

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN BEBIDAS DE CAFÉ DURANTE SU PERÍODO DE VIDA ÚTIL USANDO MÉTODOS *IN-VITRO* Y *EX-VIVO*

STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY CHANGES OF COFFEE BEVERAGES DURING ITS SHELF LIFE USING *IN-VITRO* AND *EX-VIVO* METHODS

Julián LONDOÑO L.¹, Mauricio NARANJO C.², Mónica M. QUINTERO O.^{2*}

Recibido: Enero 16 de 2013 Aceptado: Septiembre 11 de 2013

RESUMEN

Antecedentes: Los antioxidantes se han convertido en uno de los conceptos comerciales de mayor impacto en el mercado de los alimentos funcionales; sin embargo, su declaración resulta ser un tema controvertido entre los entes regulatorios a nivel global debido a la complejidad que comprende demostrar la presencia y bioactividad de éstos en un alimento. En este contexto, investigaciones recientes en el café han atribuido propiedades antioxidantes a su bebida. **Objetivo:** El objetivo de este estudio fue determinar por métodos *in-vitro* que las bebidas de café contienen sustancias fenólicas, las cuales pueden actuar como antioxidantes, y evaluar cómo su bioactividad puede variar en el tiempo. **Métodos:** Se evaluaron 48 productos de café en dos tiempos de almacenamiento, a saber, al inicio y al final de la vida útil del producto, determinando su contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante por captura de los radicales ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etyl benzotiazolin -6-sulfonato de amonio) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo); además, se determinó por FRAP la actividad reductora del hierro férrico con el fin de establecer el contenido de fenoles antioxidantes a declarar en la etiqueta. **Resultados:** El contenido de polifenoles antioxidantes fue diferente según el tipo de café, los cafés tostados presentaron $328,61 \pm 31,35$ mg Equivalentes de Ácido Gálico por cada 100 mL de bebida y los cafés solubles $297,17 \pm 68,48$. Los resultados obtenidos por los métodos de ABTS, DPPH y FRAP mostraron, por medio de un análisis de componentes principales, que éstos se correlacionan entre sí y que el tiempo de almacenamiento tiene efecto sobre la actividad antioxidante de los productos. Se evaluó la actividad antioxidante *ex-vivo* en una bebida de café tostado y en otra de café soluble mediante el ensayo de peroxidación lipídica de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL), lográndose evidenciar que estas evitaron la oxidación de la LDL, conforme los contenidos anteriores. **Conclusiones:** Con los resultados obtenidos se determinó la especificación para la declaración del contenido de sustancias antioxidantes en los productos de café. Con este estudio se mostró que estos métodos de análisis podrían ser considerados para demostrar la bioactividad de los productos de café y su estabilidad en el tiempo.

Palabras clave: Café, fenoles totales, antioxidante, vida útil.

¹ Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos – GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista – Caldas, Colombia.

² Centro de Investigación & Desarrollo –COLCAFE. Industria Colombiana de Café SAS. A.A. 625. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: mquintero@colcafe.com.co.

ABSTRACT

Background: Antioxidants have been one of the commercial concepts with highest impact in functional food market; however, their statement turns out a controversial topic among regulatory agencies worldwide, due to the complexity involved in demonstrating the presence and bioactivity of these antioxidants in the food. In this context, recent researches have attributed antioxidant properties to coffee beverages.

Objectives: The aim of this work was to determine by in-vitro methods that coffee beverages contain phenolic substances, which may act as antioxidants, as well as evaluate how this activity can vary over time.

Methods: 48 Coffee products were evaluated at two storage time conditions, namely, at the beginning and the end of their shelf life, determining the total phenolic content and their antioxidant activity by ABTS (radical capture of 2, 2 '-azino-bis-(3-ethyl benzotiazolin -6 - ammonium sulfonate) and DPPH (Capture the radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidracilo); FRAP was also determined to know the ferric iron reducing activity. The objective of the above was to establish the content of phenolic antioxidant to be declared on the label. **Results:** The content of antioxidant polyphenols was different depending on the coffee type; the content was 328.61 ± 31.35 and 297.17 ± 68.48 mg gallic acid equivalents per 100 mL of beverage in roasted and soluble coffees respectively. The results obtained by the methods of ABTS, DPPH and FRAP showed through a principal components analysis that they are correlated with each other and that the storage time has an effect on the antioxidant activity of the products. Additionally, the ex-vivo antioxidant capacity was evaluated on two samples, roasted and soluble coffee beverages by the lipid peroxidation assay of the Low Density Lipoprotein (LDL); it was found that coffee beverages prevent the LDL oxidation, according to the results of polyphenols contents. **Conclusions:** The results allowed establishing the specifications of the content of antioxidants in coffee products to be declared on the label. This study shows that with these analysis methods the bioactivity of coffee products and its stability over time can be demonstrated.

Keywords: Coffee, total phenolics, antioxidant, shelf life.

