

**Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas**

**Informe final**

**Evaluación de la actividad antioxidante y detección de marcadores químicos en extractos de hojas y granos de siete variedades de café comercializadas en Guatemala**

Equipo de investigación

**Sully Margot Cruz Velásquez**

Nereida Marroquín Tintí

Mónica Ramos

Silvia Pinales

Guatemala, noviembre 2018

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador Programa de Ciencias Básicas

Sully Margot Cruz Velásquez  
Coordinadora del proyecto

Nereida Marroquín Tintí  
Investigadora

Mónica Ramos  
Silvia Pinales  
Auxiliares de investigación I

Otros colaboradores  
Armando Cáceres  
Laboratorio de Productos Naturales Farmaya  
Claudia García  
Asociación de Reservas Naturales Privadas

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2018. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.41. durante el año 2018 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas

Financiamiento aprobado por Digi: 2018 Financiamiento ejecutado: 193,040.00

## Índice

1. Resumen	4
2. Palabras clave	4
3. Abstract and keyword	5
4. Introducción	6
5. Planteamiento del problema	7
6. Preguntas de investigación	8
7. Delimitación en tiempo y espacio	9
8. Marco teórico	9
9. Estado del arte	19
10. Objetivo general	30
11. Objetivos específicos	30
12. Hipótesis (si aplica)	30
13. Materiales y métodos	30
14. Vinculación, difusión y divulgación	38
15. Resultados	39
16. Análisis y discusión de resultados	48
17. Conclusiones	58
18. Impacto esperado	59
19. Referencias	60

## **Evaluación de la actividad antioxidante y detección de marcadores químicos en extractos de hojas y granos de siete variedades de café comercializadas en Guatemala**

### **1. Resumen**

El café pertenece a la familia de las Rubiáceas, en la que se incluyen más de 500 géneros y alrededor de 800 especies. Las tres especies más conocidas son árabe (*Coffea arabica* L.), robusta (*Coffea robusta* L. Linden) y liberiana (*Coffea liberica* Bull ex Hiern). Guatemala es el mayor productor de café de Centroamérica, se cultiva básicamente café arábica, el cual cerca del 90%, se vende al exterior como café de calidad.

Se colectaron cuatro variedades de café proveniente de siete regiones de Guatemala con el objetivo de caracterizar la composición química y evaluar la actividad antioxidante, se realizaron extractos etanólicos por percolación con rendimientos muy promisorios para su industrialización (29.83 % en grano y 48.32 % en hoja), se determinó el contenido fenólico, cafeína, ácido clorogénico como marcadores químicos y azúcares.

Se demostró que los extractos de hojas y granos presentaron actividad antioxidante por DPPH (CI<sub>50</sub> de 0.63 y 0.81 mg/mL), ABTS (CI<sub>50</sub> de 0.92 y 1.48 mg/mL), FRAP (7.94 y 7.37 g de Fe<sup>+2</sup>/g de extracto), fenoles totales (87.50 y 90.40 µg ácido gálico/g de extracto) se cuantificó ácido clorogénico (1.04 y 4.91 %), cafeína (0.72 y 1.19 %) y azúcares (2.98 y 3.29 %) respectivamente. Dichos resultados demuestran la potencialidad de la hoja la cual puede ser aprovechada por su contenido fenólico y actividad antioxidante, un recurso poco explorado el cual puede permitir la diversificación de los productos del café y el grano con la mayor cantidad de ácido clorogénico y cafeína.

**2. Palabras clave:** cafeína, ácido clorogénico, fenoles, antioxidante, azúcares.

### 3. Abstract and keyword

The coffee belongs to the Rubiáceas family, which includes more than 500 genera and around 800 species. The three most well-known species are Arab (*Coffea arabica* L.), robusta (*Coffea robusta* L. Linden) and Liberian (*Coffea liberica* Bull ex Hiern). Guatemala is the largest producer of coffee in Central America, basically Arabica coffee is cultivated, which about 90% is sold abroad as quality coffee.

Four varieties of coffee were collected from seven regions of Guatemala to characterize the chemical composition and evaluate the antioxidant activity. Ethanol extracts were obtained by percolation with very promising results for industrialization (29.83% in grain and 48.32% in leaf), the phenolic content was evaluated caffeine, chlorogenic acid as chemical markers and sugars.

It was demonstrated that the extracts of leaves and grains presented antioxidant activity by DPPH (IC<sub>50</sub> of 0.63 and 0.81 mg / mL), ABTS (IC 50 of 0.92 and 1.48 mg / mL), FRAP (7.94 and 7.37 g of Fe + 2 / g). of extract), total phenols (87.50 and 90.40 µg gallic acid / g of extract) chlorogenic acid (1.04 and 4.91%), caffeine (0.72 and 1.19%) and sugars (2.98 and 3.29%) respectively were quantified. These results demonstrate the potential of the leaf which can be exploited for its phenolic content and antioxidant activity, a little explored resource which can allow the diversification of coffee and grain products with the greatest amount of chlorogenic acid and caffeine.

**Keyword:** caffeine, chlorogenic acid, phenols, antioxidants, sugars.

#### 4. Introducción

El café es un árbol de hoja perenne de la familia Rubiaceae, así como una de las bebidas más consumidas en el mundo (Monente, Ludwing, Irigoyen, de Peña, & Cid, 2015; Saura-Calixto & Goñi, 2006). Los granos de café verde se producen en alrededor de 70 países (Iwasa et al., 2015). Las variedades más cultivadas son *Coffea arabica* (Arabica) y *C. canephora* (Robusta), que se utilizan para la producción comercial, representando aproximadamente el 60% y el 40% del mercado mundial del grano de café, respectivamente, mientras que *C. liberica* aporta menos del 1% del café comercializado (Rodrigues, Salva, & Bragagnolo, 2015).

Se ha reportado algunos compuestos como la cafeína, trigonelina, ácido nicotínico y clorogénico, melanoidinas y diterpenos que le aportan propiedades nutricionales o funcionales asociadas principalmente a su actividad antioxidante (Patay, Bencsik, & Papp, 2016).

El café como alimento funcional reporta propiedades antioxidantes, reduce la incidencia de cáncer, diabetes y enfermedad hepática, protege contra la enfermedad de Parkinson y reduce el riesgo de mortalidad (Cano-Marquina, Tarín, & Cano, 2013). El extracto de granos de café verde muestra un efecto hipotensor en ratas (Suzuki, Kagawa, Ochiai, Tokimitusu, & Saito, 2002), reduce la grasa visceral y peso corporal, dichas propiedades están relacionadas con los compuestos bioactivos (Igho, Rohini, & Edzard, 2011).

El ácido clorogénico uno de los principales compuestos fenólicos del café verde, son conocidos por tener propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, actividades contra el cáncer y las funciones de protección del ADN (Henry-Vitrac, Ibarra, Roller, Merillon, & Vitrac, 2010; Xu, Hu, & Liu, 2012).

Los compuestos polifenólicos y el hidroxycinamato se han identificado y cuantificado en los granos de café de China, India y México (Mullen, Nemzer, Stalmach, Ali, & Combert, 2013; Smarke, Krosiakova, Gloess, & Yeretzián, 2015).

Jang y colaboradores (2014) reportaron que el ácido clorogénico puede ayudar a prevenir la degeneración retiniana.

En Guatemala se reconocen siete regiones en donde se cultiva el café, según informe de la Asociación Nacional del Café (Anacafe), sin embargo, en Guatemala se han reportado muy pocos estudios que establezcan las diferencias de composición química entre los materiales obtenidos en las diferentes regiones donde se cultiva el café.

Los granos de café se han utilizado en la industria de alimentos, cosméticos y farmacéuticos debido a su contenido de cafeína y alto contenido de polifenoles. Sin embargo en Guatemala muy pocos estudios se han realizado para determinar la calidad de los granos de café y no se ha explorado el potencial que podría representar las hojas como un subproducto derivado del cultivo.

En este estudio se pretende caracterizar químicamente los extractos de la hoja, la cual actualmente no tiene ningún aprovechamiento y extractos de granos para determinar la calidad del café que se comercializa en Guatemala y evaluar su actividad antioxidante para seleccionar las regiones más promisorias para la propuesta de nuevos productos para la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica y agroindustria.

## **5. Planteamiento del problema**

Las especies de *Coffea* son bien conocidas y se comercializan en todo el mundo, tienen un papel importante debido a su efecto farmacológico. Ocupan el segundo lugar después del petróleo en el mercado internacional y proporcionan ingresos superiores a 20 millones de familias en más de 50 países cada año (Davis, Chester, Maurin, & Fay, 2007). Las especies más comercializadas son *C. arabica*, *C. robusta* y *C. liberica* (Patay, Bencsik, et al., 2016).

La calidad de cada especie de café varía con sus variedades biológicas, su origen geográfico y su entorno climático como la altitud, temperatura, fertilización y suelo.

Los microclimas que existen en las regiones cafetaleras marcan la diferencia en las características de fragancia, aroma, acidez, cuerpo, sabor y post sabor, de los granos de café (Bertrand et al., 2012).

Recientemente, con el creciente reconocimiento de la importancia de los granos de café y beneficios potenciales para la salud de los consumidores, resulta de interés caracterizar los compuestos bioactivos, especialmente cafeína y ácido clorogénico, los cuales han sido reportado como los más importantes compuestos presentes en estos granos (Esquivel & Jiménez, 2012). Así mismo, se reconoce que existe una subutilización de las hojas del café, a pesar de los múltiples efectos beneficiosos atribuidos popularmente alrededor del mundo (Ross, 2005).

Pocos estudios se han realizado en Guatemala sobre la composición química de los granos de café y respecto a la hoja no se tiene ningún reporte de estudios previos. Además grandes cantidades de hoja son desperdiciadas por la poda al inicio del crecimiento y al final de la cosecha del café. Por lo que surgió el interés de realizar investigaciones para caracterizar químicamente los granos y hojas de las distintas regiones que se cultivan en Guatemala y evaluar su actividad antioxidante, con potencial para el desarrollo de nuevos productos y diversificar el uso que se le da tanto a los granos como a las hojas.

