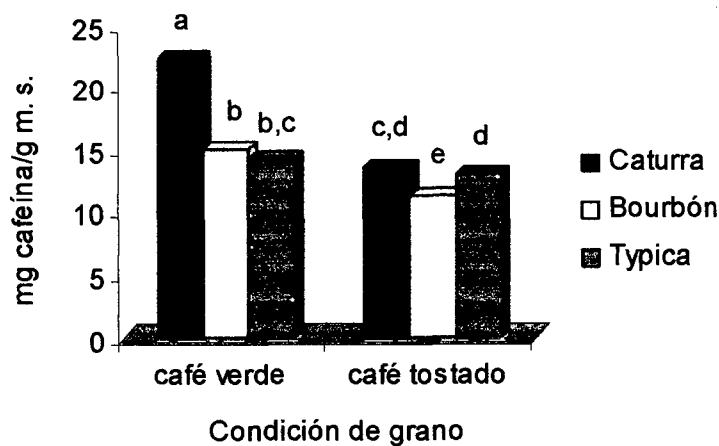


Figura 10. Contenido de cafeína de los extractos por condición.

Clifford (1987) reportado por FARAH y MARINO (2006), el contenido de cafeína en los granos de café verde oscila entre 10 - 20 mg/g en base seca, encontrándose las muestras analizadas dentro del rango reportado.

Después del tostado, las concentraciones de cafeína analizadas disminuyeron, siendo la variedad Caturra la que presentó mayor pérdida de cafeína con 39,3 % en comparación a las otras variedades, mientras que la variedad Bourbon disminuyó 24,9 % y la variedad Typica 9,4 %. La pequeña diferencia entre los niveles de cafeína para la variedad Bourbon y Typica se debe a su alta estabilidad térmica (FARAH y MARINO, 2006). Luego de observarse estos comportamientos, se puede deducir que a mayor presencia de un compuesto, existe mayor sensibilidad a pérdidas, tal como sucede en la variedad Caturra.

### 4.3.2 Contenido de cafeína respecto a las variedades

Los resultados que se muestran en el cuadro 12 y figura 11, se realizaron según el ANVA (Anexo-VIIIa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades analizadas. La prueba de tuckey indica mayor cantidad de ácido cafeico en la variedad Bourbon, seguido de las variedades Bourbon y Typica, entre las cuales no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Cuadro 12. Contenido de cafeína (mg/g m. s.)<sup>1</sup> por variedad.

Condición de grano	Variedad		
	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	22,355 ± 0,181 <sup>a</sup>	15,075 ± 0,543 <sup>b</sup>	14,258 ± 0,087 <sup>b,c</sup>
Tostado	13,571 ± 0,128 <sup>c,d</sup>	11,325 ± 0,356 <sup>e</sup>	12,915 ± 0,108 <sup>d</sup>
<b>Promedio</b>	17,963 ± 1,967 <sup>a</sup>	13,200 ± 0,887 <sup>b</sup>	13,587 ± 0,307 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3,  $p < 0,05$ . Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

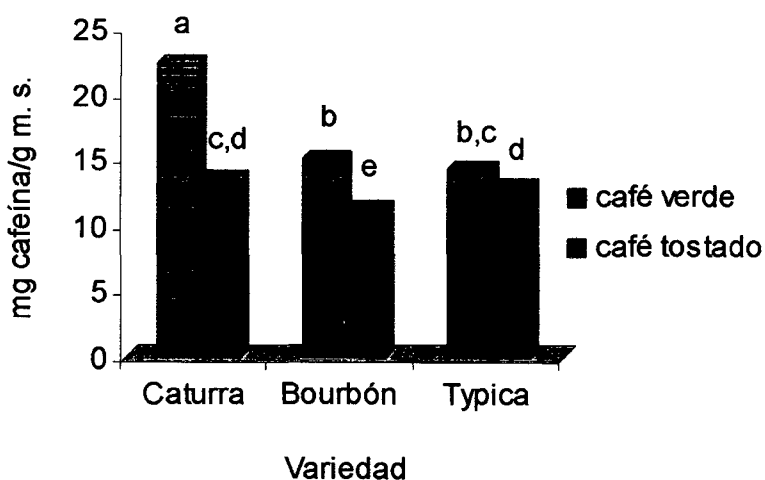


Figura 11. Contenido de cafeína de los extractos por variedad.

BARONE y ROBERTS (1984), determinaron que la cantidad de cafeína en el café depende de varios factores como la variedad de planta, el método de cultivo, las condiciones de cultivo, además de aspectos genéticos y de temporada. Tal respuesta podría ser atribuida a la diferencia de cantidades entre las variedades analizadas; es preciso mencionar que la cosecha de los granos es otro factor importante en el contenido de cafeína como lo mencionan Wintgens (2004) y Zuluaga (1990) reportado por LARA (2005); quienes mostraron que en los granos, disminuye el porcentaje de cafeína a medida que la fruta se acerca a la maduración, siguiendo luego un aumento en su concentración cuando la fruta alcanza su completa madurez.

CARVALHO *et al.*, (1983) encontraron cantidades de cafeína de 11,7 mg/g m. s. en la variedad Bourbon. VAAST y BERTRAND (2005), encontraron para granos de café de la variedad Caturra, procedentes de Costa Rica contenido de cafeína de 14,8 mg/g m. s.; así mismo MARTÍN *et al.*, 1998 encontraron contenido de cafeína para la variedad Caturra de 15 mg/g m. s. en granos producidos en Nicaragua; FRANCA *et al.*, 2005 encontraron cantidades de cafeína de 10,7 mg/g m. s. en la variedad Caturra procedentes de Brasil. MORILLO *et al.*, (1980) reportaron para la variedad Typica procedente de Venezuela cantidades de 9 mg/g m. s. por el método de Bailey-Andrew. La altitud es otro factor importante en el contenido de estos compuestos bioactivos como los menciona LARA (2005), a mayor altura mayor contenido de cafeína. Observándose que la condición de grano verde de la variedad Caturra, Bourbon y Typica superan la cantidad de cafeína reportado por otros autores.

MINGYU *et al.*, (1999) determinaron cafeína en tres tipos de té verde: té *Yunnan*, té *Guangdong* y té *Jinghua* procedentes de China, por HPLC; encontrando valores de 30,5; 26,8 y 27,7 mg/g m. s. respectivamente. BRENELLI (2003), encontró cantidades de cafeína en las hojas del mate (*Ilex paraguarienses*) por HPLC entre 8 - 13 mg/g m. s. la cantidad de cafeína encontrado en los granos de café verde, es inferior al té verde y superior a las hojas del mate, los granos tostados se encuentran en el rango del contenido en yerba mate reportado.

#### 4.3.3 Contenido de cafeína respecto a los tratamientos

En el cuadro 13 se muestran los resultados del contenido de cafeína con respecto a los tratamientos.

Cuadro 13. Contenido de cafeína en los tratamientos.

Tratamiento	Condición * Variedad	mg cafeína/g m. s. <sup>1</sup>
T1	Verde, Caturra	22,355 ± 0,181 <sup>a</sup>
T2	Verde, Bourbon	15,075 ± 0,543 <sup>b</sup>
T3	Verde, Typica	14,258 ± 0,087 <sup>b,c</sup>
T4	Tostado, Caturra	13,571 ± 0,128 <sup>c,d</sup>
T5	Tostado, Bourbon	11,325 ± 0,356 <sup>e</sup>
T6	Tostado, Typica	12,915 ± 0,108 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Datos expresados en media ± SE, n = 3, p<0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa.

Según el cuadro 13 y el análisis de varianza (Anexo-VIIIb) se puede observar diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos, donde el T1 presenta mayor contenido de cafeína, seguido por el T2, siendo esta igual estadísticamente con el T3; el T3 es igual estadísticamente con el T4; y el T4 es igual estadísticamente con el T6 siendo todos estos superiores al T5.

#### **4.4 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

En el Anexo-V, se muestra la curva de calibración para cuantificar polifenoles, con una ecuación de  $y = 0,0002x - 0,0079$  y un  $r^2 = 0,9993$ , las lecturas de las absorbancias obtenidas se interpolaron en la curva de calibración, estos datos se multiplicaron por el factor de dilución (FD: 200) para así obtener la concentración real de polifenoles.