INTRODUCCIÓN

El café es el segundo producto básico a nivel mundial después del petróleo con un consumo de 138,9 millones de sacos para el 2012, de los cuales 5,4 millones fueron producidos en Colombia de la variedad arábica, la cual es apreciada como café suave con excelentes características sensoriales. En los últimos años las investigaciones le han atribuido propiedades antioxidantes al café (1-4). Las tendencias del mercado de café han permitido que el 3% de los lanzamientos en el 2011 hayan sido bajo el concepto de funcionales, lo cual ha generado también el aumento en el número de investigaciones y patentes en el mundo. Muchas de las investigaciones se han enfocado en el desarrollo de técnicas y comprobación de las propiedades funcionales de los alimentos; sin embargo, en un número menor se han publicado investigaciones relacionadas con la estabilidad de las sustancias activas presentes en los productos de café, ya que por lo general este parámetro es fijado por la pérdida de características sensoriales o de calidad microbiológica del producto. A nivel mundial se ha dado una controversia entre los entes regulatorios en cuanto a la declaración de sustancias

antioxidantes en los alimentos, debido a lo complejo que resulta demostrar su presencia y bioactividad en ellos (5). En los últimos años, las investigaciones han propuesto al café como un alimento con características antioxidantes por su contenido de sustancias fenólicas y la bio-actividad que estas poseen; además, se han publicado numerosos estudios de caracterización de las propiedades antioxidantes del café por métodos *in-vitro*, *ex-vivo* e *in-vivo*, así como la identificación de las sustancias activas en la bebida (2-4, 6-9). El contenido de fenoles totales en una bebida de café con un volumen de 200 mL puede estar entre 200 y 500 mg, de los cuales 70 a 350 mg corresponden a ácidos clorogénicos (10), identificados como las sustancias responsables de la actividad antioxidante y que se relacionan con la protección de macromoléculas y la inhibición de la peroxidación lipídica, hecho que permite minimizar el riesgo de desencadenar enfermedades cardiovasculares (11-13).

Si bien existen publicaciones relativas a los beneficios del consumo de bebidas de café, no se han encontrado investigaciones que permitan determinar la estabilidad de las sustancias antioxidantes en

los productos de café bajo condiciones de comercialización, pues la mayoría desarrollan los análisis sobre los alimentos frescos e incluso bajo rigurosos protocolos de almacenamiento a bajas temperaturas que eviten la oxidación de los componentes activos que van a ser objeto de la declaración en el etiquetado. No obstante, los organismos de regulación exigen estudios de estabilidad de las sustancias a declarar en la etiqueta puesto que las proclamas rotuladas deben ser veraces durante toda la vida útil del alimento (5).

El objetivo de este estudio fue caracterizar las propiedades antioxidantes en diferentes productos de café encontrados en el mercado colombiano, determinando el contenido de sustancias fenólicas y evaluando la actividad antioxidante por medio de los métodos de captura de los radicales ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin -6- sulfonato de amonio) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo); además, se analizó la actividad reductora del hierro férrico / poder férrico por FRAP. Estos métodos han sido reportados ampliamente en la bibliografía (2, 4, 6, 14-16). Los productos para análisis fueron seleccionados de acuerdo a las fechas de producción de tal forma que se tuvieron recién producidos y próximos a la fecha de caducidad, con el fin de determinar el contenido total de antioxidantes que puede ser declarado como parte de la composición garantizada del producto después de haber pasado por la cadena logística de distribución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las muestras

La producción de café a nivel industrial comienza con la adecuación del grano, el cual consiste en los procesos de recolección, despulpe, separación y trillado. Una vez el grano de café es apto para procesamiento pasa a la primera etapa industrial donde es tostado por medio de diversas curvas de tueste, en las cuales se involucran variables como tiempo y temperatura para obtener un grado de tueste que corresponde a un perfil de taza.

Posteriormente, el café tostado y molido es alimentado a la planta de extracción en la cual se realiza la separación de los sólidos insolubles y solubles del café, los cuales se extraen por medio del control de variables como temperatura, presión y carga de café molido. Una vez es obtenido el extracto de café (mezcla de agua y sólidos solubles de

café), conteniendo un 80% de agua, se concentra por medio de evaporación o crio-concentración hasta eliminar un 50% de ésta, para finalmente someter el extracto al proceso de secado que puede ser en un sistema de atomización mediante la evaporación del agua o mediante el proceso de liofilización para obtener el producto seco y soluble.

Considerando esta descripción del procesamiento del café y las variables que intervienen en éste, se tomó los criterios para clasificación de las muestras. Se seleccionó en total 48 productos de café, de los cuales 28 correspondían a cafés tostados y molidos y otros 20 a cafés solubles. Los tostados y molidos fueron de Café Arábigo Colombiano y clasificados en dos calidades de materia prima denominada café tipo mezcla (R) o Café tipo Excelso (E) y clasificados en 4 grados de tueste siendo el más claro (1) y (4) el más oscuro, denominado tipo espresso. De los cafés solubles se seleccionó 20 productos que cubrieran diferentes presentaciones comerciales de acuerdo a características de procesamiento: cafés secados por atomización (polvo) con cafeína natural (P) y descafeinado (PD), aglomerados (AGL), cafés liofilizados (LIO) y café soluble tipo espresso (CSESP).

Para todos los productos se consiguió productos recién producidos (inferior a 1 mes) y cercanos al cumplimiento de su vida útil (según lo establecido por el fabricante en el empaque), estos fueron denominados como T0 y T1, respectivamente. En la tabla 1 se muestra la descripción detallada de las muestras analizadas y en la tabla 2 los resultados analíticos.

Tabla 1. Descripción de los productos de café analizados.