## **6. Preguntas de investigación**

¿Cuál es la composición química (compuestos fenólicos, azúcares, aceite y alcaloides) presente en las hojas y granos de café de las diferentes regiones de Guatemala?

¿Presentan los extractos de granos de café mayor actividad antioxidante que las hojas?

¿Es posible aprovechar las hojas y granos para la propuesta de nuevos productos para diversificar la producción de café en Guatemala?

## **7. Delimitación en tiempo y espacio**

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (Lipronat) en un periodo de once meses.

Las muestras fueron proporcionadas por siete fincas privadas, cinco pertenecientes a la Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala, cada una de ellas localizadas en diferentes regiones Tajumulco San Marcos; El Palmar Quetzaltenango; Villa Canales, Guatemala; Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa; La Democracia Huehuetenango; Salamá Baja Verapaz y Zacapa. Por conveniencia se realizó una sola colecta durante los meses de enero a marzo.

## **8. Marco teórico**

### **8.1 *Coffea arabica***

El café pertenece a la familia botánica Rubiaceae, incluyendo 450 géneros y más de 6,500 especies. La mayoría son árboles y arbustos tropicales que crecen en la capa más baja de los bosques, las especies de *Coffea* son leñosas, pero comprenden desde arbustos pequeños hasta árboles grandes de más de 10 m de altura; las hojas pueden ser de color amarillento, verde oscuro, bronce o matizado de púrpura (Patay, Nemeth, Nemeth, Filep, Vlase, & Papp 2016).

El cafeto (*Coffea arabica*) es originario de Etiopia, la primera planta de café fue introducida a Guatemala por los Jesuitas, a mediados del siglo XVII, en el periodo del Rey Carlos III. Fue utilizado como ornamental en Antigua Guatemala, se propagó a principios del siglo XIX. Fue plantado en diferentes regiones como Guatemala, Villa Nueva, Petapa, Amatitlán, Santa Rosa y Jutiapa (Wagner, 2001)

La Asociación Nacional del Café (Anacafé) estableció una clasificación del café a través de sus cualidades y características, dentro de las cuales se definieron

cinco regiones distintas de producción de café, estas son: Antigua, Atitlán, Fraijanes, Huehuetenango y Cobán. Así mismo se ha integrado el café de San Marcos y el café de Nuevo Oriente por el importante desarrollo que han tenido durante los últimos años.

- Fraijanes. Se cultiva en el municipio de Fraijanes, departamento de Guatemala a altitudes referidas entre los 3,900 a 4,900 pies s.n.m en una región de temperatura agradable y moderada durante todo el año. La combinación de los factores orográficos, geográficos y climáticos que identifican a la región de Fraijanes influye en la determinación de las características especiales del grano que es de excelente calidad y aspecto.
- Cobán. Esta región, de Alta Verapaz, está clasificada como bosque subtropical húmedo. Su clima cálido y húmedo entra desde el Caribe y propicia una lluvia que dura todo el año, con una temperatura entre 15 °C a 20 °C. Además, está rodeado de varias cadenas de montañas que producen una serie de variados micro climas que van desde el caliente tropical hasta el muy frío. Todas estas características contribuyen a que el café crezca rápidamente y se distinga por su aroma, cuerpo y acidez dignos del café fino. Se sitúa entre 4,300 y 5,000 pies s.n.m.
- Huehuetenango. Las zonas cafetaleras de Huehuetenango se encuentran entre los 4,900 y 6500 pies s.n.m, altura ideal para el cultivo del café de apreciable calidad. El ambiente donde se cultiva, se ve modificado por corrientes de vientos cálidos procedentes del Gran Valle de México, lo que permite cultivar café a alturas mayores de los 6,500 pies y producir granos de gran calidad. La ubicación dentro de la zona subtropical húmeda contribuye a que la región huehueteca produzca un café de hermosa apariencia y maduración uniforme.
- Atitlán. El café de Atitlán se cultiva en una planicie inclinada que forma una depresión donde se aloja el imponente Lago de Atitlán. Los suelos donde nace este café están formados por materiales procedentes de los volcanes Atitlán, San Pedro,

y Tolimán, lo cual favorece su crecimiento y el perfecto desarrollo de sus calidades. La producción de café de tipo Atitlán se concentra en el municipio de Sololá, departamento de Sololá. La altitud de las plantaciones oscila de 3,900 a 5,900 pies s.n.m, lo cual hace muy restringida la presencia de plagas y enfermedades que más atacan el cultivo.

- **Café de Antigua.** La región cafetalera de Antigua, en el departamento de Sacatepéquez, mantiene una temperatura de 19 °C a 22 °C durante todo el año. Antigua es un valle rodeado de montañas y volcanes en cuyas laderas de suelos volcánicos se cultivan los famosos y conocidos cafés de dicha región, a una altitud de más de 4,900 pies s.n.m, y es una de las áreas de más antigua ocupación cafetalera en el país. El micro clima particular de Antigua, templado y con una marcada definición de las épocas lluviosas y secas, influye en la maduración homogénea del fruto de alta calidad.
- **Otras Regiones.** La Asociación Nacional del Café (ANACAFE) ha redefinido su regionalización de las zonas cafetaleras integrando así el café de San Marcos el cual tiene acidez pronunciada, cuerpo equilibrado y con un excelente aroma, se cultiva a una altitud de 4,600 a 6,000 pies con una temperatura que oscila entre los 21 °C y 27 °C y la época de cosecha es entre diciembre y marzo. Otra región integrada es las del café de Nuevo Oriente, este es totalmente nuevo tiene gran aroma y acidez marcada, se cultiva a una altitud de 4,300 a 5,500 pies con una temperatura que oscila entre 18 °C y 25 °C.

En Guatemala se cultivan 276,000 ha con café, las cuales se distribuyen en 204 municipios, alrededor del 60 % de las plantaciones tiene más de 15 años. (MAGA, 2013). Existe alrededor de 90,000 productores, Las regiones que más productores tienen son: región IV (19,299 productores) región VI (16,707 productores). La menor cantidad de productores se localiza en la región VII (5,796 productores) (MAGA, 2013). Se estima un consumo local de 400,000 quintales, más

del 90 % de la producción se exporta a diferentes destinos, El rendimiento de producción promedio oscila entre 11.4 y 37.8 quintales oro/ha (MAGA, 2013).

En los tres primeros trimestres de 2017 el principal exportador de café en Centroamérica fue Honduras, con U\$ 1.222 millones, seguido de Guatemala, con U\$ 690 millones, Nicaragua, con U\$ 466 millones, Costa Rica con U\$ 284 millones, El Salvador, con US\$ 113 millones y Panamá con US\$ 21 millones. De octubre 2017 a febrero 2018, el mercado del café se ha cotizado en un rango de US\$ 116.90 a US\$ 132.70, el promedio de precios ha sido de US\$ 124.80 (Eskenasy, 2018).

En Guatemala se cultivan diferentes variedades de las dos especies comerciales, con la participación del 98.5 % de *Coffea arabica* y 1.5 % de *Coffea canephora*. Entre las variedades más cultivadas de la especie arábica, están las tradicionales que han contribuido a la producción en Guatemala en cantidad y calidad de la bebida que han permitido el posicionamiento en mercados especiales como lo son: Caturra, Catuaí, Pache, Pache Colís, Bourbón y Pacamara. Además en los últimos años se ha incrementado la siembra de variedades que poseen resistencia a la roya como los Catimores y Sarchimores, estas son variedades híbridas que se originan del cruce de 2 plantas de arábica genéticamente distintas y han servido de base para el desarrollo de las variedades comerciales conocidas con los nombres de Anacafé 90, Catimor 86-67, Costa Rica 95, Lempira, Parainema, Sarchimor, Anacafé 14, Cuscatieco, Tupi, Obata, Geisha, Castillo y Marsellesa, entre otras. En la última década se ha incrementado la siembra de la especie *C. canephora*, café Robusta, especialmente en la región del suroccidente del país, debido a que posee condiciones climáticas que requiere esta especie.

También la planta de Robusta se utiliza como porta-injerto de las variedades arábicas, con el objetivo de contrarrestar el ataque de nematodos que afectan las raíces de las plantas de café, particularmente las líneas de Robusta que seleccionó la Asociación Nacional del Café (Anacafé) y se conoce como variedad Nemaya (Velásquez, 2017).

Las plantaciones de café en Guatemala representan el bosque artificial más grande de Centroamérica. Se estima que en Guatemala se cultivan 800 millones de cafetos que reciben sombra de 38 millones de árboles, gracias a lo cual, las plantaciones de café son un gran proveedor de oxígeno y un buen fijador de carbono. Expertos han determinado que dos hectáreas de cafetal generan la misma cantidad de oxígeno producida por una hectárea de bosque tropical húmedo. Así, diariamente este gigantesco bosque cafetal vierte a la atmósfera la cantidad nada despreciable, de 5 millones de toneladas de oxígeno. No en vano pues, la selva del departamento de Petén, es considerada el pulmón surtidor de oxígeno para el cono norte del continente americano.

Los bosques de millones de cafetos y árboles proveedores de sombra, sirven, además, como corredor y refugio para aves migratorias que proceden del sur y del norte del planeta y que utilizan las copas de los árboles como vivienda temporal, muy especialmente la de los árboles de las especies localmente denominadas “cuje, chalún y cuchín”. Este fenómeno ha sido certificado por el Centro para el Estudio de las Aves Migratorias del Instituto Smithsonian de Washington, la Universidad de San Carlos de Guatemala, y la Fundación Defensores de la Naturaleza.

Adicionalmente, las características propias del café permiten que sea cultivado en laderas, terrenos inclinados y montañas, lugares que no son apropiados para otros cultivos. Esto contribuye a evitar la erosión, facilita la filtración de la lluvia y ayuda al cumplimiento normal del ciclo hidrobiológico (Wagner, 2001, Cuadras, 2017).