##### **4.4.1 Contenido de polifenoles respecto a la condición de grano**

Los resultados que se muestran en el cuadro 14 y figura 12, se realizaron según el ANVA (Anexo-IXa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las condiciones de grano verde y tostado. La prueba de tuckey indica que la mayor cantidad de polifenoles totales se presenta en el grano verde, además no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el contenido de polifenoles totales entre las variedades de Caturra y Bourbon de grano verde, como también no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) para las variedades de Caturra y Typica de grano tostado.

Cuadro 14. Contenido de polifenoles totales (mg eq.CAT/g m. s.)<sup>1</sup> por condición.

Condición de grano	Variedad			Promedio
	Caturra	Bourbón	Typica	
Verde	80,579 ± 1,164 <sup>a</sup>	78,464 ± 0,768 <sup>a,b</sup>	77,613 ± 1,004 <sup>b</sup>	78,886 ± 0,664 <sup>a</sup>
Tostado	64,370 ± 0,459 <sup>c</sup>	59,349 ± 0,530 <sup>d</sup>	63,840 ± 0,532 <sup>c</sup>	62,519 ± 0,836 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Datos expresados en media ± SE, n = 3, p < 0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

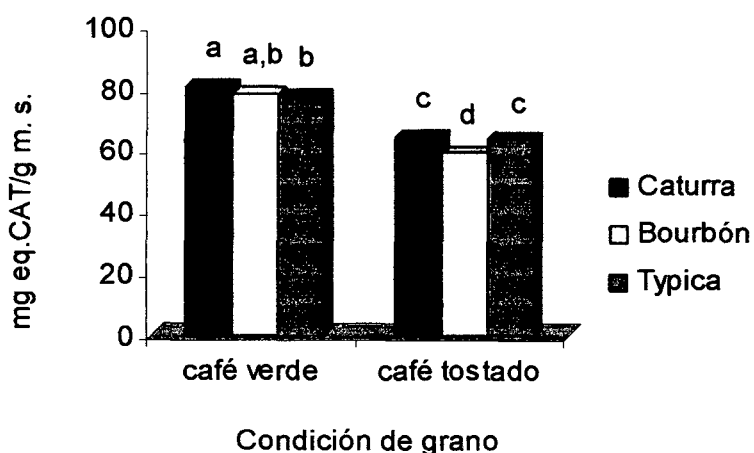


Figura 12. Contenido de polifenoles de los extractos por condición.

HU y SKIBSTED (2002), reportaron que los compuestos fenólicos son considerados los componentes antioxidantes más importantes de las especias y otros materiales derivados de las plantas, y una gran correlación entre la concentración de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total. El ácido clorogénico (ACG) es el polifenol preponderante en el café,

aunque hay otros, como son el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico.

Después del tostado se observa en las muestras una disminución de polifenoles; donde la variedad Caturra disminuyó 20,1 %, la variedad Typica 17,7 %, mientras que la variedad Bourbon disminuyó 24,4 % más que las otras variedades. Según RICHELLE *et al.*, (2001) el tostado afecta notablemente la composición de los polifenoles del café a través de la reacción de Maillard y le confiere al café su agradable sabor y aroma. La baja diferencia entre los granos verdes y tostados es debido a la formación de una amplia variedad de compuestos durante el tostado y de las melanoidinas. El contenido de compuestos fenólicos en el café tostado alcanza hasta 80 mg/g m. s., a partir de la cual el ácido clorogénico es dominante.

LOPES (2000), estudió diferentes cultivares de café arábica tostados encontrando cantidades de 54,6 a 58,7 mg/g de polifenoles totales. PINTO *et al.*, (2001) determinaron polifenoles totales en patrones de bebida de café arábica tostado tipo expreso y clasificado según prueba de taza, encontrando cantidades en un rango de 45,3 - 55,2 mg/g m. s. comparadas con las muestras en estudio, ésta presentó mayor contenido de polifenoles.

#### **4.4.2 Contenido de polifenoles respecto a las variedades**

Los resultados que se muestran en el cuadro 15 y figura 13, se realizaron según el ANVA (Anexo-IXa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades analizadas. La prueba de tuckey indica que la mayor cantidad de polifenoles totales presenta la variedad Caturra

y Typica, donde no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ellas, como también no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades Bourbon y Typica.

Cuadro 15. Contenido de polifenoles totales (mg eq.CAT/g m. s.)<sup>1</sup> por variedad.

Condición de grano	Variedad		
	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	80,579 ± 1,164 <sup>a</sup>	78,464 ± 0,768 <sup>a,b</sup>	77,613 ± 1,004 <sup>b</sup>
Tostado	64,370 ± 0,459 <sup>c</sup>	59,349 ± 0,530 <sup>d</sup>	63,840 ± 0,532 <sup>c</sup>
<b>Promedio</b>	<b>72,475 ± 3,667<sup>a</sup></b>	<b>68,907 ± 4,295<sup>b</sup></b>	<b>70,727 ± 3,121<sup>a,b</sup></b>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3, p < 0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

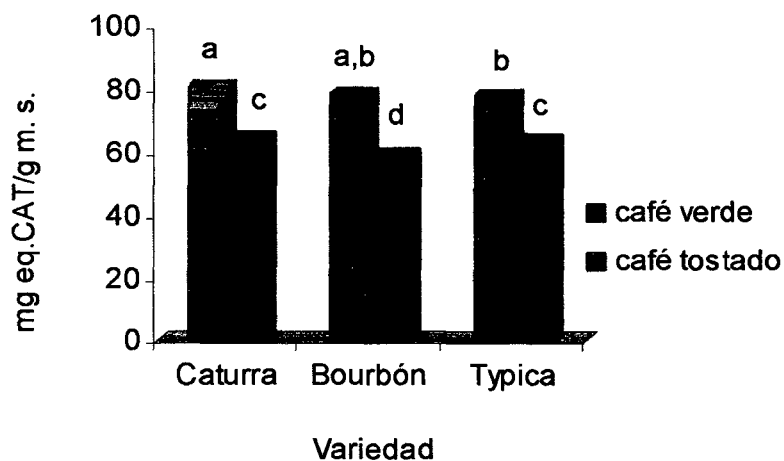


Figura 13. Contenido de polifenoles de los extractos por variedad.



Según FARAH y MARINO (2006), severas condiciones climáticas tales como el frío, la luz visible y el alto estrés hídrico tienden a incrementar el contenido de compuestos fenólicos, no sólo en la planta de café y en las semillas, sino también en otras plantas.

RIBEIRO *et al.*, (2002) encontraron en granos de café (*Coffea arabica*) verde de varias variedades, procedentes de Brasil, tenores de polifenoles totales de 54,9 - 78,1 mg AGE/g m. s. NAVARRO *et al.*, (2006) encontraron para las hojas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) valores de 299 mg AGE/g m. s. de polifenoles totales en los extractos acuosos.

CONRAD *et al.*, (2001) encontraron en las hojas de té verde (*C. sinensis*) 175 mg AGE/g m. s. de polifenoles totales. WOYZECHOWSKY y SANGRONIS (2001) reportan para granos de cacao (*Theobroma cacao*) contenidos de polifenoles totales de 76,1 mg AGE/g m. s. y para granos de cacao tostado 72,6 mg AGE/g m. s.

VILLANUEVA *et al.*, (2007) determinaron la cantidad de polifenoles para el toronjil (*Melisa officinalis* L) y la Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) encontrando  $3,525 \pm 0,471$  y  $1,151 \pm 0,817$  mg AGE/g m. s. respectivamente.

Las muestras en estudio presentaron valores de polifenoles totales dentro de los reportados para café procedente de Brasil, siendo superior al toronjil y a stevia y superado por la yerba mate, té verde y cacao.

#### 4.4.3 Contenido de polifenoles respecto a los tratamientos

En el cuadro 16 se muestran los resultados del contenido de polifenoles totales con respecto a los tratamientos.

Cuadro 16. Contenido de polifenoles totales en los tratamientos.

Tratamiento	Condición * Variedad	mg eq.CAT/g m. s. <sup>1</sup>
T1	Verde, Caturra	80,579 ± 1,164 <sup>a</sup>
T2	Verde, Bourbón	78,464 ± 0,768 <sup>a,b</sup>
T3	Verde, Typica	77,613 ± 1,004 <sup>b</sup>
T4	Tostado, Caturra	64,370 ± 0,459 <sup>c</sup>
T5	Tostado, Bourbón	59,349 ± 0,530 <sup>d</sup>
T6	Tostado, Typica	63,840 ± 0,532 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Datos expresados en media ± SE, n = 3, p<0,05. Superíndices diferentes indican diferencia significativa.