Descripción de la muestra	Denominación
Cafés Tostados	Café tostado de grado de tueste 1 y café tipo mezcla
	CTG1R
	Café tostado de grado de tueste 2 y café tipo mezcla
	CTG2R
	Café tostado de grado de tueste 3 y café tipo mezcla
	CTG3R
	Café tostado de grado de tueste 1 y café tipo excelso
Cafés solubles	CTG1E
	Café tostado de grado de tueste 2 y café tipo excelso
	CTG2E
	Café tostado de grado de tueste 3 y café tipo excelso
	CTG3E
	Café tostado de grado de tueste 4 y café tipo excelso
	CTG4E
Café soluble secado por atomización (Polvo)	CSP
Café soluble secado por atomización descafeinado	CSPD
Café soluble Aglomerado	CSAGL
Café soluble Espresso	CSESP
Café soluble Liofilizado	CSLIO

Preparación de las muestras

Cada producto se evaluó preparando las bebidas de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta, en el caso de los cafés tostados se pesó 30 gramos y fueron preparados en una cafetera doméstica SAMURAI Café City 12 con 500 mL de agua potable, sometido a una extracción durante 7 minutos.

Las bebidas de café soluble fueron preparadas con 1,5 gramos de producto al que se le adicionó 100 mL de agua a 90°C. Cada producto fue preparado por duplicado y se realizó 4 réplicas para cada análisis.

Después de preparadas las bebidas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se pesó la bebida (en cafés tostados) y se determinó el contenido de sólidos solubles de café con un refractómetro RE50 (Mettler Toledo, Columbus, USA).

Se tomó una alícuota de cada bebida y se determinó el contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteau y se evalúo la capacidad para estabilizar radicales libres por los métodos de ABTS (radical 2,2'-azino-bis-(3-etyl benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) y DPPH (Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Además se evaluó la actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante por el método de FRAP. Estas técnicas, excepto el método de *Folin-Ciocalteau*, siguen un mecanismo de transferencia de electrones para evaluar la actividad antioxidante de los extractos; todas fueron estandarizadas y se validó los parámetros de especificidad, repetibilidad y linealidad. Finalmente, se evaluó también la actividad antioxidante por un método *ex-vivo*, evaluando la capacidad de inhibir la oxidación inducida de la LDL (Low Density Lipoprotein) obtenida de plasma humano.

Contenido de fenoles totales

La capacidad reductora de las bebidas de café fue determinada siguiendo el método de *Folin-Ciocalteau* con ligeras modificaciones publicadas por Singleton (17). Se tomó una alícuota de la bebida en una dilución 1:10 v/v con agua Milli-Q, luego se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteau, se agitó y después de 2 minutos se adicionó 400 µL de una solución de carbonato de sodio al 9.9%. Pasados 60 minutos de incubación en oscuridad se determinó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro UV-VIS Biomate 3S (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) a 765 nm. La absorbancia de la muestra fue comparada contra una curva de ácido gálico (AG) usado como referencia, los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de AG por 100 mL de bebida de café.

Ensayo de la actividad captadora de radicales libres por el método ABTS

La actividad antioxidante fue realizada con el radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etyl benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) siguiendo el procedimiento descrito por varios autores (6, 8, 18) con algunas modificaciones de Floegel et al., 2011 (19). En primer lugar, se diluyó la bebida preparada en un rango de 30-50%, luego se tomaron 10 µL de esta dilución y se adicionaron 990 µL de la solución del radical catiónico ABTS^{•+}, y se incubaron en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de $\lambda = 732$ nm en un espectrofotómetro UV-VIS Biomate 3S (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA); ésta se comparó contra la absorbancia del antioxidante de referencia (Trolox, análogo soluble en agua de la vitamina E) en un rango de concentración de 5 a 10 mM. Los resultados se expresaron como valores TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox, por sus siglas en inglés).

Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante (Ensayo FRAP)

Para el ensayo de FRAP se siguió el método referenciado por Cao et al., 2011 (4) y Vignoli et al., 1998 (20), con algunas modificaciones reportadas por Moreira et al., 2005 (21). Se tomó 100 µL de la muestra y se mezcló con 900 µL de solución 10 mM de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) y 20 mM de cloruro férrico FeCl₃.6H₂O en buffer de acetato de sodio 300mM a pH=3.6. La muestra se incubó en la oscuridad por 60 minutos y se monitoreó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Scientific Biomate 3S (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) a $\lambda = 593$ nm. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en una curva de calibración construida con ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Saint Louis Mo, USA) como estándar, en los rangos de concentración de 100-1000 µM. La actividad de las muestras en estudio se expresaron como valor FRAP (μ mol equivalente de Ácido ascórbico (AA)/ 100 mL de bebida).

Ensayo de estabilización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

El ensayo se fundamenta en la disminución de la absorbancia de soluciones del radical DPPH[•], como consecuencia de la donación de un electrón por un compuesto con poder antioxidante (4, 18, 19). Para este ensayo se tomaron 10 μ L de la bebida diluida y se le adicionaron 990 μ L de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]), se incubó en oscuridad por 30 minutos y se monitoreó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Biomate 3S (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA), para compararse con la curva de calibración de Trolox que se construyó en un rango de concentración de 0,1 a 100 μ M. Los resultados fueron expresados como valores μ Mol equivalentes de Trolox por 100 mL de bebida.