## **8.2 Métodos antioxidantes**

Halliwell & Gutteridge (2015), definen un antioxidante como la sustancia que cuando está presente en una concentración baja comparada con un sustrato oxidable en el medio inhibe la oxidación, bajo esta clasificación los compuestos fenólicos derivados del metabolismo secundario pueden proteger diversos órganos de la oxidación y ser considerados como antioxidantes naturales.

Según Rincón y colaboradores (2011) diversos compuestos presentes en productos vegetales tienen la propiedad de actuar como antirradicales o antioxidantes, en estos productos se ha evidenciado la presencia de los compuestos fenólicos que tienen propiedades antioxidantes. La actividad de los polifenoles se encuentra asociada a la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como son los procesos degenerativos de la memoria, los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al terminar el inicio o la propagación de la cadena de reacciones de oxidación.

Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades tales como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Kuskoski et al., 2005).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo. Una de las técnicas más aplicadas en las medidas in vitro de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. La pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas in vitro nos brinda tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo (Kuskoski et al., 2005).

Basados en la reacción química de los compuestos antioxidantes y los radicales libres la capacidad antioxidante se clasifica en dos tipos:

- a. Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): Estos ensayos miden la capacidad de donación del átomo de hidrógeno de los compuestos antioxidantes mediante una reacción de transferencia acoplada a protones, donde mide la capacidad del antioxidante de romper la cadena. Estos ensayos se basan en la reacción entre el generador de radicales sintéticos, la

molécula oxidable y un oxidante, en donde se mide la reacción cinética la cual deriva una curva. Dentro de estos se encuentran: capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC), método de la captura del radical ABTS, ensayo de crocina (CBA), parámetro antioxidante de secuestro de radicales libres (TRAP), actividad de captura de radical hidroxilo, ensayo de la capacidad inhibitoria de LPO, secuestro de radical peróxido, ensayo de inhibición de oxígeno (IOC), ensayo de fotoquemoluminiscencia (PCL), ensayo de beta caroteno-ácido linoleico.

Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET): Estos ensayos miden la capacidad de reducción de los antioxidantes. Están basados en una simple reacción redox, en la cual los compuestos reducen los radicales libres y se oxidan. La reducción por los compuestos antioxidantes resulta en el cambio de color del reactivo en el cual se correlaciona con la capacidad antioxidante, medido por cambios en la absorción. Dentro de los ensayos están:

Captura del radical libre DPPH, anión superóxido, reducción de hierro (FRAP), capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) usando ABTS, capacidad antioxidante por reducción de ion cúprico (CUPRAC), reactivo de Folin-Ciocalteu ensayos de fenoles totales, ensayo de N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina (DMPD), inhibición del radical NO, ensayo de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Dontha, 2016; Prior, Wu & Schaich, 2005).

Diversos compuestos cromógenos, como ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), DMPD (N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina), DMPO (N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina) y FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica); son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Brewer, 2011; Kuskoski et al., 2005). Estos ensayos han sido aplicados extensamente a la evaluación de frutos, vegetales, hojas, hierbas, especies, muchas investigaciones comparan el valor de diferentes alimentos los cuales pueden ser recomendados para el consumo y son considerados super

alimentos por su potencial antioxidante, los cuales tienen mayor mercadeo (Schaich, Tian, & Xie, 2015).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El método con DPPH es simple y rápido. Éste es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kuskoski et al., 2005). Estos métodos tienen ventajas y desventajas, cada método tienen sus características en función del radical, pH, tiempo, temperatura y estándares utilizados, es necesario construir curvas de calibración para generar resultados cuantitativos, por lo tanto ningún ensayo in vitro de actividad antioxidante reflejará la capacidad antioxidante total (Berker et al., 2013; Granato, et al., 2018; Tian & Schaich, 2013).

Los métodos antioxidantes in vitro y la estimación del contenido fenólico total que utilizan los ensayos colorimétricos no solo son útiles para dar idea de los posibles efectos beneficiosos sino también se utiliza para el control de calidad de productos naturales y alimentos (Farhoosh, 2018).

Adicionalmente los métodos in vitro son herramientas para estimar el impacto de los procesos convencionales y no convencionales utilizados para evitar la oxidación lipídica o extraer compuestos antioxidantes de materias primas (Hashemi, Khanegha, Fidelis & Granato, 2018).

La facilidad del uso de modelos in vitro depende del biomarcador utilizado para evaluar el estrés oxidativo del cual pueden surgir conclusiones con aplicaciones prácticas, siendo necesario demostrar los mecanismos de acción detrás de la actividad

antioxidante mostrada por los compuestos bioactivos y la toxicología para conocer las dosis seguras para el consumo (Meng, Li, Li, gan & Li, 2018). Los ensayos de la actividad antioxidante in vivo deben incluir medidas de actividad de enzimas endógenas y expresión de genes comparados con placebo, también es necesario estudios de biodisponibilidad al principio, durante y después de la digestión gastrointestinal ya que biodisponibilidad de polifenoles en general es muy baja, estos compuestos algunas veces pueden ser absorbidos en los tejidos blanco en concentraciones bajas las cuales son insuficientes para mostrar una actividad antioxidante, por lo que es evidente que la actividad antioxidante envuelve interacciones complejas entre factores intrínsecos y extrínsecos relacionados con la matriz del alimento y el organismo el cual no puede predecirse usando una simple reacción química (Gutiérrez-Grijalva, Angulo-Escalante, León-Félix, & Heredia, 2017; Granato, et al., 2018).

### 8.2.1 Método con DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método se basa en la capacidad del radical libre DPPH<sup>+</sup> para aceptar un átomo de hidrógeno (H<sup>+</sup>). El DPPH es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual ésta no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 515-517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 1, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de las propiedades antioxidantes (Alam, Bristi, & Rafiquzaman, 2012)

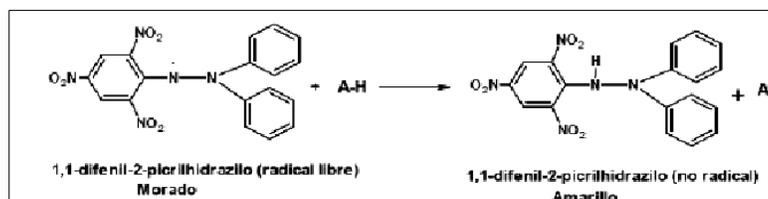


Figura 1. DPPH antes y después de reaccionar con el compuesto antioxidante.

Adaptado de Alam, Bristi & Rafiquzzman (2013).

Los resultados de este método se pueden expresar como el valor de la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ), es decir, como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor  $CI_{50}$  cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH<sup>+</sup> usado (Deng, Cheng, & Yang, 2011).

### 8.2.2 Método con ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico):

Este método consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1999). Implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión  $ABTS^+$  está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

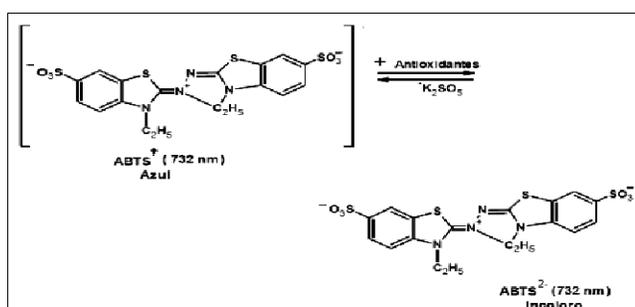


Figura 2. Reacción de ABTS

Adaptado de Zulueta, Esteve, & Frígola (2009).

### 8.2.3 Método con FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica, por sus siglas en inglés)

El método de FRAP consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (azul) que se desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe<sup>+3</sup> se reduce a TPTZ-Fe<sup>+2</sup> (Benzie & Strain, 1996). De esta forma, la capacidad antioxidante que presentan los extractos de diferentes frutas y vegetales se mide como la capacidad reductora del extracto.

La reducción del ión férrico a ferroso produce un complejo coloreado de tripiridiltriácina ferrosa. Los valores de FRAP son obtenidos comparando el campo de absorbancia a 593 nm en una mezcla de reacción que contiene iones ferrosos en concentraciones conocidas. Los cambios en la observancia son lineales sobre un amplio rango de concentración con mezclas de antioxidantes (Benzie & Strain, 1996)

## **9. Estado del arte**

Las especies de *Coffea* crecen en áreas tropicales y subtropicales, especialmente en la región ecuatorial a una altitud de 200-1,200 m y de 18-22°C, pero se ha alcanzado un rango de 1,300 a 1,600 m identificado como una altitud óptima para el café (Rohwer, 2002; Tesfaye, Govers, Bekele, & Borsch, 2013).

Varios estudios han sido publicados sobre el uso tradicional del café en medicina humana y veterinaria, la cual está relacionada a la aplicación de granos y otras partes de la planta. La bebida de los granos de café arábica ha sido utilizada para tratar gripes en Brasil, en Cuba el extracto acuoso de granos son conocidas como afrodisíaco. En Haití la infusión de las hojas y granos tostados son usados para anemia, edema y astenia. La decocción de granos ha sido utilizada oralmente para fiebre y como astringente en Nicaragua, mientras que el extracto acuoso de los granos secos son muy utilizados para el cansancio en Perú, como un cardiotónico y neurotónico en Tailandia y para el asma en el oeste de la India (Ross, 2005). Los frutos secos hervidos en agua caliente son conocidos como una bebida “giser” en Yemen (Patay et al., 2016).

Los granos de *C. canephora* son utilizados localmente para masajes para dolores de espalda, el extracto de raíz como vendaje para niños, las hojas son utilizadas para la tos en decocción o infusión (Tabuti, Lye, & Dhillion, 2003). En Etiopia la gente consume la bebida llamada “hoja” para el tratamiento de envenenamiento la cual es acompañada por diarrea y náusea, esta contiene leche y miel del pericarpio de los frutos del café (Belayneh & Bussa, 2014). En África los granos son utilizados para ataques de asma (Neuwinger, 2000). Las hojas son consumidas para tratar diarrea y dolores intestinales en África. En Cuba consumen las hojas oral o local en el tratamiento de migraña, también utilizan las hojas para diversos dolores en diversas partes del cuerpo. Se ha reportado su uso para dolores de estómago y cabeza en Nicaragua, también como un antitusivo en Perú y es utilizado para la fiebre y estimulación de la producción de prolactina en México (Ross, 2005).