Según el cuadro 16 y el análisis de varianza (Anexo-IXb) se puede observar diferencia significativa (p<0,05) entre tratamientos, siendo el T1 y T2 con mayor contenido de polifenoles, no existiendo entre ellas diferencia significativa; T2 y T3 son estadísticamente iguales y superior a T4 y T6, que también son estadísticamente iguales y superior a T5.

## 4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE AL RADICAL DPPH

### 4.5.1 Capacidad antioxidante respecto a la condición de grano

Los resultados que se muestran en el cuadro 17 y figura 14, se realizaron según el ANVA (Anexo-Xa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las condiciones de grano verde y tostado. La prueba de tuckey indica mayor capacidad de inhibir al radical DPPH expresado en  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) a la condición de grano verde, además no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades Bourbón y Typica de grano verde pero, si existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) para las variedades de grano tostado.

Cuadro 17. Coeficiente de Inhibición  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )<sup>1</sup> por condición.

Condición de grano	Variedad			Promedio
	Caturra	Bourbón	Typica	
Verde	151,485 $\pm$ 0,492 <sup>c</sup>	140,946 $\pm$ 0,467 <sup>a</sup>	142,612 $\pm$ 0,250 <sup>a</sup>	145,014 $\pm$ 0,936 <sup>a</sup>
Tostado	144,865 $\pm$ 0,485 <sup>b</sup>	150,558 $\pm$ 0,612 <sup>c</sup>	161,226 $\pm$ 0,346 <sup>d</sup>	152,216 $\pm$ 1,358 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Datos expresados en media  $\pm$  SE, n = 9,  $p < 0,05$ . Evaluado luego de 10 minutos de reacción. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

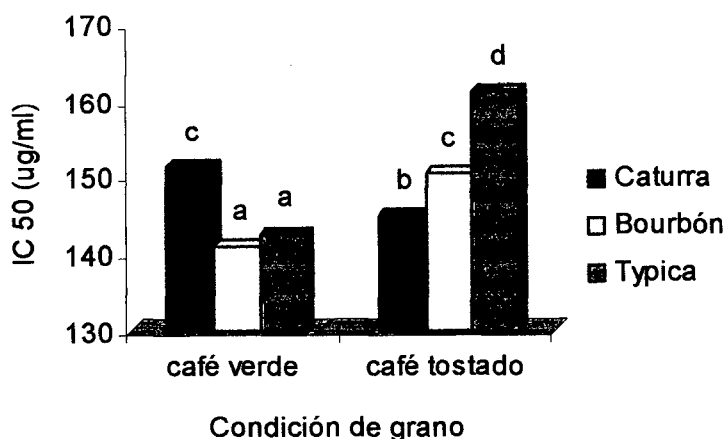


Figura 14. Coeficiente de inhibición de los extractos por condición.

Para comparar la eficiencia de inhibir el radical DPPH, se determinó el  $IC_{50}$  para cada uno de los tratamientos. El  $IC_{50}$  representa la cantidad de café verde o tostado ( $\mu\text{g/ml}$ ), requerido para inhibir el 50 % del radical DPPH utilizado en la reacción. Bajos valores de  $IC_{50}$ , reflejan una alta actividad para inhibir radicales libres.

En el cuadro 17 se observa que después del tostado la variedad Caturra presentó mayor capacidad de inhibir, a diferencia de las otras variedades, la razón, del porqué algunos compuestos disminuyen y otros aumentan a través del proceso del tostado, puede deberse a que los volátiles pueden ser derivados de dos o más precursores, los cuales se degradan en proporciones diferentes durante el tueste (Dark y Nursten, 1985 citados por ROJAS, 2005). Las melanoidinas son el producto resultante de la degradación durante el tueste de carbohidratos, proteínas y ácidos fenólicos, y también pueden contribuir a la función antioxidante que puede tener el café. En algunos trabajos publicados con café, se demuestra que las propiedades antioxidantes

son atribuidas a los compuestos polifenólicos presentes, incluyendo los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y cumárico. No obstante algunos autores también correlacionan esta actividad con los compuestos no fenólicos como por ejemplo la cafeína, ácido nicotínico y trigonelina (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

#### 4.5.2 Capacidad antioxidante respecto a las variedades

Los resultados que se muestran en el cuadro 18 y figura 15, se realizaron según el ANVA (Anexo-Xa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades analizadas. La prueba de tuckey indica a la variedad Bourbón con mayor capacidad de inhibir al radical DPPH.

Cuadro 18. Coeficiente de Inhibición  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )<sup>1</sup> por variedad.

Condición de grano	Variedad		
	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	151,485 $\pm$ 0,492 <sup>c</sup>	140,946 $\pm$ 0,467 <sup>a</sup>	142,612 $\pm$ 0,250 <sup>a</sup>
Tostado	144,865 $\pm$ 0,485 <sup>b</sup>	150,558 $\pm$ 0,612 <sup>c</sup>	161,226 $\pm$ 0,346 <sup>d</sup>
<b>Promedio</b>	148,175 $\pm$ 0,870 <sup>b</sup>	145,752 $\pm$ 1,224 <sup>a</sup>	151,919 $\pm$ 2,267 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Datos expresados en media  $\pm$  SE, n = 9,  $p < 0,05$ . Evaluado luego de 10 minutos de reacción. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

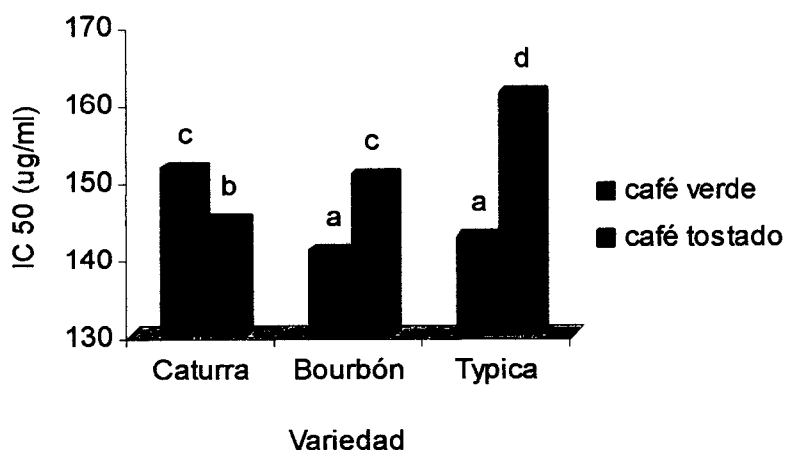


Figura 15. Coeficiente de inhibición de los extractos por variedad.

MELCHOR (2002), encontró  $IC_{50}$  para el té verde (*C. sinensis*) proveniente del Alto Huallaga valores de  $47,47 \pm 1,47 \mu\text{g/ml}$ . VELA (2009), determinó el  $IC_{50}$  para el mata pasto (*Pseudelephantopus spicatus*) valores de  $207,131 \pm 0,574 - 413,687 \pm 1,698 \mu\text{g/ml}$  en los extractos acuosos de diferentes partes de la planta.

VILLANUEVA *et al.*, (2007) determinaron el  $IC_{50}$  para el toronjil (*Melisa officinalis* L) y Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) valores de  $31,704 \pm 0,570$  y  $41,107 \pm 0,135 \mu\text{g/ml}$  respectivamente.

RUIZ (2004), encontró  $IC_{50}$  para la hierba luisa (*Cymbopogon citratos* Staph) de  $834,6 \mu\text{g/ml}$ . Observándose que los granos de café verde y los granos tostados presentaron mayor capacidad de inhibir en comparación al mata pasto y la hierba luisa, siendo inferiores al té verde, toronjil y stevia.

### 4.5.3 Capacidad antioxidante respecto a los tratamientos

En el cuadro 19 se muestran los resultados del IC<sub>50</sub> (µg/ml) con respecto a los tratamientos.

Cuadro 19. Coeficiente de Inhibición IC<sub>50</sub> de los tratamientos.