Método *ex-vivo*: TBARS para determinar la peroxidación lipídica en LDL

Se tomaron 1,66 g de la bebida de café y se diluyeron hasta 100 mL con agua a 90°C. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C y fueron diluidas en agua destilada en proporciones de 1/10, 1/100 y 1/1000. Como control positivo de inhibición de la oxidación se empleó Butil hidroxitolueno (BHT) a 1 mg/mL. Para evaluar la inhibición de la peroxidación lipídica se utilizó el método TBARS (Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés), el cual mide la generación de productos de degradación en una matriz grasa sometida a oxidación (22). En este caso, se evaluó la inhibición de la oxidación de la LDL por considerarse un marcador característico de estrés oxidativo relacionado con la aparición de enfermedades cardiovasculares (22). La LDL fue aislada de plasma humano por ultra-centrifugación, aplicando gradiente discontinuo de densidad en un equipo Beckman XL-100 con rotor SW-55Ti y tubos ultraclear de 5 mL. (Ted Wilsona).

Oxidación controlada de LDL¹

El efecto protector del extracto de café a diluciones 1/10; 1/100; 1/1000 sobre la LDL nativa (nLDL) sometida a oxidación fue realizado siguiendo el procedimiento propuesto por Tu *et al.*, 2007 (23) con algunas modificaciones; la nLDL (500 μ g/mL)

fue pre-tratada con cada una de las muestras por 15 minutos, seguidamente se adicionó a la mezcla el agente oxidante sulfato de cobre CuSO₄ (100 μ M) y se continuó con incubación a 37°C durante 90 minutos. La oxidación se detuvo por la adición de 25 μ L de una solución 1% de EDTA y por enfriamiento en un baño de hielo durante 15 minutos.

Movilidad Electroforética Relativa (MER)

El daño de la fracción proteica de la nLDL por la oxidación (oxLDL) se evaluó cualitativamente a través de la MER de su apolipoproteína B100 modificada (ApoB100), utilizando electroforesis en gel de agarosa (120 V por 1 hora) y Sudan Black B como agente revelador de las bandas.

TBARS

Las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico fueron medidas espectrofotométricamente. Para esto, se adicionó a la mezcla de reacción 1 mL de una solución que contiene 0.67% de TBA (Ácido Tiobarbitúrico), 15 % TCA (Ácido Tricloroacético) y 0.1N de HCl. El cromóforo es formado con calentamiento a 95°C. Las lecturas de tres experimentos independientes fueron realizadas a 532 nm y los resultados son expresados en μ M de malondialdehído (MDA), usando una curva de estándar.

Métodos Estadísticos

Todos los datos fueron analizados con el software MINITAB V14. A los datos se les aplicó Análisis de Componentes Principales (PCA) para la caracterización de las muestras y se obtuvo la matriz de correlación de Pearson para relacionar las variables. Para fijar la especificación del contenido de sustancias fenólicas al final del tiempo de vida útil, que podría ser considerado para colocar en una etiqueta, se realizó Análisis de Varianza (ANOVA) y niveles de confianza del 95% para la media para los cafés tostados y los solubles.

RESULTADOS

Métodos para caracterizar la actividad antioxidante de las bebidas

Para la caracterización de la actividad antioxidante, a los resultados de Fenoles, ABTS, DPPH y FRAP se les aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) y se identificó la correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante. Los dos

¹ El ensayo de la LDL fue realizado en las instalaciones de Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) de la Universidad de Antioquia, siguiendo los lineamientos éticos para la obtención de la LDL humana con la firma del consentimiento informado por parte del donante.

primeros componentes (CP1 y CP2) explicaron el 80,2% de la variabilidad total. El CP1 determinó la clasificación por el tiempo de almacenamiento de los productos, lo cual implicó una clara diferenciación en las muestras analizadas, clasificándolas en dos grupos, uno correspondiente al T0 y el otro al T1; sin diferenciarse por el tipo de reacción que siga el método de actividad antioxidante. En la Figura 1-A) se puede observar que el contenido de Fenoles presenta una correlación moderada con los otros métodos ABTS, FRAP Y DPPH, pero débil con el tiempo. Esta correlación es calculada por medio de una matriz de correlación ($r = 0,534$; $r = 0,564$; $r = 0,557$). Por el contrario, el método ABTS presentó una correlación moderada con el tiempo ($r = 0,613$).

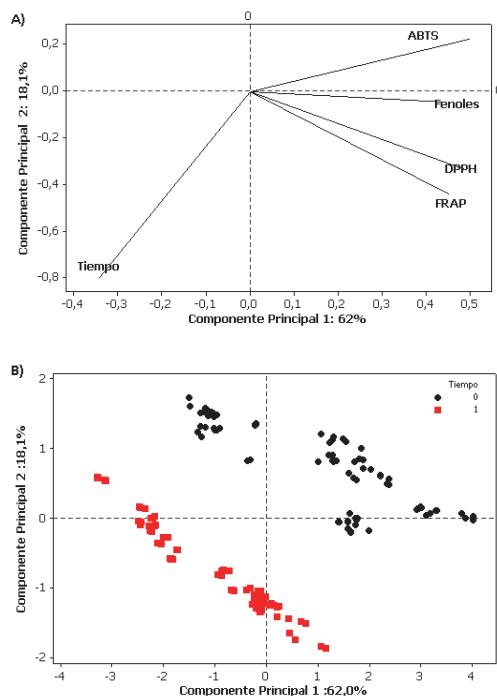


Figura 1. Análisis de componentes principales de la actividad antioxidante en los productos de café.