Las flores de *Coffea benghalensis* son utilizadas para el sangrado excesivo durante la menstruación en Nepal (Ghimire & Bastakoti, 2009). Las raíces son utilizadas para mordeduras por escorpión en la India (Ross, 2005) y se agrega en las comidas para obtener un efecto afrodisíaco en Etiopia (Belayneh & Bussa, 2014).

#### Importancia medicinal y aplicaciones del café

Potencial antioxidante: Se ha reportado la actividad de extractos de granos de *C. arabica* por diferentes métodos (Gebeyehul & Bikila, 2015), encontrándose que la actividad es similar a los valores de alimentos antioxidantes como chocolate negro, hierbas y especias (Bresciani, Calani, Bruni, Brighenti, & Rio, 2014). Los extractos de especies de arábica y robusta extraídos por fluidos supercríticos mostraron actividad antioxidante (Nkondjock, 2009). Los extractos de granos también juegan un papel importante en la protección UV y prevención de cáncer, en un estudio clínico de 30 pacientes con problemas dermatológicos, se les aplicó localmente los extractos mediante una crema facial en 20 pacientes y a 10 pacientes se les aplicó una crema placebo. Al comparar los tratamientos se observó mejoría en la apariencia, reducción de arrugas y pigmentación (Cooper & Kronenberg,

2009). Otro estudio evaluó la actividad antioxidante y el efecto inhibitorio en la promoción de tumores en piel en ratones del ácido ferúlico, clorogénico y cafeico mostrando una actividad dosis-dependiente de la concentración de ácidos fenólicos (Huang, Smart, Wong, & Conney, 1988). Los ácidos sinápico, cafeico y *p*-cumárico también mostraron actividad antioxidante (Patay et al., 2016). Los frutos de café de Bengala mostraron actividad antioxidante mayor que el ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol (Kiran, Baruah, Ojha, Lalitha, & Raveesha, 2011).

**Efecto anticáncer:** El consumo regular del café reduce la aparición de cáncer de riñón, hígado, mama y colon debido a la cafeína, diterpenoides, ácido caféico, polifenoles, aceite esencial y moléculas heterocíclicas (Nkondkjock, 2009). El efecto anticáncer de los extractos del fruto de *C. arabica* ha sido demostrado en estudios con ratones (Ross, 2005). El cafestol un diterpeno encontrado en café exhibió citotoxicidad contra líneas celulares de leucemia HL60 y KG1, reduciendo el potencial de la membrana mitocondrial, acumulación de caspasa-3 y la externalización de fosfatidilserina lo cual sugiere ser un agente terapéutico profiláctico para estudios preclínicos por sus propiedades anticancerígenas (Lima, et al., 2018).

**Efectos gastrointestinales:** Una taza de café contiene alrededor de 80 mg de cafeína, pero una taza pequeña de café de alta calidad puede contener aproximadamente 50 mg de cafeína equivalente a una taza de té. La cafeína es rápidamente absorbida por el sistema gastrointestinal el cual se une a las proteínas y es transportado a muchos lugares dentro del organismo. Los niveles en el plasma alcanzan su máximo a los 30 min después de la ingestión y su vida media es a las 5 h. En la fase metabólica la cafeína es dimetilada y degradada en teobromina, teofilina y paraxantina. La cafeína tiene un efecto diurético y efecto hipertensivo temporalmente, incrementa la secreción del ácido en el estómago, y también estimula la función del corazón y el riñón (Patay et al., 2016). El contenido de teobromina también es diurético y espasmolítico similar al de la teofilina (Dewick, 2002). El efecto colerético y colagogo del ácido clorogénico está bien documentado.

En el estómago el ácido clorogénico es hidrolizado y convertido a ácido caféico el cual es conjugado a glucuronato o sulfato (Williamson, Driver, & Baxter, 2009). El ácido clorogénico inhibe la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa? la cual disminuye la producción de glucosa en el hígado, mientras que la cafeína estimula la producción de insulina de células  $\beta$  en el páncreas (Khare, 2007). De acuerdo a estudios epidemiológicos las sustancias activas de los granos de café pueden reducir los desórdenes de la vesícula biliar (Patay et al., 2016). El consumo regular del café puede reducir probablemente la diabetes tipo II pero es desconocida la sustancia responsable de este efecto (Belguidoum, Guebailia, Boulmokh, & Houache, 2014; Bhupathiraju, Bisht & Sisodia, 2010).

Sarriá y colaboradores (2018), demostraron en un estudio clínico el efecto beneficioso a la salud del consumo de café verde y tostado en sujetos con hipercolesterolemia para prevenir el síndrome metabólico, mostrando efectos positivos para mantener los niveles de presión sanguínea, glucosa y triglicéridos.

Efecto respiratorio: Los granos de café pueden ser usadas como estimulante respiratorio (Patay et al., 2016).

Efecto sobre el sistema nervioso: El café es bien conocido por sus efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central. Diversos estudios han demostrado que el consumo regular de café puede reducir la incidencia de la enfermedad de Parkinson. Adicionalmente el café puede ser utilizado en terapia de migraña combinado con ergotamina, ya que la cafeína tiene actividad vasoconstrictora en el cerebro. Ha sido utilizado en remedios homeopáticos para facilitar el sueño (Patay et al., 2016).

Efecto cardiovascular: Isoquercitrina y rutósido extraído de los granos de café pueden ser utilizados para aterosclerosis, mientras que la quercitrina tiene un efecto cronotrópico e inotrópico positivo y efecto antiarrítmico, pueden proteger el LDL contra las modificaciones oxidativas. La quercetina y rutósido ha sido utilizado en el tratamiento de fragilidad capilar (Patay et al., 2016). Se ha demostrado que los granos de café pueden disminuir los niveles de azúcar en sangre (Ross, 2005).

Usos para obesidad: Algunos datos sugieren que la cafeína es efectiva en la disminución de peso mediante termogénesis y oxidación de grasa (Liu, Smith, Fujioka, & Greenway, 2013; López-García et al., 2006; Shimoda, Seki, & Aitani, 2006; Westerterp-Plantenga, Lejeune, & Kovacs, 2005) aunque no está del todo claro.

Efecto antibacteriano: Estudios recientes han demostrado la actividad antibacteriana de los frutos del café de Bengala contra *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *Streptococcus faecalis* y *S. aureus* (Almeida, Farah, Silva, Nunan, & Glória, 2006; Kiran et al., 2011; Shetty, Subbannayya, & Shivananda, 1994). Debido al ácido clorogénico durante el tostado de los granos se generan productos de los cuales el extracto de *C. canephora* ha mostrado efecto inhibitorio contra *Streptococcus mutans* (Almeida et al., 2012; Antonio et al., 2011). Moreira y colaboradores (2018) evaluaron la actividad biológica de extractos de cáscara y pulpa de café mostrando que los carotenoides extraídos de dichos residuos mostraron actividad antioxidante y antimicrobiana contra bacterias patógenas como *Salmonella colorless*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* y contra hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*.

Otro estudio reportó la actividad de extracto etanólico de *Coffea arabica*, mostrando actividad contra bacterias gram negativas y mostró una actividad inhibitoria contra tirosinasa y L-DOPA menor que el control arbutina, redujo la melanina en células de melanoma en dosis dependiente y mostró actividad antioxidante lo cual sugiere el potencial de los extractos de café en formulaciones cosméticas (Kim & Lee, 2018).

Uso cosmético: La cafeína puede reducir eficazmente los efectos de la radiación UV y el daño inducido por los radicales libre, inhibe la actividad fosfodiesteras, aumenta la concentración de AMPc y aumenta la apoptosis en los queratinocitos dañados en la piel. La cafeína se utiliza tópicamente en el champú

como un adyuvante para el tratamiento de la caída del cabello, aumenta la concentración de AMPc, reduce la tensión del músculo liso cerca del folículo piloso y facilita la entrega de nutrientes a través de los vasos sanguíneos (Sharifian, Mollabashi, Jaffary, & Nilforoushzadeh, 2016). La cafeína es un compuesto activo de productos anticelulíticos porque previene la acumulación excesiva de grasa en las células. Este alcaloide estimula la degradación de las grasas durante la lipólisis, presenta potentes propiedades antioxidantes, la cafeína contenida en los cosméticos aumenta la microcirculación de la sangre en la piel y estimula el crecimiento del cabello a través de la inhibición de la actividad de la 5- $\alpha$ -reductasa (Herman & Herman, 2012).

Usos veterinarios: Los extractos de los granos de café arábica fueron administrados vía intramuscular en terneros, los cuales mejoraron en un 30% más que el grupo placebo en casos de diarrea. En Suiza granjeros administraron bebidas de café para desórdenes reproductivos, gastrointestinales y metabólicos en los animales (Schmid et al., 2012).

#### Estudios químicos:

La droga oficial es la semilla (*semen Coffeae*) que contiene 1.25-2.5% de cafeína (granos tostados: 1.36-2.85%), teobromina, teofilina, ácido clorogénico 4.4-7.5% (granos tostados: 0.3-0.6%), 0.8-1.25% trigonelina (granos tostados: 0.3-0.6%), 0.022% de colina, 10-16% de aceite graso, ácido quínico, sitosterol, dihidrositosterina, estigmasterol, coffeasterina, tanino, cera, ácido caféico, azúcar, celulosa, hemicelulosa, no volátil ácidos alifáticos (ácidos cítrico, málico y oxálico), ácidos volátiles (acético, propanoico, butanoico, isovalérico, hexanoico y decanoico), carbohidratos solubles (monosacáridos: fructosa, glucosa, galactosa y arabinosa), oligosacáridos: sacarosa, rafinosa y estaquiosa, y polímeros de galactosa, manosa, arabinosa y glucosa. La concentración de cafeína, que se presenta parcialmente en forma libre o forma sal con ácido clorogénico, se reduce durante el tostado (Fattorusso & Scafati 2008).