Tratamiento	Condición*Variedad	IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup>	Máxima Inhibición %
T1	Verde, Caturra	151,485 ± 0,4919 <sup>c</sup>	90,228 ± 0,064
T2	Verde, Bourbón	140,946 ± 0,4669 <sup>a</sup>	90,420 ± 0,140
T3	Verde, Typica	142,612 ± 0,2499 <sup>a</sup>	90,358 ± 0,122
T4	Tostado, Caturra	144,865 ± 0,4854 <sup>b</sup>	90,194 ± 0,090
T5	Tostado, Bourbón	150,558 ± 0,6123 <sup>c</sup>	89,241 ± 0,137
T6	Tostado, Typica	161,226 ± 0,3457 <sup>d</sup>	85,578 ± 0,227

<sup>1</sup> Datos expresados en media ± SE, n = 9, p<0,05. Evaluado luego de 10 minutos de reacción. Superíndices diferentes indican diferencia significativa.

En el cuadro 19 y el análisis de varianza (Anexo-Xb) se puede observar diferencia significativa (p<0,05) entre los tratamientos, siendo el T2 y T3 con mayor capacidad de inhibir a los radicales DPPH, no muestran diferencia significativa entre ellas; el T4 es superior al T1 y T5, donde estas a la vez son superiores al T6.

## 4.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE AL

### RADICAL PEROXILO

#### 4.6.1 Capacidad antioxidante respecto a la condición de grano

Los resultados que se muestran en el cuadro 20 y figura 16, se realizaron según el ANVA (Anexo-XIa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las condiciones de grano verde y tostado. La prueba de tuckey indica mayor capacidad de inhibir al radical peroxilo expresado en  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el grano tostado, además no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades de grano verde, como también no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades de grano tostado.

Cuadro 20. Coeficiente de Inhibición  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )<sup>1</sup> por condición.

Condición de grano	Variedad			Promedio
	Caturra	Bourbón	Typica	
Verde	38,329 $\pm$ 0,250 <sup>b</sup>	38,066 $\pm$ 0,250 <sup>b</sup>	37,270 $\pm$ 0,133 <sup>b</sup>	37,888 $\pm$ 0,150 <sub>b</sub>
Tostado	34,981 $\pm$ 0,315 <sup>a</sup>	34,863 $\pm$ 0,398 <sup>a</sup>	34,081 $\pm$ 0,365 <sup>a</sup>	34,642 $\pm$ 0,215 <sub>a</sub>

<sup>1</sup> Datos expresados en media  $\pm$  SE, n = 9,  $p < 0,05$ . Evaluado luego de 10 minutos de reacción. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.



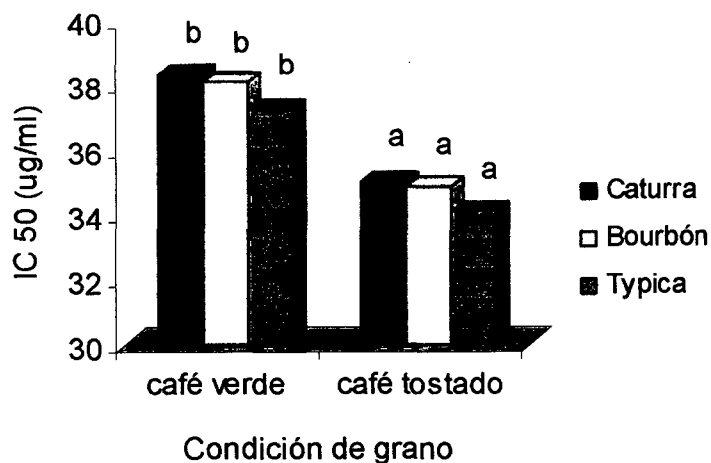


Figura 16. Coeficiente de inhibición de los extractos por condición.

La actividad antioxidante del café no se debe sólo a los compuestos polifenólicos sino que también a la presencia de cafeína y compuestos derivados del tostado. La cafeína tiene la capacidad de inhibir la lipoperoxidación inducida por radicales hidroxilos (OH), peróxidos (ROO) y oxígeno singlete, convirtiéndola en un potente antioxidante con capacidad similar a glutatión y superior al ácido ascórbico (DEVASAGAYAM *et al.*, 1996). Por otra parte, el proceso de tostado del café induce la formación de compuestos de alto peso molecular como melanoidinas al igual que compuestos de bajo peso molecular que también poseen actividad antioxidante. Esto compensaría la disminución de los ácidos clorogénicos que se produce al tostar. La máxima actividad antioxidante se observa en el café medianamente tostado (DEL CASTILLO *et al.*, 2002).

#### 4.6.2 Capacidad antioxidante respecto a las variedades

Los resultados que se muestran en el cuadro 21 y figura 17, se realizaron según el ANVA (Anexo-XIa) donde se observa que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las variedades analizadas. La prueba de tuckey indica que la variedad Typica presenta capacidad de inhibir al radical peroxilo, seguido de las variedades Caturra y Bourbon, entre las cuales no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Cuadro 21. Coeficiente de Inhibición  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )<sup>1</sup> por variedad.

Condición de grano	Variedad		
	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	38,329 $\pm$ 0,250 <sup>b</sup>	38,066 $\pm$ 0,250 <sup>b</sup>	37,270 $\pm$ 0,133 <sup>b</sup>
Tostado	34,981 $\pm$ 0,315 <sup>a</sup>	34,863 $\pm$ 0,398 <sup>a</sup>	34,081 $\pm$ 0,365 <sup>a</sup>
<b>Promedio</b>	36,655 $\pm$ 0,450 <sup>b</sup>	36,465 $\pm$ 0,451 <sup>b</sup>	35,675 $\pm$ 0,430 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Datos expresados en media  $\pm$  SE,  $n = 9$ ,  $p < 0,05$ . Evaluado luego de 10 minutos de reacción. Superíndices diferentes indican diferencia significativa, y los subíndices indican diferencia significativa del promedio.

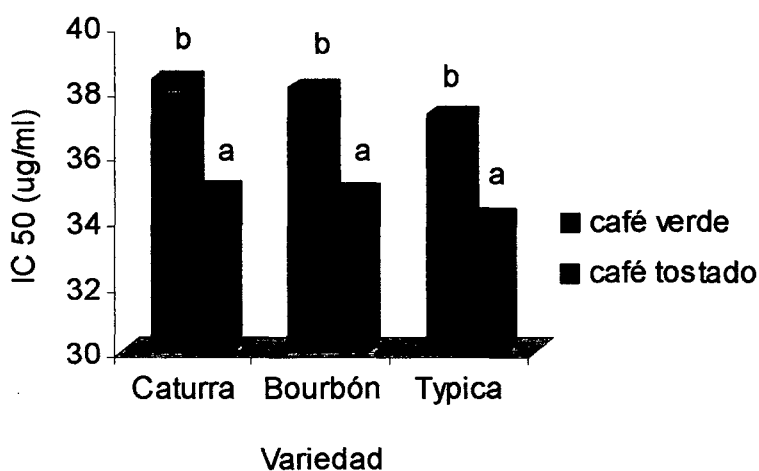


Figura 17. Coeficiente de inhibición de los extractos por variedad.

VILLANUEVA (2003), determinó en los extractos acuosos de la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) en tres estados: verde, pintón y maduro valores de IC<sub>50</sub> de 12,21 ± 0,35; 8,30 ± 0,85 y 14,39 ± 0,08 µg/ml respectivamente.

VELA (2009), determinó el IC<sub>50</sub> para el mata pasto (*Pseudoelephantopus spicatus*) valores de 32,370 ± 0.705 - 357,149 ± 0,734 µg/ml en los extractos acuosos de diferentes partes de la planta.

CARRIÓN (2008), reporta valores de IC<sub>50</sub> de 12,722 ± 0,18 y 11,375 ± 0,02 µg/ml para los extractos acuoso y etanólico de la yema terminal de la guanábana. Los resultados reportados muestran mayor capacidad de inhibir en comparación con las muestras analizadas de del café verde oro y tostado.

#### **4.6.3 Capacidad antioxidante respecto a los tratamientos**

En el cuadro 22 se muestran los resultados del IC<sub>50</sub> (µg/ml) con respecto a los tratamientos.

Cuadro 22. Coeficiente de Inhibición IC<sub>50</sub> en los tratamientos.