Los resultados en la Figura 1- A) permiten afirmar que el método ABTS es más sensible a los cambios en la actividad antioxidante debido al almacenamiento; esto se debe probablemente a que los componentes responsables de la actividad antioxidante que son detectados por este método son los más susceptibles de sufrir daño a través del tiempo.

Especificación del contenido de sustancias fenólicas antioxidantes en café

Con el objetivo de definir la especificación del contenido de sustancias fenólicas antioxidantes en el producto, se realizaron varias pruebas ANOVA con

los resultados obtenidos para cada muestra, determinando si los productos evaluados eran iguales o se podrían agrupar por categorías. El resultado arrojó que hay diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de cafés tostados y molidos versus las muestras de cafés solubles (Valor - p = 0,00); por tanto se definió la especificación por separado.

Cafés tostados

Para el contenido de fenoles en las bebidas de cafés tostado se encontró que hay diferencia estadísticamente significativa (Valor - p=0,00) para el producto (materia prima y grado de tueste) y el tiempo de almacenamiento, en concordancia con algunas investigaciones que han publicado que el grado de tueste tiene efecto en la actividad antioxidante del café (4); estas diferencias probablemente se refieren a muestras frescas en las cuales no se ha evaluado el cambio debido al tiempo de almacenamiento durante el cual se pueden dar reacciones que generen compuestos de tipo fenólico que si bien son positivos para el método de Folin-Ciocalteau, no aportan a la actividad antioxidante de la bebida. Los métodos ABTS, DPPH y FRAP, que determinan la actividad antioxidante, mostraron en el análisis de varianza una diferencia estadísticamente significativa por efecto del tiempo.

Para determinar el contenido de sustancias fenólicas a ser declarado se calculó un nivel de confianza para la media de cada variable con una confiabilidad del 95%.

El contenido de sustancias fenólicas en los productos tostados está en el rango de 322,80 a 334,42 mg equivalentes de ácido gálico/ 100 mL de bebida. En la tabla 2 se presentan los resultados de capacidad antioxidante para cada tipo de producto en los tiempos 0 y 1, y en la tabla 3 se presenta el resumen estadístico.

Cafés solubles

A los datos de cafés solubles se aplicó análisis de varianza ANOVA y se encontró, con una confianza del 95%, que hay diferencia estadísticamente significativa (Valor-p = 0) en los resultados del contenido de Fenoles Totales, ABTS, DPPH y FRAP por efecto del tiempo, y se puede observar en la tabla 3.

Al igual que para los cafés tostados, se calculó el nivel de confianza del 95% para la media, encontrando que el contenido de sustancias fenólicas está en un rango de 282.16 a 312.18 mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de bebida. En la tabla 3 se puede observar el resumen de los datos estadísticos.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos para cada producto según el tiempo de análisis con su respectiva media y desviación estándar.

Tipo de producto	PRODUCTO	TIEMPO	n	Fenoles (mg / 100 ml)		ABTS (µMol Trolox/ 100 ml)		DPPH TEAC (µMol / 100 ml)		FRAP (µMol/ 100 ml)	
				Media	s	Media	s	Media	s	Media	s
TOSTADOS	CTG1R	0	8	333.26	0.91	5202.60	68.00	3513.80	0.00	5542.00	3.28
		1	8	305.04	0.29	3296.20	66.40	2150.00	320.00	5526.70	2.09
	CTG2R	0	8	396.62	7.99	5322.90	99.00	2469.00	177.80	5671.60	140.40
		1	8	339.48	1.94	3342.00	50.80	1946.00	10.00	6191.10	130.50
	CTG3R	0	8	344.63	15.16	4817.30	100.50	2459.30	143.50	4412.30	26.40
		1	8	302.39	13.31	2705.80	160.20	1205.20	43.30	4417.90	13.50
	CTG1E	0	8	315.24	0.30	4579.00	1030.00	2760.00	409.00	6184.10	150.70
		1	8	304.60	20.20	2760.00	108.80	1331.80	43.00	5333.00	489.00
	CTG2E	0	8	330.96	0.58	4581.00	1052.00	3334.00	230.20	6445.90	69.40
		1	8	323.90	29.40	3014.60	22.30	2724.60	80.40	5529.00	361.00
	CTG3E	0	8	358.47	12.68	4966.00	96.10	2739.20	82.30	5049.60	10.30
		1	8	304.77	8.33	3099.50	94.30	1883.60	75.80	5577.80	52.20
	CTG4E	0	8	354.38	4.93	3138.00	398.00	2550.00	338.00	5613.00	318.00
		1	8	286.80	33.20	2757.00	16.30	2173.50	37.20	4788.70	38.20
SOLUBLES	CSP	0	8	245.91	3.72	3424.00	99.20	2043.10	10.50	4807.30	51.00
		1	8	217.01	5.70	2672.10	0.00	1514.00	368.00	4275.00	554.00
	CSPD	0	8	441.19	13.30	3800.60	149.40	2579.70	42.50	5892.70	7.00
		1	8	316.39	2.93	2666.30	6.26	1347.00	45.90	5260.70	29.10
	CSAGL	0	8	250.24	9.83	3316.20	100.50	2587.30	45.60	5404.00	335.00
		1	8	232.56	6.28	3197.60	23.80	1529.20	72.60	4883.10	109.10
	CSESP	0	8	389.58	1.59	3386.00	515.00	3691.00	9.37	5435.00	343.00
		1	8	307.55	19.26	1896.40	5.42	1686.20	207.60	2529.20	2.52
	CSLIO	0	8	294.64	6.57	3352.70	216.30	2060.80	89.10	4691.50	200.60
		1	8	276.60	1.34	2373.50	111.60	1901.30	110.40	4484.00	28.00