La cafeína, el alcaloide más importante de las especies de café, son sintetizadas en hojas jóvenes de plántulas de *C. arabica* y frutos inmaduros, y se acumula en las hojas maduras. La biosíntesis de cafeína activa se lleva a cabo en las hojas superiores y la parte superior del tallo, pero está ausente en cotiledones, tallo inferior y raíz (Patay et al., 2016). El aroma característico del café se debe al  $\alpha$ -2-furfuriltiol, 4-vinil-guaiacol, algunos derivados de alquilo y 3-metilbutano-yrosina, furanonas, acetaldehído, propanal, metilpropanal (Buffo & Freire, 2004; Kraft & Hobbs, 2004).

La cafeína presenta diversas actividades biológicas como la estimulación del sistema nervioso central, estimulación miocárdica y vasoconstricción periférica (Heck & Mejia, 2007). Los estudios científicos han sugerido que la trigonelina fue capaz de estimular la actividad respiratoria y promover la utilización de la glucosa en células HepG2 (Riedel et al., 2014).

La grasa y la proteína, son precursores del sabor del café tostado, son componentes importantes de los granos de café verde y la fracción lipídica de granos de café verde comprende principalmente de triacilgliceroles, esteroles, tocoferoles y diterpenos de la familia de los kaurenos (Ferrari, Ravera, de Angelis, Liverani, & Navarini, 2010; Speer & Kölling-Speer, 2006).

Los ácidos grasos son beneficiosos para la salud humana ya que son precursores en la biosíntesis de eicosanoides, que se proponen como biorreguladores de muchos procesos metabólicos celulares (Gressler et al., 2010; Mao, Fu, Nan, & Wan 2015). Se encontró que los granos de café verde son ricos en ácidos grasos insaturados tales como ácidos oleico (18: 1n-9), linoleico (18: 2n-6) y linolénico (18: 3n-3). Triacilgliceroles (TAG) representan la principal clase de lípidos en las muestras de café. La composición de ácidos grasos también se diferencian entre una mezcla de café Arabica y Robusta (Dong, Tan, Zhao, Hu, & Lu, 2015; Romano et al., 2014; Toci, Neto, Torres, & Farah, 2013).

Las proteínas se componen de diferentes aminoácidos que son los principales compuestos que contribuyen a la formación del aroma típico durante el tostado y estudios previos han reportado que la alanina, es el aminoácido con el contenido más alto (1.2 mg/g) en los granos de café Robusta, seguido de asparagina (0.68 mg/g) (Murkovic & Derler, 2006). Casal, Oliveira y Ferreira (2003) han demostrado que los aminoácidos D y L tienen el potencial de ser utilizados como discriminadores de especies de café. Los ácidos grasos y aminoácidos de los granos de café de algunas regiones del mundo han sido reportados en la literatura. Sin embargo, los estudios sobre composición química y actividad biológica de hojas y granos de las variedades de café cultivado en Guatemala no se han reportado.

Generalmente, la composición volátil puede variar según la genética, el suelo, el clima y las prácticas agrícolas. Bertrand y colaboradores (2012), investigaron la influencia de las condiciones climáticas en la huella digital de compuestos volátiles en los granos de café y calidad de la bebida del café; Toci & Farah (2014) analizaron la huella volátil de los granos café brasileño para corroborar compuestos marcadores potenciales e identificar nuevos indicadores de baja calidad.

Los principales compuestos de la materia insaponificable del café son los diterpenos kahweol y cafestol. El consumo de café sin filtrar se ha asociado con un posible aumento en los niveles de colesterol sérico y lipoproteínas de baja densidad; dichos efectos son transitorios después de la retirada de los diterpenos y se deben principalmente a la actividad hipercolesterolémica de cafestol (Cano- Marquina et al., 2013). Sin embargo, los estudios han destacado los efectos de los diterpenos en la salud, debido a su efecto anti-cancerígeno, antiinflamatorio y las actividades antioxidantes, lo que sugiere que el consumo moderado de café reduce el riesgo o la gravedad de varias enfermedades, estando asociado con una reducción en la tasa de mortalidad (Freedman et al., 2012).

Entre los precursores del aroma del café los más conocidos son la sacarosa y la trigonelina, después del tostado los responsables del sabor son la pirazina, alquil-

piridinas, furanos y pirroles (De Maria, Trugo, Moreira, & Werneck, 1994; Stadler et al., 2002). El alto contenido de sacarosa y trigonelina en el grano verde de Arabica podría explicar parcialmente su mejor calidad (Casal, Oliveria, & Ferreira, 2000, Ky et al., 2001).

Los compuestos fenólicos son constituyentes ubicuos presentes en una amplio número de plantas como frutas, vegetales, cereales y bebidas tales como el vino, té, cerveza y café (Farah & Donangelo, 2006). El ácido clorogénico es uno de los principales compuestos del café, se clasifica como ésteres de ácidos trans-cinámicos como los ácidos cafeico, ferúlico *p*-coumárico con ácido quínico. Los principales ácidos encontrados en café verde son ácido cafeoilquínico, dicafeoilquínico y ácido feruloilquínico con al menos tres isómeros por clase (Clifford, 1985).

Estos compuestos son metabolitos secundarios en planta de café y juegan un papel contra los ataques por patógenos, competencia de otras plantas y la atracción de organismos tales como polinizadores, dispersores de granos y microorganismos simbióticos. También ofrecen protección en relación con el estrés asociados con cambios en temperatura, contenido de agua, exposición a niveles de luz UV y deficiencia de nutrientes y minerales (Farah, 2009).

Además es conocido que el contenido de ácido clorogénico en los granos de café verde puede variar en gran medida según las especies y el grado de maduración (Farah & Donangelo, 2006). Igualmente las prácticas agrícolas, el clima y el suelo pueden contribuir a los cambios en el contenido y su distribución. Se ha reportado que la fertilización con zinc puede aumentar el contenido del ácido clorogénico en el café arábica (Clifford, 1985; Farah, 2009; Farah, DePaulis, Trugo, & Martin, 2005).

El ácido clorogénico ha sido objeto de investigaciones en los cuales ha resaltado la actividad antioxidante entre otros efectos beneficiosos (Farah, 2009; Scalbert, Johnson, & Saltmarsh, 2005). Por esa razón se ha tratado de identificar

cultivares de *C. arabica* que puedan ofrecer calidad y alto contenido de ácido clorogénico (Monteiro & Farah, 2012).

Los ácidos hidroxicinamoilquínicos son los responsables del amargor de la bebida de café debido a su degradación en compuestos fenólicos durante el tostado. Además, varios iridoides, taninos y antraquinonas también han sido detectados en diferentes cafés (Patay et al., 2016).

Chen, Mu & Kitts (2019), caracterizaron mezclas de hojas de café para evaluar la actividad antiinflamatoria y concluyen que no se puede atribuir únicamente a los ácidos clorogénicos, manguiferina, rutina y cafeína dicha actividad sino a la posible interacción de las moléculas bioactivas.

Se evaluaron fracciones orgánicas (hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol a partir del extracto metanólico de hojas de *C. arabica* demostrándose actividad antiinflamatoria del ácido 5-cafeoilquínico y dichas fracciones indicando nuevas posibilidades de tratamiento en desórdenes oxidativos y daño cutáneo (Segueto, et al., 2018).

Un estudio demostró mayor eficiencia en la extracción hidroalcohólica en términos de rendimientos de compuestos de bajo peso molecular (en particular ácido clorogénico), mientras que la extracción de café moka provee altos contenidos de melanoidinas. Los compuestos como ácido clorogénico, trigonellina, colina y cafeína son altos en café Arabica (Ciaramelli, Palmioli & Airoidi, 2019).

Campa y colaboradores (2004) estudiaron la presencia de mangiferina y ácido hidroxicinámico en hojas de 23 cafés africanos. Se determinó que el contenido total de ácido hidroxicinámico de *C. arabica* fue significativamente mayor que la de otras especies (*C. sessiliflora* Bridson, *C. resinosa* Hook.f., *C. leroyi* A.P.Davis), y mangiferina e isomangiferina estaban presentes en mayor concentración en las hojas jóvenes que en otras partes de la planta. El contenido en ácido cafeoilquínico de las hojas adultas de *C. canephora* fueron 10 veces más bajas en comparación con los jóvenes (Mondolot et al., 2006).

Algunos estudios realizaron la comparación de compuestos fenólicos entre diversas especies de *Coffea* o sus partes de la planta, encontrando que el contenido total de fenoles de las hojas jóvenes no era influenciado por la producción del fruto, pero dependía fuertemente de la etapa de desarrollo de la planta y el medio ambiente, se correlacionó inversamente con la temperatura y la radiación. Se observó un alto contenido fenólico en los frutos inmaduros del pericarpio del café (Patay et al., 2016).

Un total de 16 compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los ácidos clorogénicos, flavonoides y xantonas fueron detectados en *C. arabica* hojas de tres regiones de Brasil además de la cafeína (De Almeida et al., 2018).

Se evaluó la influencia del tratamiento con vapor sobre granos defectuosos de *C. canephora* con respecto al perfil de compuestos bioactivos y actividad antioxidante del café tostado, se demostró que el tratamiento con vapor afecta el contenido de cafeína, trigonellina, ácidos clorogénicos, melanoidinas, cafestol y 16-*O*-metilcafestol, por lo que se recomienda evitar tiempos cortos de tostado y presiones bajas de vapor para evitar la pérdida de compuestos bioactivos (Kalschne, Viegas, De Conti, Corso & de Toledo, 2019).

Se evidenció el efecto del disolvente sobre la extracción de los compuestos químicos presentes en hojas de café y su actividad antioxidante, por lo que se concluye que la polaridad del disolvente es particularmente importante al igual que la edad de la planta y su proceso de secado (Chen, Kitss, Ji & Ding, 2019).