Tratamiento	Condición*Variedad	IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup>	Máxima Inhibición %
T1	Verde, Caturra	38,329 ± 0,2496 <sup>b</sup>	96,951 ± 0,056
T2	Verde, Bourbon	38,066 ± 0,2497 <sup>b</sup>	96,840 ± 0,041
T3	Verde, Typica	37,270 ± 0,1325 <sup>b</sup>	96,876 ± 0,014
T4	Tostado, Caturra	34,981 ± 0,3152 <sup>a</sup>	97,127 ± 0,033
T5	Tostado, Bourbon	34,863 ± 0,3982 <sup>a</sup>	97,044 ± 0,028
T6	Tostado, Typica	34,081 ± 0,3648 <sup>a</sup>	97,009 ± 0,073

<sup>1</sup> Datos expresados en media ± SE, n = 9, p<0,05. Evaluado luego de 10 minutos de reacción. Superíndices diferentes indican diferencia significativa.

En el cuadro 22 y el análisis de varianza (Anexo-XIb), se observa diferencia significativa (p<0,05) entre los tratamientos, siendo el T4, T5 y T6 los que poseen mayor capacidad de inhibir a los radicales peroxilo, no habiendo diferencia significativa entre ellas, pero si son superiores al T1, T2 y T3 entre los cuales no existe diferencia significativa.

## V. CONCLUSIONES

En base a los objetivos las conclusiones del presente trabajo fueron:

1. Los granos de café verde oro poseen mayor contenido de ácido clorogénico 5-ACQ ( $87,256 \pm 7,443$  mg/g m. s.) que los granos tostados ( $12,668 \pm 0,408$  mg/g m. s.); entre las variedades estudiadas, no existe diferencia significativa en ácido clorogénico y entre tratamientos la variedad Caturra verde oro posee mayor contenido de ácido clorogénico ( $117,001 \pm 0,884$  mg/g m. s.) ( $p < 0,05$ ).
- Los granos de café verde oro poseen mayor contenido de ácido cafeico ( $4,395 \pm 0,381$  mg/g m. s.) que los granos tostados ( $1,832 \pm 0,088$  mg/g m. s.); entre las variedades estudiadas, no existe diferencia significativa y entre tratamientos la variedad Caturra verde oro posee mayor contenido de ácido cafeico ( $5,890 \pm 0,076$  mg/g m. s.) ( $p < 0,05$ ).
- Los granos de café verde oro poseen mayor contenido de cafeína ( $17,229 \pm 1,298$  mg/g m. s.) que los granos tostados ( $12,604 \pm 0,352$  mg/g m. s.); entre las variedades estudiadas, los granos de la variedad Caturra posee mayor contenido de cafeína ( $17,963 \pm 1,967$  mg/g m. s.) y entre tratamientos la variedad Caturra verde oro posee mayor contenido de cafeína ( $22,355 \pm 0,181$  mg/g m. s.) ( $p < 0,05$ ).

2. Los granos de café verde oro poseen mayor contenido de polifenoles totales ( $78,886 \pm 0,664$  mg eq.CAT/g m. s.) que los granos tostados ( $62,519 \pm 0,836$  mg eq.CAT/g m. s.); entre las variedades estudiadas, los granos de la variedad Caturra y Typica poseen mayor contenido de polifenoles totales ( $72,475 \pm 3,667$  y  $70,727 \pm 3,121$  mg eq,CAT/g m. s.) y entre tratamientos la variedad Caturra y Bourbon verde oro poseen mayor contenido de polifenoles ( $80,579 \pm 1,164$  y  $78,464 \pm 0,768$  mg eq,CAT/g m. s.) ( $p < 0,05$ ).
3. Los granos de café verde oro poseen mayor capacidad de inhibir al radical DPPH ( $145,014 \pm 0,936$   $\mu\text{g/ml}$ ) que los granos tostados ( $152,216 \pm 1,358$   $\mu\text{g/ml}$ ); entre las variedades estudiadas, los granos de la variedad Bourbon poseen mayor capacidad de inhibir al radical DPPH ( $145,752 \pm 1,224$   $\mu\text{g/ml}$ ) y entre tratamientos la variedad Bourbon y Typica verde oro poseen mayor capacidad de inhibir al radical DPPH ( $140,946 \pm 0,4669$  y  $142,612 \pm 0,250$   $\mu\text{g/ml}$ ) ( $p < 0,05$ ).
- Los granos de café tostado poseen mayor capacidad de inhibir al radical peroxilo ( $34,642 \pm 0,215$   $\mu\text{g/ml}$ ) que los granos verdes oro ( $37,888 \pm 0,150$   $\mu\text{g/ml}$ ); entre las variedades estudiadas, los granos de la variedad Typica poseen mayor capacidad de inhibir al radical peroxilo ( $35,675 \pm 0,430$   $\mu\text{g/ml}$ ) y entre tratamientos las variedades Caturra, Bourbon y Typica tostado poseen mayor capacidad de inhibir al radical peroxilo ( $34,981 \pm 0,34,863 \pm 0,3982$  y  $34,081 \pm 0,3648$   $\mu\text{g/ml}$ ) ( $p < 0,05$ ).

## **VI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda lo siguiente:

- Realizar estudio similares con otras variedades de café de importancia en la zona de Hermilio Valdizán, como: Catimor, Pache, Mundo Novo entre otros.
- Determinar otros compuestos bioactivos existentes en los granos de café verde oro y tostado mediante HPLC, tales como trigonelina, catequina, ácido quínico y melanoidinas; compuestos volátiles mediante cromatografía de gases.
- Formular bebidas a base de granos de café verde debido a que posee mayor contenido de ácido clorogénico (5-ACQ), ácido cafeico, cafeína y polifenoles totales en comparación con los granos tostados.
- Realizar estudios de tostado a temperaturas inferiores y superiores a 180 - 210 °C y evaluar la pérdida de ácido clorogénico (5-ACQ), ácido cafeico, cafeína y polifenoles totales.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, M.; ROJAS, G. 1998. Cultivo y Beneficiado del Café. Primera edición. San José, Costa Rica. EUNED. p. 184.
- ANACAFE. 1999. Manual de Caficultura Orgánica. Guatemala. p. 159.
- ARVY, M.; MONTALBÁN, J.; MENDIOLA, A.; FRANÇOIS, G. 2007. Especies, aromatizantes y condimentos. Traducido por M Ángeles Mendiola Ubillos Colaborador José Martín Montalbán. Mundi-Prensa.
- BARONE, J.; ROBERTS, H. 1984. Human consumption of caffeine. In: DEWS, P.B. Caffeine: Perspectives from recent research. Berlin: Springer-Verlag. seção II, capítulo 4, p. 59 - 73.
- BARTOSZ, G.; JANASZEWSKA, A.; ERTEL, D.; BARTOSZ, M. 1998. Simple Determination of Peroxyl Radical - Trapping Capacity. Biochem. Mol. Biol. Int. 46: 519 - 528.
- BAUMANN, T. 1984. Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. Plant and Cell Physiology. Oxford Journals. 25 (8): 14 - 31.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss Technol. 28: 25 - 30.



- BRENELLI, E. 2003. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 136 - 138.
- CÁRDENAS, S. 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE. Tesis para optar el grado de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. p. 6.
- CARVALHO, A.; SONDAHL, M. ; SLOMAN, C. 1983. Teor de cafeína em selecoes de café. Río de Janeiro (Brasil), In: CONGRESSO Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. IBC-GERCA. p. 111 - 113.
- CLIFFORD, N.; RAMIREZ, R. 1991. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chem.* 40: 35 - 42.
- CONRAD et al 2001.
- DEL CASTILLO, D.; AMES, M.; GORDON, H. 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.*; 50: 3698 - 3703.
- DEVASAGAYAM, P.; KAMAT, P.; MOHAN H.; KESAVAN C. 1996. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipoperoxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*; 1282: 63.
- DING, M.; YANG, H.; XIAO S., H. 1999. Rapid, Direct Determination of Polyphenols in Tea by Reversed-Phase Column Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 849: 637 - 640.