Fenoles Totales: Contenido de fenoles totales por Folin- Cioacalteu expresados en mg equivalentes de ácido gálico por 100 mL de bebida.**ABTS:** Capacidad captadora de radicales ABTS^{•+} expresados en µM equivalentes de Trolox (TEAC) por 100 mL de bebida. **DPPH:** Capacidad captadora de radicales DPPH[•] expresados en µM equivalentes de Trolox (TEAC) por 100 mL de bebida. **FRAP:** Actividad reductora del hierro férrico expresado en µmol equivalente de Ácido ascórbico/ 100 mL de bebida.**Tabla 3.** Resumen de los análisis estadísticos realizados en las muestras con su respectiva media y desviación estándar.

Tipo de producto	ANOVA					Valor medio			Nivel de Confianza (95%)	
	Variable	Factor	Valor-p	R2 (%)	R2 ajustado (%)	n	Media	Desviación Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
TOSTADOS	Fenoles	Tiempo	0,000	67,94	65,78	112	328,61	31,35	322,80	334,42
		Producto	0,000							
	ABTS	Tiempo	0,000	79,50	78,12	112	3227,20	1052,70	3032,24	3422,16
		Producto	0,000							
	DPPH	Tiempo	0,000	83,43	82,31	112	2374,30	662,40	2251,62	2496,98
		Producto	0,000							
	FRAP	Tiempo	0,002	68,68	66,57	112	5448,80	624,90	5333,07	5564,53
		Producto	0,000							
SOLUBLES	Fenoles	Tiempo	0,000	88,75	87,99	80	297,17	68,48	282,16	312,18
		Producto	0,000							
	ABTS	Tiempo	0,000	75,11	73,43	80	3008,6	585,3	2880,34	3136,86
		Producto	0,000							
	DPPH	Tiempo	0,000	74,5	72,78	80	2093,9	685	1943,79	2244,01
		Producto	0,000							
	FRAP	Tiempo	0,000	64,33	61,92	80	4766	913	4565,93	4966,07
		Producto	0,000							

Fenoles Totales: Contenido de fenoles totales por Folin- Cioacalteu expresados en mg equivalentes de ácido gálico por 100 mL de bebida.**ABTS:** Capacidad captadora de radicales ABTS^{•+} expresados en µM equivalentes de Trolox (TEAC) por 100 mL de bebida. **DPPH:** Capacidad captadora de radicales DPPH[•] expresados en µM equivalentes de Trolox (TEAC) por 100 mL de bebida. **FRAP:** Actividad reductora del hierro férrico expresado en µmol equivalente de Ácido ascórbico/ 100 mL de bebida.

Resultados de peroxidación lipídica

En la Figura 2 se puede observar el efecto concentración-respuesta (diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000) de los extractos de café tostado CTG3R (CT) y de café soluble GSP (CS) sobre la oxidación de la LDL. Los resultados se expresan en término de μM de malondialdehído (MDA), comparando la concentración de MDA en LDL nativa (nLDL) frente a la LDL sometida a oxidación controlada (oxLDL), adicionalmente se utiliza un control positivo de inhibición con el antioxidante BHT (Butil Hidroxitolueno) (0,1 mg/mL). Se puede apreciar que los extractos de café, tanto tostado como soluble, a una dilución 1/10 evitaron la oxidación de la LDL, mostrando una menor concentración de MDA, incluso por debajo de la muestra con BHT. Por su parte, para la dilución 1/100 se puede observar un mayor efecto antioxidante en el café tostado, comparado con el café soluble, lo cual denota que hay mayor presencia de sustancias activas, de acuerdo con el contenido medio de fenoles totales $328,61 \pm 31,35$ mg equivalentes de ácido gálico en café tostado y $297,17 \pm 68,48$ mg equivalentes de ácido gálico en café soluble por cada 100 mL de bebida.

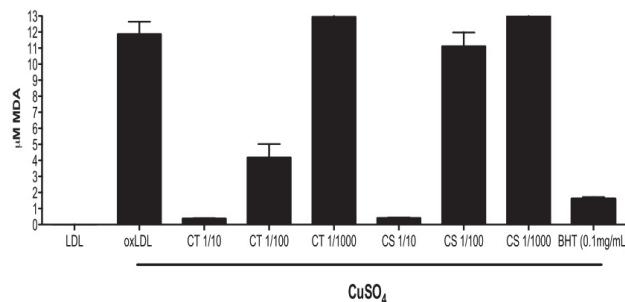


Figura 2. Resultados del efecto de concentración-respuesta para el ensayo de peroxidación lipídica.