Ogawa, Kamiya y Iida (1989), identificaron  $\alpha$ - y  $\beta$ -tocoferoles en granos de café en 12 variedades de arábicas y dos de robusta, concluyeron que los tocoferoles pueden ser utilizados para discriminar café arábica y robusta verde o tostado, café arábica mostró altos contenidos de tocoferoles, menores cantidades se encontraron en el café tostado y una serie de propiedades funcionales de los granos de café verde han sido reportados (Patay et al., 2016).

Los taxa de café también contienen materiales inorgánicos como K, Mg, Ca, Na, Fe, Cu, Mn, Zn, Rb, Sr, V, Co, Ni, Ba, B, minerales y menor cantidad de vitaminas B, C, y niacina (Patay et al., 2016).

## **10. Objetivo general**

Caracterizar la composición química y actividad antioxidante de extractos de hojas y granos provenientes de siete regiones de cultivo de café comercializadas en Guatemala para la propuesta de nuevos productos alimenticios, cosméticos farmacéuticos o de aplicación agroindustrial.

## **11. Objetivos Específicos**

Detectar el contenido de compuestos fenólicos, azúcares, aceite y alcaloides en extractos de hojas y granos de café como marcadores químicos de calidad.

Determinar la actividad antioxidante in vitro de extractos de hojas y granos de café comercializadas en Guatemala.

Seleccionar las variedades de café más promisorias en base a su composición química y actividad antioxidante para la propuesta de nuevos productos de aplicación alimenticia, agroindustrial, medicinal o cosmética.

**12. Hipótesis (si aplica):** Por ser una investigación descriptiva no aplica.

## **13. Materiales y métodos**

### 13.1 Enfoque y tipo de investigación

Enfoque de la investigación cuantitativa

Alcance exploratoria, descriptiva

13.2 Recolección de información: Las muestras fueron proporcionadas por fincas privadas, la colecta se realizó de enero a marzo, se realizó un muestreo por conveniencia en una sola colecta para cada una de las regiones por el tiempo de ejecución del proyecto.

13.3 Técnicas e instrumentos:

13.3.1 Obtención del material: Se colectó 1 kg de hojas y granos de café los cuales fueron proporcionados por fincas de las siete regiones de Guatemala en que se cultiva el material, de preferencia con técnicas de agricultura ecológica.

Toda la información de colecta fue recogida mediante una boleta la cual contenía los siguientes datos: La fecha de colecta la cual se realizó durante los meses de enero-marzo, sitio de colecta, coordenadas geográficas, altura, clima, información del sitio (cumbre, ladera de montaña, cima de montaña, meseta, terraza, depresión, etc), tipo de suelo, condición del suelo, tipo de cultivo (orgánico o químico), se encuentra a pleno sol o bajo sombra, edad de la planta (año desde la corta), etapa de desarrollo de la planta en el momento de la colecta (floración, fructificación), altura del árbol, diámetro de altura de pecho, condiciones generales del árbol, presencia de plagas, tamaño de la muestra tomada (número de árboles colectados), parte del árbol de donde se toma la muestra (lateral, media, rama superior, inferior), flora acompañante, peso de la muestra en fresco, peso seco de la muestra. El material obtenido fue secado en un horno de convección de aire forzada a 40 °C hasta obtener una humedad menor al 10%. Posteriormente se realizó la molienda en molino de café las semillas y se tamizaron las hojas para su extracción.

Criterios de selección: Variedades comercializadas seleccionadas en cada una de las siete regiones de Guatemala. La selección fue por conveniencia de acuerdo a la disponibilidad de material y por el tiempo disponible para realizar las pruebas. Se seleccionaron cultivos que fueran manejados ecológicamente.

13.3.2 Extracción: A 1 g de material seco se realizó la prueba de sólidos totales, empleando cuatro concentraciones de etanol (30, 50, 70 y 95 %) para determinar el disolvente etanólico que extrae la mayor cantidad de metabolitos, se realizaron las pruebas por triplicado. Posteriormente se realizó el extracto a partir de 200 g de material vegetal y se colocó en un percolador, se agregó el disolvente extractor y se realizó una percolación con el mismo durante un período de 5 días con recambios periódicos del disolvente hasta que la extracción fuera exhaustiva. Posteriormente se concentró el extracto así obtenido a presión reducida a una temperatura inferior a 45 °C en un

evaporador rotatorio. Se realizaron las pruebas en tubo y cromatografía en capa fina (CCF) para determinar los metabolitos primarios (azúcares) y secundarios (flavonoides, alcaloides) presentes en los extractos (Solís, Guerrero, Gattuso, & Cáceres, 2005). Por conveniencia y tiempo se realizó una sola extracción por percolación de cada muestra, se obtuvo el porcentaje de rendimiento de cada extracto.

### 13.3.3 Caracterización química:

- Extracción de aceite: Se pesaron 30 g de café y se agregaron 350 mL de tert-butilmetil éter en un aparato soxhlet a una temperatura de 80°C durante 8 h. Después de la extracción, el disolvente se evaporó y se cuantificó el aceite obtenido. El ensayo se realizó por quintuplicado para obtener el promedio y desviación estándar (Guercia, Berti, Navarini, Demitri, & Forzato, 2016).
- Cuantificación de fenoles totales: Se preparó una curva patrón con 4 mL de ácido gálico disuelto en agua (1:10) en concentraciones de 0.625-6.25 mg/mL. Se agregó un blanco con 4.0 mL de agua, 0.4 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 %. Se prepararon dos tubos de muestra del extracto, en el primer tubo se agregó 3.95 mL de agua, 0.4 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % y 50 µL de muestra; al segundo tubo se agregó 3.90 mL de agua, 0.4 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % y 100 µL de muestra. Los tubos de reacción se agitaron en un vortex durante 30 seg, se calentaron de 90-100°C por 1 min y se enfriaron. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. La cantidad de fenoles totales se expresó como µg equivalentes de ácido gálico por mg de extracto, todas las muestras se realizaron por quintuplicado para obtener el promedio y desviación estándar (Monente et al., 2015).
- Determinación de cafeína usando solución de acetato de plomo: A 10 mL de extracto de café se agregó 5 mL de solución de HCl y 1 mL de solución de acetato de plomo el cual fue diluido con 100 mL de agua destilada. La solución se filtró con papel Whatmann No. 1. El filtrado (25 mL) y 0.3 mL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se

mezcló, se diluyó a 50 mL con agua destilada y se filtró nuevamente. Se midió la absorbancia del filtrado a 274 nm. El contenido de cafeína (%) se calculó utilizando una curva de cafeína (0-250 mg/L), todas las mediciones se realizaron por quintuplicado para obtener promedio y desviación estándar (Yao, Chen, Cheng, & Liu, 1992,1993).

- Determinación de ácido clorogénico: Se pesó 1 g de café molido en un balón aforado de 100 mL y se agregó 50 mL de agua caliente. Se colocó el balón en un baño de María por 60 min, se enfrió a temperatura ambiente y se aforó con agua destilada. Se filtró y diluyó el filtrado 10 veces (alícuota de 10 mL del filtrado y aforar a 100 mL con agua destilada). Se determinó el espectro de la segunda derivada en la región ultravioleta de 200-400 nm. Se preparó una disolución patrón de ácido clorogénico pesando exactamente 0.1 g de ácido 5-cafeoilquínico y se aforó con agua destilada en un balón de 500 mL. Por cada dilución se obtuvieron disoluciones con una concentración de ácido clorogénico de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/mL y se determinó el espectro de la segunda derivada en la región ultravioleta de 200-400 nm para cada una de estas disoluciones. Se construyó una curva de calibración, graficando la magnitud de la segunda derivada en función de la concentración del ácido clorogénico. El ensayo se realizó por quintuplicado para obtener promedio y desviación estándar (Solís & Herrera, 2005).
- Cuantificación de azúcares totales: La concentración de azúcares totales se determinó a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración, para la cual se prepararon soluciones de 10-70 mg/L utilizando estándares de diferentes azúcares. Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicando el mismo tratamiento. Para la aplicación del método Dubois (Método fenol-sulfúrico), se mezcló 2 mL de muestra con 2 mL de fenol al 5% en tubos digestores y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se le añadió 5 mL de ácido sulfúrico se dejó reposar 15 min y se realizó la lectura a 490 nm. Los ensayos se realizaron por quintuplicado para obtener el promedio y desviación estándar (Ávila, Rivas, Hernández, & Chirinos, 2012).

#### 13.3.4 Evaluación de la actividad antioxidante:

- Método por CCF para evaluar la actividad atrapadora de radicales por DPPH: Se aplicaron 10  $\mu$ L de muestra y 5  $\mu$ L del estándar antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ) en una placa cromatográfica de silica gel 60F<sub>254</sub>. Se colocó la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico:agua (100:11:11:26), se secó y asperjó con DPPH (1 mg/mL en metanol).
- Método colorimétrico por DPPH: Se disolvió 20 mg de extracto en 1 ml de metanol, se prepararon cinco diluciones de concentración de 4- 20 mg/mL. Posteriormente se preparó una serie de cuatro tubos de reacción por ensayo, blanco del control, tubo control, blanco del ensayo y solución de ensayo, al cual se le agregó 1 mL de tampón de acetato, 1.4 mL de metanol, 0.1 mL del extracto y 0.5 mL de solución de DPPH. Se agitó en vortex por 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (517 nm) contra el blanco respectivo. Se calculó el porcentaje de disminución de la absorbancia causado por el extracto respecto al control. La actividad antioxidante se expresó en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI<sub>50</sub>), que es la concentración del extracto requerida para disminuir un 50% la absorbancia de DPPH expresada en mg/mL. Se realizó el ensayo por quintuplicado para cada una de las muestras, obteniendo así promedio, desviación estándar y los intervalos de confianza (Ravishankara et al., 2002; Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008).
- Determinación del poder reductor de hierro: Se disolvió 20 mg de extracto en 1 mL de metanol. Se mezcló 1mL del extracto, 1mL de tampón de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 1mL de ferrocianuro de potasio (1%) y se incubó durante 20 min a 50 °C. A la mezcla reaccionante, se adicionó 1mL de ácido tricloroacético (10 % p/v) y se centrifugó a 3000 rpm (10 min). Se mezcló 1.5mL del sobrenadante de la solución, 1.5 mL de agua destilada y 0.375 mL de cloruro férrico (0.1 %) y se midió la absorbancia a 700 nm. Se realizó cada muestra por quintuplicado para obtener los promedios y desviación estándar, los resultados se expresaron como  $\mu$ g de Fe (II)/g de extracto. Para ello se realizó una curva patrón con disoluciones de concentración

conocida de FeSO<sub>4</sub>, comprendidas entre 0.2 y 10 mM (Kosem, Han, & Moongkarndi, 2007).