- FARAH, A.; MARINO, D. 2006. Phenolic compounds in coffee. Universidade Federal do Rio de Janeiro. *Braz. J. Plant Physiol.* volumen 18 no.1., 18(1): 23 - 36.
- FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia. Editorial Universidad de Antioquia. 2da edición. p. 368.
- FRANCA, A.; MENDONCA, J.; OLIVEIRA, S. 2005. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *Food Science and Technology.* 38(7): 709 - 715.
- FRISCHKNECHT, M.; ULMER-DUFEK, J.; BAUMANN, W. 1986. Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: expression of an optimal defence strategy?. *Phytochemistry, Oxford*, 25: 613 - 616.
- GARCÍA, M.; DE PALCUAL, S.; SANTOS, C.; RIVAS, J. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chemistry.* 84: 13 - 18.
- GARCÍA, B.; GARCÍA, G.; ROJO, D.; SÁNCHEZ, G. 2001. Plantas con Propiedades Antioxidantes. Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria Ceirón". *Revista Cubana de Investigación Biomédica.* 20 (3): 231 - 235.
- GONZÁLEZ, N.; RAMOS, M.; BUSTAMANTE, J. 1999. Contenido de ácidos clorogénicos y cafeína en hojas sanas de cultivares de café resistentes y no resistentes a *Hemileia vastatrix Berk y Br.* *anales de Botánica Agrícola* 6: 511.

- GOTTELAND, M.; DE PABLO, S. 2007. Algunas verdades sobre el café  
Revista chilena de nutrición. volumen 34 n. 2. p: 105 - 115.
- GUTIÉRREZ, G. 2004. Respuesta de tres variedades de café (*Coffea arabica* L.) a diferentes tratamientos de polinización en el centro del estado de Veracruz. Universidad de las Américas Puebla. Tesis profesional para obtener el título en Licenciatura en Biología con área en Ecología. p. 6 - 9.
- HU, M.; SKIBSTED, H. 2002. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus. Food Chem; 76:329 - 330.
- KUSKOSKI E.; ROSEANE F.; GARCÍA A.; TRONCOSO G. 2005. Propiedades químicas y farmacológicas del Fruto guaraná (*Paullinia cupana*). Revista de la facultad de química farmacéutica. Volumen 12 número 2, Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. p. 45 – 52.
- LARA, L. 2005. Efecto de la altitud, sombra, producción y fertilización sobre la calidad del café (*coffea arabica* L. var. Caturra) producido en sistemas agroforestales de la zona cafetalera Norcentral de Nicaragua. Tesis para optar el título de Magíster Scientiae en Agroforestería Tropical. CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 92.
- LEUCUTA, S.; VLASE, L.; GOCAN, S.; RADU, L.; FODOREA, C. 2005. Determination of Phenolic Compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. Journal of Liquid Chromatography & Related technologies. 28: 3109 - 3117.

- LOPES, L. 2000. Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- LYON, D.; BARKER, H. 2006. The measurement of chlorogenic acid in potato leaf extracts by high-pressure liquid chromatography. p. 291 - 295.
- MAIOCCHI, M.; AVANZA, J. 1998 "Contenido de ácidos clorogénicos en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*" procesada con idéntica tecnología. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas - UNNE.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727 - 747.
- MARTIN, J.; PABLOS, F.; GONZALEZ, A. 1998. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta* 46(6): 1259 - 1264.
- MELCHOR, V. 2001 Procesamiento Tecnología para la obtención de té verde (*Camellia sinensis*); determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavanoles por HPLC. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María- Perú. p. 44 - 45.
- MENEZES, C. 1994 The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquinic acid. *Food Chem.* 50: 293 - 296.
- MERZLYAK, M.; A. SOLOVCHENKO; O. CHIVKUNOVA. 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry* 8: 679 - 684.

- MINGYU, D.; HAIJUN, Y.; SHANQIANG, X. 1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China. *Journal of Chromatography A*, 849; p. 637 - 640.
- MONTAVÓN P.; DURUZ E.; RUMO G.; PRATZ G. 2003 Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1328 - 2334.
- MORILLO, R.; PEREZ, E.; LINARES, J.; ROMEN, C. 1980 Contenido de aceite y de cafeína en el grano y de cafeína en la pulpa de café en veintidós cultivares. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Región Los Andes. CIARLA-FONAIAP. Bramón- Venezuela. *Agronomía Tropical*, Vol. 29(02): 165 - 171.
- NATIVIDAD, R.; ADRIAZOLA, J.; GARCÍA, L.; ZAVALA, J.; CABEZAS, O; GONZALES, F. 2007. Cultivos industriales tropicales: café, cacao y palma aceitera. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. p. 45 - 50.
- NAVARRO, A.; PINOTTI, A.; GARCIA MARIA, A.; MARTINO, M. 2006. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales a distintos procesos de conservación. *In: Interamerican confederation of chemical engineering (IACChE)*, 22., Buenos Aires, Argentina.
- PINTO, N.; FERNANDES, S.; PIRES, T.; PEREIRA, R.; CARVALHO, V. 2001. Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café torrado tipo expresso. *Revista. Brasileira de AGROCIÊNCIA*, v. 7 n. 3, p.193 - 195.

- PUERTA, G. 1999. Influencia del proceso de beneficiado en la calidad del café. CENICAFE 50 (1): 78 - 88.
- RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. J. Agric. Food Chem. 49: 3438 - 3442.
- RIBEIRO, M.; DOS SANTOS, M.; DE MELO, F. 2002. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Maringá, v. 24, n. 5, p. 1385 - 1390.
- ROJAS, G. 2005. Caracterización del aroma del café molido de puerto rico mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tesis para el grado de maestro en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad de Puerto Rico. p. 12 - 14.
- RUIZ, I. 2004. Tesis Actividad antioxidante, Polifenoles totales en el extracto acuoso de hierba luisa (*Cympogogan citratus* Staph), y su estabilidad en bebidas modelo. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María-Perú. p. 52.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L. y MILLER, M. 2001. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Publicación aceptada. Food chemistry. p. 1 - 23.

- SANTACREO, R. 1996. Programa de selección de variedades en Honduras. Nuevas selecciones con resistencia a enfermedades y plagas de importancia económica. IHCAFE. Tegucigalpa, Honduras. p. 9.
- SCALBERT, A.; JOHNSON I., T.; SALTMARSH, M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 215S - 217S.
- SMITH, W. 1989. Introducción. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*, v. 1. London: Elsevier Applied Science. p. 1 - 41.
- TRUGO, C. 1984. Café: Composição química e potencial nutracêutico. *Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas*. Vol. II. Universidade de Campinas, Campinas, S. P., Brasil.
- VAAST, P.; BERTRAND, B. 2005. Date of harvest and altitude influence bean characteristics and beverage quality of *Coffea arabica* in intensive management conditions. *HortScience* In press.
- VARNAM, H.; SUTHERLAND, P.; DALMAU, M. 1996. *Bebidas: Tecnología, química y microbiología*. Primera edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza p. 488.
- VELÁSQUEZ, C. 2004. El estrés oxidativo y los antioxidantes desde la ciencia de la nutrición. Editorial Universidad de Antioquia - Escuela de Nutrición y Dietética. 13 – 16.
- VILLANUEVA, J. 2003. Antocianina, Acido Ascórbico, Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en la Cáscara de Camu Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh H.B.K.). Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentaría. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María-Perú. p. 47.

- VILLANUEVA, J.; VARGAS, J.; LENADRO, C. 2007. Análisis estructural de steviosidos, contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en extractos acuosos de toronjil (*Melisa officínalis* L) y stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*). VIII Congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos. Cajamarca. Libro de resúmenes p. 13 - 18.
- WAGNER, R.; VON ROTHKIRCH, C. 2001. Historia del Café de Guatemala Publicado por Villegas Asociados, p. 224.
- WEINBERG, A.; BEALER, K. 2001. The world of caffeine. New York & London: Routledge.
- WOYZECHOWSKY, L.; SANGRONIS, E. 2001. Efecto del procesamiento del grano del cacao (*Theobroma cacao*) en contenido de polifenoles, taninos y capacidad antioxidante. Universidad Simón Bolívar, Valle de Sartenejas, Caracas, Venezuela.
- ZVALETA, J.; MUÑOZ, A. M.; BLANCO, T. ALVARADO-ORTIZ, C.; LOJA, B. 2004. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Título para Maestría en Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana, Universidad San Martín de Porras.