DISCUSIÓN

Caracterización de la actividad antioxidante en las bebidas de café

Entre las sustancias fenólicas relacionadas con el aporte a la actividad antioxidante en café se encuentran los ácidos clorogénicos (12, 13), los cuales están presentes principalmente en el grano verde y se degradan a través del proceso de tueste por acción de la temperatura para dar lugar a las características sensoriales de la taza (15, 24). Investigaciones recientes han demostrado que estas

sustancias podrían estar relacionadas con el efecto antioxidante para proteger macromoléculas *in vivo* (11, 12). Vignoli *et al.*, 2011 (4), concluyeron que la actividad antioxidante depende principalmente de la composición química, incluso más que del grado de tueste. Adicionalmente, en la Figura 1-A) se observa que los métodos de FRAP y DPPH están fuertemente correlacionados entre sí ($r = 0,717$); de la misma forma también se correlacionan los métodos DPPH y ABTS ($r = 0,731$), por lo tanto en el seguimiento de la vida útil de los productos de café se podría decidir por determinar únicamente el contenido de fenoles totales y su actividad antioxidante por el método de ABTS. Sin embargo, la mayoría de los artículos que caracterizan la actividad antioxidante en las bebidas de café utilizan varias metodologías (2, 4, 6, 11, 16). La Figura 1-B) muestra la clasificación de las muestras en dos grupos, el primero corresponde a las bebidas de los productos recién producidos (T0) y el segundo grupo a los productos en la fecha de vencimiento (T1), allí se evidencia que el tiempo de vida útil influye en el contenido de sustancias fenólicas y la actividad antioxidante de las bebidas de café, lo cual aplica tanto a cafés solubles como a cafés tostados, y se constituye en una variable adicional para evaluar en los estudios de vida útil de productos con este tipo de declaración. Los resultados anteriores se validaron mediante un ANOVA, donde el tiempo fue estadísticamente significativo (Valor-p = 0,00) en el contenido de fenoles y su actividad antioxidante por ABTS, FRAP y DPPH. En este estudio los cambios durante el almacenamiento se podrían atribuir a los cambios en la composición química de los productos.

Contenido de polifenoles totales en las bebidas de café

La diferencia en el conte nido total de fenoles totales en las muestras puede ser causada por varios factores, tales como el origen geográfico de la materia prima, el tipo de procesamiento y, en el caso de los solubles, las condiciones de extracción y de secado (4). Vignoli *et al.*, 2001 (4), Hecmovic *et al.*, 2011 (14), y Farah *et al.*, 2005 (24), investigaron cómo influyen las condiciones de proceso en la composición química de los granos de café principalmente por el efecto de la temperatura, dando lugar a la degradación de los ácidos clorogénicos y a la formación de otras sustancias entre las cuales están las melanoidinas, a las cuales también se les

ha atribuido actividad antioxidante. Dados estos cambios debidos al procesamiento, el contenido de fenoles totales ha sido reportado ampliamente discriminando principalmente entre cafés tostados y cafés solubles; Sánchez-González *et al.*, 2005 (6), encontraron que el contenido de fenoles totales en bebidas de café preparadas en cafetera doméstica de un café de tueste tipo medio fue de 270 mg equivalentes de ácido gálico/ 100 mL de bebida y para cafés de tueste alto un contenido de 279 mg GAE/100 mL de bebida. En la población japonesa Fukushima reportaron diferencias en el aporte de polifenoles antioxidantes entre los cafés tostados y cafés solubles, conteniendo 210 mg equivalentes de ácido clorogénico y 225 mg equivalentes de ácido clorogénico por cada 100 mL de bebida, respectivamente. En contraste a estas investigaciones, *et al.* 2002 (3), reportó que el rango de polifenoles totales de café en una taza puede variar entre 200 -550 mg, y en una investigación en la cual evaluaron cómo influye el consumo de café en la capacidad antioxidante de plasma humano, las bebidas utilizadas en el estudio contenían 161 mg GAE por cada taza. Bonita *et al.*, 2007 (11), reportaron que una bebida de café tostado aporta 220 mg y de soluble 176 mg GAE por cada taza. En general los resultados de fenoles totales encontrados en este estudio se encuentran en los rangos reportados por las diferentes investigaciones.

Actividad antioxidante *ex-vivo* por TBARS

Los resultados obtenidos del ensayo *ex-vivo* TBARS para determinar el efecto en el retraso de la oxidación de las LDL concuerdan con los reportados por varios autores referenciados en la revisión de Bonita *et al.*, 2007 (11), en los cuales realizaron ensayos mediante un modelo *in-vitro* dosis-respuesta a concentraciones fisiológicas, mediante el efecto de varios antioxidantes en la oxidación de las lipoproteínas LDL y VLDL aisladas de plasma humano por medio de columnas de inmuno-afinidad y sometidas a oxidación controlada con óxido de cobre. Fueron utilizadas vitaminas como el beta-caroteno, tocoferol y ácido ascórbico, las cuales son reconocidas por su efecto antioxidante y otras como el ácido gálico, resveratrol, ácido clorogénico, ácido cafeíco, quercetina, catequina y café. Los resultados mostraron que los ácidos clorogénicos fueron mejores antioxidantes en el proceso de peroxidación lipídica de las LDL y VLDL comparadas con las vitaminas y el ácido gálico. Sin embargo, sorprendentemente el