- Decoloración del radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS): El procedimiento se basó en lo descrito por Re & colaboradores (1999) y Vasco, Ruales & Kamal-Eldin (2008) con algunas modificaciones. Se preparó el catión ABTS<sup>+</sup> con la mezcla de la solución ABTS (7mM) y la solución de persulfato de potasio (2.45 mM) con 18 h previas de incubación. Posteriormente se diluyó en etanol al 95 % (1:30) a manera de obtener una absorbancia (Abs) de (0.70 ± 0.2) en una lectura en el espectrofotómetro a 734 nm. La solución madre se preparó a partir de 0.1 g de extracto seco y 5 mL de metanol, de esta solución se prepararon 5 diluciones de concentración de 0.2 a 1 mg/mL, se incubó durante 30 min a temperatura de 30 °C. La dilución del extracto (3 µL) se mezcló con 3 mL de la solución de trabajo de ABTS. Se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 734 nm en el minuto 1, 4 y 6 de cada dilución del extracto. Esta se interpreta según el valor de CI<sub>50</sub>, es decir, la concentración del extracto requerida para disminuir un 50 % la absorbancia de ABTS. Los resultados se expresaron en mg/mL, ya que representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto El ensayo se realizó por quintuplicado para obtener promedio, desviación estándar e intervalo de confianza.

#### 13.4 Operacionalización de las variables:

**Tabla 1**  
**Operacionalización de variables**

Objetivo específicos	VARIABLES	Técnicas	Instrumentos	Medición o cualificación
Determinar la actividad antioxidante in vitro de extractos de hojas y granos de café	Extractos. Aceites Actividad antioxidante.	Percolación y concentración. Evaluación de la captura de radicales libre mediante DPPH,	Percolador Rotaevaporador Soxhlet Balanzas Equipo espectrofotómetro	Porcentaje de rendimientos de extractos y aceites. Concentración inhibitoria media

comercializadas en Guatemala.		ABTS, reducción de hierro (FRAP), fenoles totales.	UV/VIS, lector de placas.	(CI <sub>50</sub> ) para DPPH y ABST, expresada en mg/mL. Para la prueba de FRAP se expresa como µg de Fe (II)/g de extracto Fenoles totales µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto
Detectar el contenido de compuestos fenólicos, azúcares y alcaloides expresados en cafeína en extractos de hojas y granos de café como marcadores químicos de calidad.	Extractos. Aceites Metabolitos secundarios.	Cromatografía en capa fina (alcaloides, flavonoides y azúcares) Espectrofotometría. Se cuantificará cafeína, fenoles, ácido clorogénico.	Cromatoplasmas de sílica gel. Espectrofotómetro.	Detección de metabolitos primarios: determinación de la concentración de azúcares presentes en cada g de extracto expresada como mg/mL y detección de metabolitos secundarios: Flavonoides determinación de la concentración expresada en mg/mL de ácido clorogénico /g de extracto y alcaloides porcentajes de cafeína.
Seleccionar las variedades de café más promisorias para el desarrollo de nuevos productos de aplicación alimenticia, medicinal o cosmética.	Extractos. Aceites.	Análisis de resultados de actividad y marcadores químicos presentes en los extractos.	Balanzas Mezclador Cristalería diversa	Selección de las variedades con mayor actividad de acuerdo a estimaciones de concentración.

### 13.5 Procesamiento y análisis de la información:

Los datos obtenidos se organizaron en tablas.

Se tabularon los promedios de cinco repeticiones en cada uno de los ensayos y se estimó la desviación estándar e intervalos de confianza. Para el cálculo de la concentración inhibitoria mínima (CI<sub>50</sub>) de la actividad antioxidante DPPH y ABTS se realizó mediante regresión lineal empleando cinco diluciones de la muestra, blanco y estándar.

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tuckey para establecer si existía diferencia estadísticamente significativa entre las regiones, usando el programa R.

Muestras evaluadas: Extractos etanólicos de siete muestras de hojas y siete muestras de granos de café

Variables de respuesta (unidades de medición)

<b>Respuesta</b>	<b>Unidades</b>
Aceite	% de aceite
Fenoles totales	µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto
Cafeína	% de cafeína
Ácido clorogénico	mg/mL de ácido clorogénico/g de extracto
Azúcares	mg/mL de azúcares/g de extracto
DPPH CI <sub>50</sub>	mg/mL de extracto requeridos para inhibir el 50% del radical
ABTS CI <sub>50</sub>	mg/mL de extracto requeridos para inhibir el 50% del radical
FRAP	µg de Fe(II)/ g de extracto

## 14. Vinculación, difusión y divulgación

Se estableció cooperación con fincas pertenecientes a la Asociaciones de Reservas Naturales Privadas de Guatemala que cultivan café con prácticas orgánicas, para caracterizar la calidad del grano de café y explorar la aplicación innovadora de la hoja. Se establecieron contactos con la Universidad de Corea del Sur para realizar estudios farmacológicos y genéticos complementarios, así como la Universidad Mariano Gálvez para estudios cuantitativos de la composición química del aceite por medio de CG-Masas.

Se realizó una actividad con estudiantes de cuarto año de la carrera de Química Farmacéutica en el cual realizaron un trabajo de integración para la propuesta de productos cosméticos o farmacéuticos a base de pulpa, aceite, grano y hoja de café.

Se apoyó una tesis de Química Farmacéutica para la caracterización química y evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa de café.

Se espera publicar a nivel nacional en la revista *Ciencia, Tecnología y Salud*. Para su publicación a nivel internacional se buscará complementar los datos con la participación de otras universidades y así tener la calidad necesaria para publicar en una revista especializada en la materia. En ambos casos se contará con el consentimiento previo de la Digi. Se espera divulgar los resultados mediante presentaciones orales y de posters en congresos y seminarios tanto a nivel nacional como internacional.

## 15. Resultados

Durante el periodo de febrero a abril se colectaron muestras de hoja y grano de *C. arabica* de cuatro variedades provenientes de siete regiones de Guatemala, con el apoyo de la Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala (ARNPG). Según se observa en la Tabla 1 predomina la variedad Caturra, la cual está presente en cuatro de las regiones muestreadas.

Tabla 1  
*Procedencia y variedad de muestras de café colectadas*

Región	Finca/Reserva Natural Privada	Lugar	Variedad
I	CAT Tajumulco	Tajumulco, San Marcos	Caturra
II	Alianza S.A.	El Palmar, Quetzaltenango	Sarchimor

III	Guardabarranca	Villa Canales, Guatemala	Caturra
IV	Santa Isabel	Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa	Catisique
V	Santa Elena	La Democracia, Huehuetenango	Bourbón
VI	Rincón Grande	Salamá, Baja Verapaz	Caturra
VII	Quetzal Juyú	Usumatlán Zacapa	Caturra

La información de cada región se muestra en la tabla 2 en la cual se observa que predomina el clima templado en las regiones, todas las plantaciones se encuentran bajo sombra, en ladera de montaña, la edad de la planta se encuentra en un rango de 4-8 años, predominando el cultivo orgánico o uso de fertilizante moderado.

Tabla 2

*Información de los lugares de colecta de café*

Información de colecta	Región I	Región II	Región III	Región IV	Región V	Región VI	Región VII
Altura (msnm)	1,200	705	1,550	1,048	920	1,100	1,460
Clima	Templado	Templado	Templado a cálido	Templado	Templado a cálido	Templado, húmedo fresco	Húmedo templado
Características del sitio	Ladera de montaña	Ladera	Terrazas, ladera de montaña, área de recarga hídrica	Semiplano	Ladera de montaña, recarga hídrica	Ladera de montaña	Biosfera Sierra de la Minas Bosque nuboso, ladera de montaña, fondo de valle, recarga hídrica
Condición del suelo	Franco arenoso, origen volcánico	Origen volcánico	Bueno	Bueno, arcilloso	Bueno, escarpado	Bueno, franco arcilloso	Buena franco-arcilloso
Tipo de cultivo	Orgánico, bajo sombra	Bajo sombra	Bajo sombra, fertilizante químico moderado	Bajo sombra, certificado orgánico	Bajo sombra	Bajo sombra, orgánico	Bajo sombra
Edad de la planta	6-8 años	4-6 años	5 años	4 años	4 años	4 años	4-8 años
Etapa de desarrollo	Fructificación	Fructificación	Fructificación	Fructificación	Fructificación	Fructificación	Fructificación
Altura del árbol (m)	1-3	2	1.7	1.8	1.5	1.5	3.0
Parte del árbol donde se toma la muestra	Parte media del árbol	Parte media del árbol	Parte media del árbol	Lateral media	Aleatorio	Aleatorio	Hojas de ramas medias
Tamaño de muestra	10 plantas	10 plantas	15 plantas	6 plantas	8 plantas	30 plantas	10 plantas
Flora acompañante	Ingas, chomté, laurel, chinita, tepeniste	Bosque mixto	Cítricos, ciprés	Palo de jiote, matiliguatete, guarumo, encino, higo, higuerillo	Encino, ciprés, chalum, pino	Ingas, musáceas, té de limón	Ingas, musáceas

En la tabla 3 se muestra el rendimiento fresco seco de la hoja y grano el cual denota la cantidad de humedad inicial del material y el rendimiento obtenido después del secado, respecto a la hoja el mayor rendimiento lo presentó la Finca Santa Isabel ubicada en Santa Rosa (57.1 %), seguida de la reserva Rincón Grande ubicada en Salamá Baja Verapaz (51.7 %). En el grano se pudo observar mayores rendimientos por lo que denota menor humedad inicial, ya que todas las regiones presentaron rendimientos mayores del 50 %, siendo la región II proveniente de Quetzaltenango la que presentó el mayor rendimiento ya que presentaba una humedad inicial menor al 5 %.