## **ANEXO**

**Anexo-I. Muestra del Diseño Completo al Azar (DCA) con arreglo factorial utilizado para todos los análisis.**

**Cuadro 17. Distribución de los factores y niveles para su codificación.**

Factor	Niveles	Símbolo	Código
a	Verde	1	a1
	Tostado	2	a2
b	Caturra	1	b1
	Bourbón	2	b2
	Typica	3	b3

**Cuadro 18. Descripción del emparejamiento de los factores y niveles mediante su codificación.**

Condición de grano	Caturra	Bourbón	Typica
Verde	a1b1	a1b2	a1b3
Tostado	a2b1	a2b2	a2b3

**Anexo-II. Curva de calibración para el ácido clorogénico por HPLC.**

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia (mUA)	Tiempo retención (min)
25	21,582	20,2177
50	103,668	21,4425
100	209,432	21,3658
150	333,36	21,3842
200	430,873	21,3263
250	559,394	21,3358

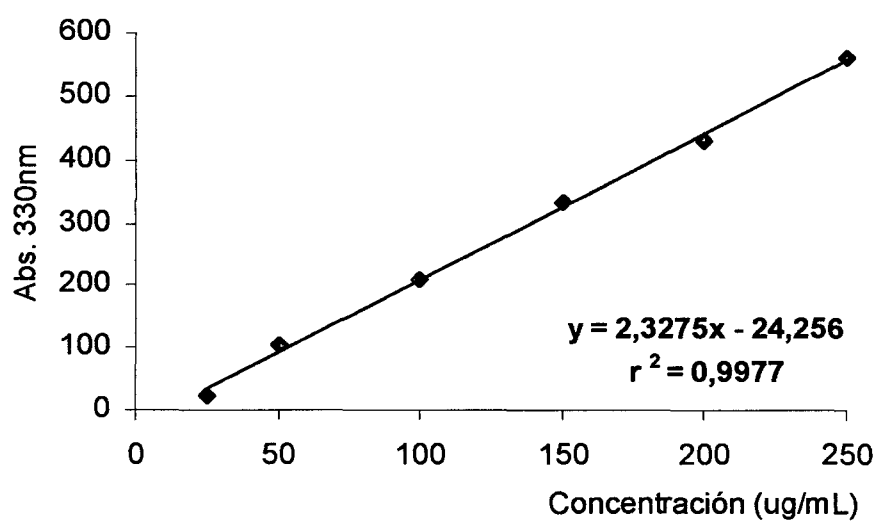


Figura 18. Curva estándar del ácido clorogénico estimada por HPLC.

**Anexo-III. Curva de calibración para el ácido cafeico por HPLC.**

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia (mUA)	Tiempo retención (min)
1	6,371	23,0043
2	11,510	22,9259
3	18,046	22,9342
4	25,036	22,8842
5	30,164	22,8975
6	35,718	33,8975

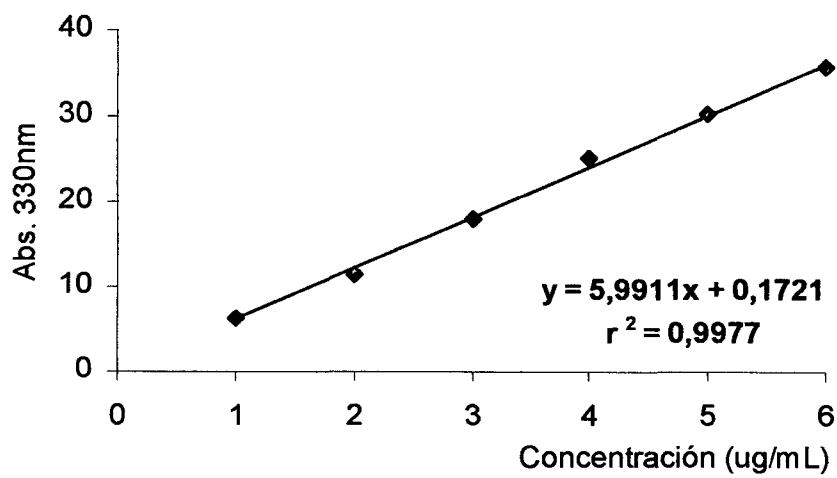
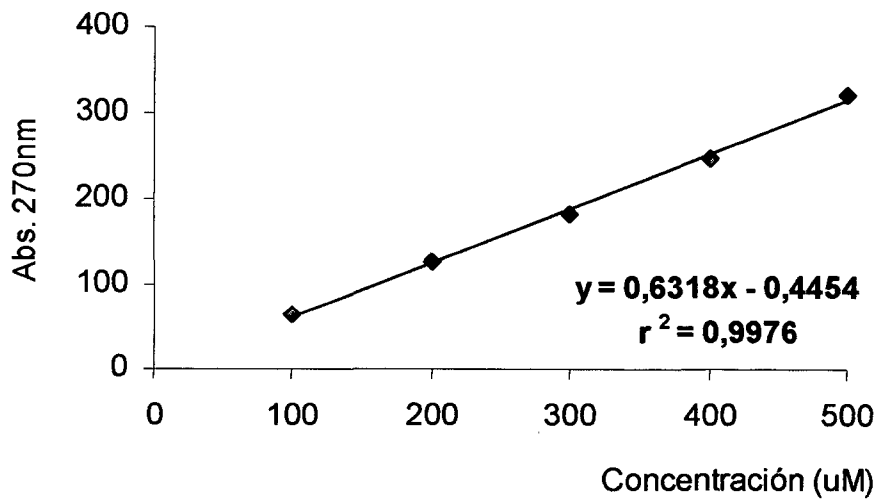


Figura 19. Curva estándar del ácido cafeico estimada por HPLC.

**Anexo-IV. Curva de calibración para la cafeína por HPLC.**

<b>Concentración (µM)</b>	<b>Absorbancia (mUA)</b>	<b>Tiempo retención (min)</b>
100	65,892	10,5026
200	126,856	10,5042
300	183,678	10,5042
400	247,634	10,5059
500	321,398	10,5026



**Figura 20. Curva estándar de la cafeína estimada por HPLC.**

**Anexo-V. Curva de calibración para polifenoles.**

<b>Concentración (µM)</b>	<b>Absorbancia (mUA)</b>
10000	2,109
3000	0,685
1000	0,224
300	0,062
100	0,017
30	0,001

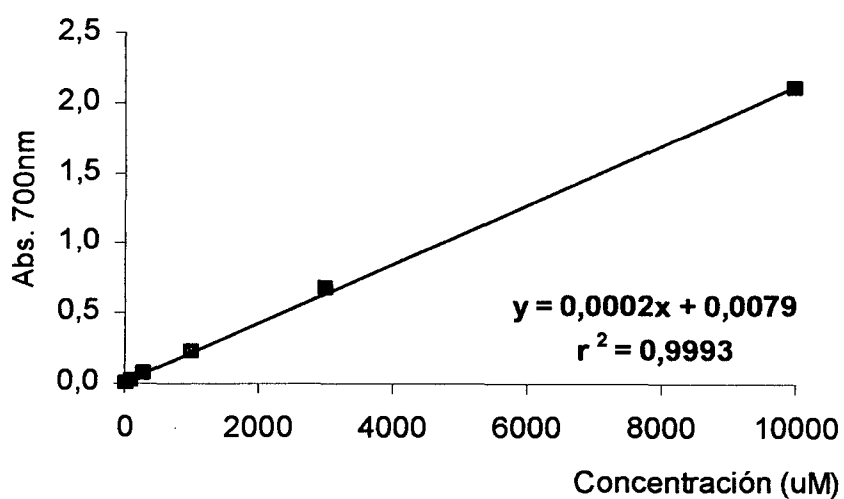


Figura 21. Curva estándar de polifenoles estimada.