mejor antioxidante resultó ser el café, el cual en su composición contiene ácidos clorogénicos y ácido cafeíco, atribuyendo estos resultados a la sinergia entre todos los polifenoles presentes en la bebida de café. De acuerdo con los hallazgos, estos investigadores concluyen que en condiciones fisiológicas hay dos áreas en donde las LDL son oxidadas, en el plasma y por debajo de la superficie endotelial. En el plasma las proteínas y enzimas endógenas, así como las vitaminas, inhiben la oxidación de las LDL. Sin embargo, la oxidación en el espacio sub-endotelial es más crítica en el inicio de la ateroesclerosis. De ahí que proponen que los mejores antioxidantes para evitar un episodio ateroesclerótico son aquellas sustancias que puedan unirse a las lipoproteínas de baja densidad como las LDL, lo cual parecería suceder efectivamente con los antioxidantes de café.

CONCLUSIONES

En conclusión, a través de este trabajo se demostró que las propiedades antioxidantes en los productos de café son diferentes de acuerdo con el tipo, siendo más alta en cafés tostados y molidos ($328,61 \pm 31,35$ mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de bebida) comparado con los solubles ($297,17 \pm 68,48$ mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de bebida); éstos últimos experimentan más transformaciones en su composición por efecto de las condiciones de procesamiento. Además, el tiempo de almacenamiento tiene efecto sobre la actividad antioxidante de las sustancias presentes, con lo cual se requiere incluir un nuevo parámetro de calidad en el seguimiento de la vida útil de los productos.

Con lo anterior, queda de manifiesto la importancia de incluir nuevos parámetros no considerados hasta ahora en los estudios de vida útil de productos de café en Colombia, especialmente aquellos relacionados con las declaraciones de contenido de antioxidantes.

Adicionalmente, en la concepción moderna de alimentos con declaraciones de propiedades nutricionales y de salud, es necesaria la estandarización de los productos en cuanto a su composición química, garantizando la estabilidad de los componentes bio-activos durante su vida útil, hasta llegar al consumidor final.

Este trabajo deja abierta la necesidad de caracterizar los componentes responsables de la actividad antioxidante y su posible correlación con estudios *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Industria Colombiana de Café- COLCAFÉ, a Angela M. Tilano por su apoyo en el análisis estadístico y a Colciencias por la financiación a través de la línea Bancoldex (Código 6524-517-27833).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esquivel PJ, Víctor M. Functional Properties of Coffee and coffee by-products. *Food Res Inter.* 2012 May; 46 (2): 488-495
2. Gómez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. *In-Vitro* Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their Metabolites. 2007 Aug 22; 55 (17): 6962-6969.
3. Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem.* 2002 Oct 9; 50 (21): 6211-6264.
4. Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MT. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* 2011 Feb 1; 124 (3): 863-368.
5. Griffiths JC, Abernethy DR, Schuber S, Williams RL. Functional food ingredient quality: Opportunities to improve public health by compendial standardization. *J Funct Foods.* 2009 Jan; 1 (1): 128-130.
6. Sánchez-González I, Jiménez-Escríg A, Saura-Calixto F. *In-vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem.* 2005 March-April; 90 (1-2): 133-139.
7. Richelle M, Tavazzi I, Offord E. Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving. *J Agric Food Chem.* 2001 Jul; 49 (7): 3438-3442.
8. Parras P, Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Murcia MA. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chem.* 2007; 102 (3): 582-592.
9. Bakuradze T, Lang R, Hofmann T, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, et al. Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Dec; 54 (12): 1734-1743.
10. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May; 79 (5): 727-747.
11. Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: *in-vitro*, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res.* 2007 Mar; 55 (3): 187-198.
12. Hoelzl C, Knasmüller S, Wagner KH, Elbling L, Huber W, Kager N, et al. Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Dec; 54 (12): 1722-1733.
13. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, et al. *Int J Pharm.* 2011 Jan 17; 403 (1-2): 136-138.
14. Hecimovic I, Belscak-Cvitanovic A, Horzic D, Komes D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem.* 2011 Dec 1; 129 (3): 991-1000.
15. Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Braz J Plant Physiol.* 2006; 18: 23-36.
16. Castillo MDd, Gordon MH, Ames JM. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *Eur Food Res Technol.* 2005; 221 (3): 471-477.
17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM, Lester P. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 1999; 299: 152-178.
18. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz- Rubio ME, Serrano J, Goni I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int.* 2008; 41 (3): 274-285.
19. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Comp Anal.* 2011 Nov; 24 (7): 1043-1048.
20. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.* 1998 Jun; 44 (6 Pt 1): 1309-1315.
21. Moreira DP, Monteiro MC, Ribeiro-Alves M, Donangelo CM, Trugo LC. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. *J Agric Food Chem.* 2005 Mar 9; 53 (5): 1399-1402.
22. Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc.* 2001 Feb 14; 123 (6): 1173-1183.
23. Tu YC, Lian TW, Yen JH, Chen ZT, Wu MJ. Antiatherogenic Effects of Kaempferol and Rhamnoinitrin. *J Agric Food Chem.* 2007 Nov 28; 55 (24): 9969-9976.
24. Farah A, de Paulis T, Trugo LC, Martin PR. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *J Agric Food Chem.* 2005 Mar 9; 53 (5): 1505-1513.