**Anexo-VI. Análisis estadístico para el contenido de ácido clorogénico.**

**a. Análisis de varianza de acuerdo a la condición de grano y variedad.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Condición	1	25034,4	25034,4	51295,81	Sig.
Variedad	2	1792,44	896,218	1836,36	Sig.
CondiciónxVariedad	2	2201,9	1100,95	2255,86	Sig.
Error experimental	12	5,85648	0,48804		
Total	17	29034,6			

**b. Análisis de varianza de acuerdo a los tratamientos.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamiento	5	29028,8	5805,75	11896,05	Sig.
Error experimental	12	5,85648	0,48804		
Total	17	29034,6			

**Anexo-VII. Análisis de varianza para el contenido de ácido cafeico.**

**a. Análisis de varianza de acuerdo a la condición de grano y variedad.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Condición	1	29,5629	29,5629	5980,56	Sig.
Variedad	2	3,12231	1,56116	315,82	Sig.
CondiciónxVariedad	2	7,80501	3,9025	789,47	Sig.
Error experimental	12	0,059318	0,00494317		
Total	17	40,5496			

**b. Análisis de varianza de acuerdo a los tratamientos.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamiento	5	40,4902	8,09805	1638,23	Sig.
Error experimental	12	0,059318	0,00494317		
Total	17	40,5496			



**Anexo-VIII. Análisis de varianza para el contenido de cafeína.**

**a. Análisis de varianza de acuerdo a la condición de grano y variedad.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Condición	1	96,2763	96,2763	392,56	Sig.
Variedad	2	83,9794	41,9897	171,21	Sig.
CondiciónxVariedad	2	43,2409	21,6205	88,16	Sig.
Error experimental	12	2,94303	0,245253		
Total	17	226,44			

**b. Análisis de varianza de acuerdo a los tratamientos.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamiento	5	223,497	44,6993	182,26	Sig.
Error experimental	12	2,94303	0,245253		
Total	17	226,44			

**Anexo-IX. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales.**

**a. Análisis de varianza de acuerdo a la condición de grano y variedad.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Condición	1	1205,27	1205,27	646,55	Sig.
Variedad	2	38,1971	19,0985	10,25	Sig.
CondiciónxVariedad	2	21,4524	10,7262	5,75	Sig.
Error experimental	12	22,3698	1,86415		
Total	17	1287,29			

**b. Análisis de varianza de acuerdo a los tratamientos.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamiento	5	1264,92	252,985	135,71	Sig.
Error experimental	12	22,3698	1,86415		
Total	17	1287,29			

**Anexo-X. Análisis de varianza para el coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub> frente al radical DPPH.**

**a. Análisis de varianza de acuerdo a la condición de grano y variedad.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Condición	1	700,294	700,294	372,79	Sig.
Variedad	2	347,573	173,786	92,51	Sig.
CondiciónxVariedad	2	1471,96	735,98	391,79	Sig.
Error experimental	48	90,1694	1,87853		
Total	53	2610,0			

**b. Análisis de varianza de acuerdo a los tratamientos.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamiento	5	2519,83	503,965	268,28	Sig.
Error experimental	48	90,1694	1,87853		
Total	53	2610,0			

**Anexo-XI. Análisis de varianza para el coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub> frente al radical peroxilo.**

**a. Análisis de varianza de acuerdo a la condición de grano y variedad.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Condición	1	142,308	142,308	177,93	Sig.
Variedad	2	9,71612	4,85806	6,07	Sig.
CondiciónxVariedad	2	0,0692038	0,034602	0,04	No Sig.
Error experimental	48	38,3895	0,799781		
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>190,483</b>			

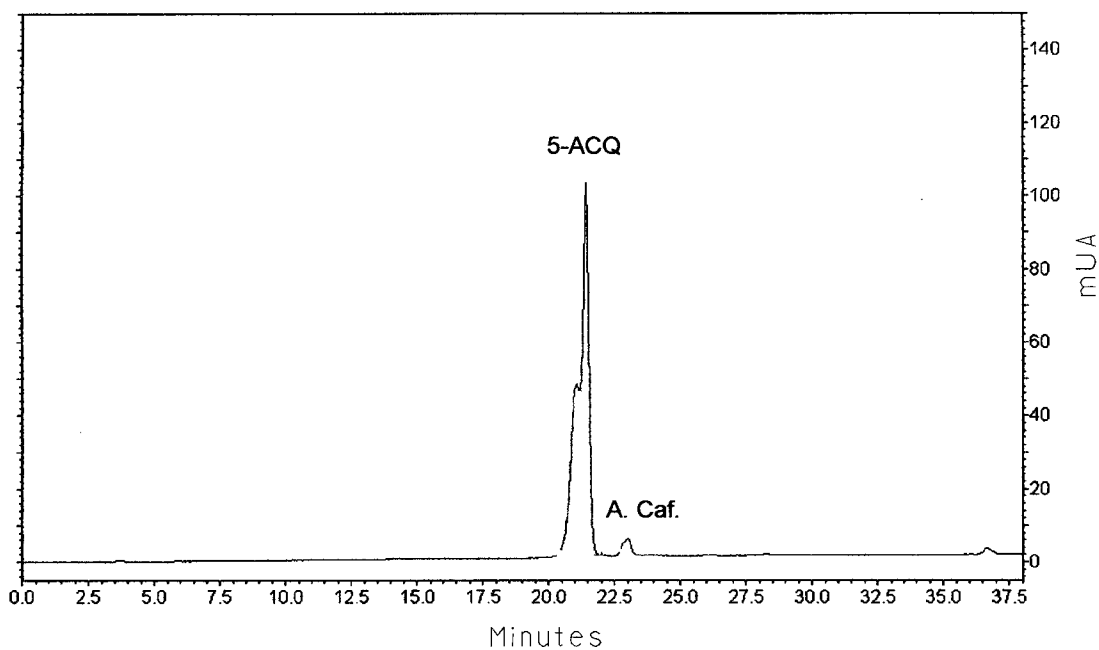
**b. Análisis de varianza de acuerdo a los tratamientos.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>g. l</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamiento	5	152,093	30,4186	38,03	Sig.
Error experimental	48	38,3895	0,799781		
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>190,483</b>			

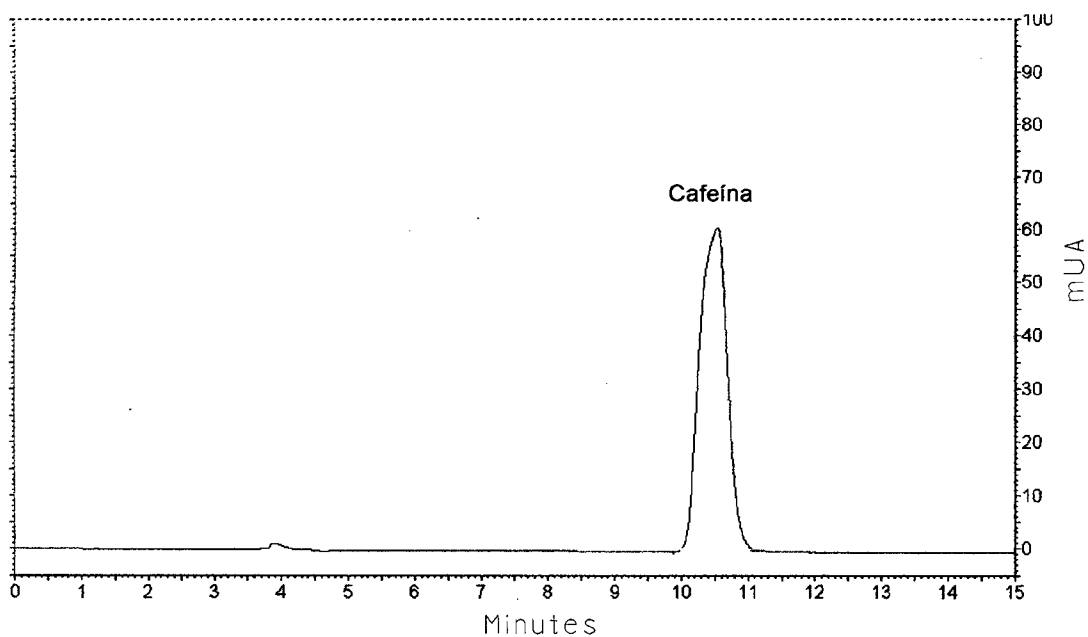
**Anexo-XII. Porcentaje de humedad para las variedades de café.**

<b>Variedad</b>	<b>Verde</b>	<b>Tostado</b>
Caturra	11,514 ± 0,444	2,446 ± 0,122
Bourbón	10,873 ± 0,195	2,430 ± 0,125
Typica	10,778 ± 0,233	2,708 ± 0,351

**Anexo-XIII. Cromatograma de los ácidos clorogénico (5-ACQ) y cafeico.**



**Figura 22. Cromatograma del estándar de los ácidos clorogénico (5-ACQ) y cafeico determinada por HPLC.**



**Figura 23. Cromatograma del estándar cafeína determinada por HPLC.**