Tabla 3  
*Rendimiento de material vegetal de café*

Región	Hoja			Grano		
	Peso en fresco (kg)	Peso en seco (kg)	Rendimiento fresco/seco (%)	Peso en fresco (kg)	Peso en seco (kg)	Rendimiento fresco/seco (%)
I	1.3	0.2	15.4	0.2	0.1	50.0
II	1.4	0.4	28.6	1.7	1.7	100.0
III	0.9	0.3	33.3	0.2	0.1	50.0
IV	0.7	0.4	57.1	0.2	0.1	50.0
V	0.5	0.2	40.0	0.6	0.5	83.3
VI	2.9	1.5	51.7	0.9	0.8	88.9
VII	1.3	0.4	30.8	0.2	0.1	50.0

En la tabla 4 se muestra el porcentaje inicial de humedad de las muestras colectadas en las diferentes regiones observándose mayor humedad en las hojas respecto al grano, después del secado en horno de convección todas las muestras presentaron una humedad final menor al 10 % para evitar el deterioro del mismo.

Tabla 4  
*Determinación del porcentaje de humedad en el material vegetal de café*

Región	Hoja		Grano	
	Humedad inicial (%)	Humedad final (%)	Humedad inicial (%)	Humedad final (%)
I	18.3	8.08	25.02	6.17
II	10.83	7.42	4.57	4.57
III	52.03	5.75	55.09	5.07
IV	38.02	7.19	44.23	8.04
V	62.70	7.22	3.32	2.25
VI	67.03	7.88	2.84	2.84
VII	63.44	6.46	33.07	1.76

En la tabla 5 se muestra la caracterización física del grano de café de las siete regiones, según los resultados obtenidos los granos presentan un peso promedio de 0.1034-0.2066 g, siendo el de mayor peso el de la región IV, un ancho promedio de 0.4-0.8 cm, siendo las regiones III y IV las que tienen el mayor ancho, respecto al largo todos los granos están homogéneos de 0.9-1 cm, densidad de 0.32-0.59 g/mL, siendo la región I y VII las que presentaron la mayor densidad aparente y real; es de resaltar que sólo tres regiones presentaron colores similares según carta de color Pantone (región I, V y VII), las otras regiones presentaron colores diferentes.

Tabla 5  
*Caracterización del grano de café*

Región	Peso de grano (g)	Densidad aparente (g/mL)	Densidad real (g/mL)	Ancho (cm)	Largo (cm)	Color según Pantone
I	0.1765 (0.02)	0.591	0.558	0.4	0.9	Cocodrilo J4-12
II	0.1862(0.04)	0.508	0.480	0.4	1.0	Camaleón J4-12
III	0.1860(0.03)	0.340	0.330	0.8	1.0	Dickens I4-07
IV	0.2066(0.04)	0.320	0.320	0.8	1.0	Morro I4-08
V	0.1034(0.02)	0.559	0.529	0.6	0.9	Cocodrilo J4-09
VI	0.1939(0.02)	0.502	0.479	0.7	1.0	Olmo J4-14
VII	0.1721(0.03)	0.590	0.590	0.7	1.0	Cocodrilo J4-09

En la tabla 6 se muestra el porcentaje de sólidos totales, la prueba de sólidos totales determina la concentración de alcohol que extrae la mayor cantidad de sólidos expresada en porcentaje, para lo cual se utilizaron diferentes grados alcohólicos al 30 °, 50 °, 70 ° y 90 °, obteniéndose el mayor porcentaje de sólidos para la hoja en etanol al 50 ° para tres regiones IV, V y VII (Santa Rosa, Huehuetenango y Zacapa), en etanol al 70 ° se obtuvo la mayor cantidad de sólidos igualmente en tres regiones II, III, y VI (Quetzaltenango, Villa Canales, y Baja Verapaz) y la hoja proveniente de la región I (San Marcos) fue la única muestra que presentó la mayor cantidad de sólidos en etanol al 30 °. En el grano seis muestras presentaron la mayor cantidad de sólidos en etanol al 50 °, y únicamente la región III la presentó en etanol al 30 °. Se

observó que el mayor porcentaje de sólidos en hoja se presentó en la muestra proveniente de Huehuetenango (1.99 %), mientras que en grano la muestra de Zacapa fue la que presentó la mayor cantidad de sólidos (1.50 %).

Tabla 6  
*Porcentaje de sólidos totales en material vegetal de café*

Región	Hoja				Grano			
	Etanol				Etanol			
	30 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>	70 <sup>o</sup>	90 <sup>o</sup>	30 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>	70 <sup>o</sup>	90 <sup>o</sup>
I	0.41	0.01	0.15	0.02	0.25	0.44	0.36	0.27
II	1.02	0.66	1.23	0.59	0.66	0.69	0.46	0.08
III	0.54	0.89	1.74	0.07	0.79	0.28	0.37	0.01
IV	0.04	0.21	0.02	0.01	0.90	1.25	1.10	1.14
V	1.31	1.99	1.29	0.98	0.92	0.96	0.47	0.03
VI	0.85	0.92	1.30	0.22	0.93	0.99	0.38	0.52
VII	0.83	1.50	0.97	0.61	1.19	1.50	0.58	0.24

En la tabla 7 se muestran los resultados del porcentaje de cenizas totales y cenizas ácidas, observándose que la mayor cantidad de cenizas totales y ácidas lo presentó la hoja proveniente de la región V de Huehuetenango (8.33 y 2.43 % respectivamente), todas las muestras presentaron cenizas ácidas por debajo del 3 %, mientras que en el grano la mayor cantidad de cenizas lo presentó la región I de San Marcos (4.16 y 0.97 %). En general se evidencia que las hojas presentan mayor cantidad de cenizas.

Tabla 7  
*Cenizas totales y ácidas de material vegetal de café*

Región	Hoja		Grano	
	Cenizas totales	Cenizas ácidas	Cenizas totales	Cenizas ácidas
	(%)	(%)	(%)	(%)
I	6.03 (0.41)	1.72 (0.24)	4.16 (0.76)	0.97 (0.12)
II	7.61 (0.29)	2.23 (0.11)	3.06 (0.74)	0.53 (0.14)
III	6.18 (0.30)	1.65 (0.16)	3.37 (0.16)	0.93 (0.06)
IV	7.42 (0.43)	1.93 (0.64)	3.63 (0.37)	0.70 (0.03)
V	8.33 (1.74)	2.43 (0.71)	3.65 (0.82)	0.89 (0.19)
VI	4.73 (0.31)	0.86 (0.08)	3.70 (0.07)	0.94 (0.11)
VII	6.65 (0.31)	2.25 (0.84)	3.22 (0.57)	0.77 (0.16)

En la tabla 8, se observa el rendimiento de extractos etanólicos, la cual muestra que el mayor porcentaje lo presentó la hoja proveniente de Baja Verapaz (48.32 %), seguida de la hoja proveniente de Zacapa (41.36 %). Todas las muestras presentaron rendimientos superiores al 25 % lo cual demuestra la rentabilidad que podrían tener los extractos de hojas (28.80-48.32 %). En los granos los rendimientos fueron menores a las hojas, siendo la región III y VII las que presentaron los rendimientos más altos (30 %), respecto al aceite fijo se obtuvieron rendimientos del 1.3 al 4.18 % siendo el mayoritario para la región IV (Santa Rosa) y la resina oleosa obtenida juntamente con el aceite incrementa los rendimiento siendo la región I (San Marcos) la que presentó el porcentaje más alto (7.01%).

Tabla 8  
*Rendimiento de extracción obtenida de material vegetal de café*

Región	Hoja	Grano		
	Extracto etanólico (%)	Extracto etanólico (%)	Aceite fijo (%)	Resina oleosa(%)
I	28.80	27.73	3.08 (0.42)	7.01
II	30.44	26.25	1.30 (0.53)	1.31
III	34.45	29.83	3.98 (0.81)	5.36
IV	32.31	27.47	4.18 ( 0.44)	4.19
V	37.79	26.46	2.70 (0.36)	4.60
VI	48.32	26.36	1.57 (0.48)	2.70
VII	41.36	29.83	3.18 (0.39)	6.05

Respecto a la composición química se seleccionaron como marcadores la cafeína por ser uno de los alcaloides más representativos del café y el ácido clorogénico por su importancia como ácido fenólico y su actividad biológica demostrada. Según los resultados obtenidos la mayor cantidad de ácido clorogénico lo presentó la hoja proveniente de la región I San Marcos (1.045 %), y el grano proveniente de la región IV Santa Rosa (6.675 %), mientras que la mayor cantidad de cafeína la presentó la hoja proveniente de la región VI Baja Verapaz (0.725 %), y en el grano la región I de San Marcos (1.193 %). En general se observó mayor cantidad de ácido clorogénico y cafeína en los granos, a excepción de la región II y VI las cuales presentaron en las hojas mayor cantidad de cafeína comparado con el grano (Tabla 9).

Tabla 9  
*Marcadores químicos de café*

Región	Hoja		Grano	
	Ácido clorogénico (%) <sup>*</sup>	Cafeína (%) <sup>*</sup>	Ácido clorogénico (%) <sup>*</sup>	Cafeína (%) <sup>*</sup>
I	1.045 (0.002) <sup>a</sup>	0.453 (0.003) <sup>a</sup>	4.916 (0.015) <sup>a</sup>	1.193 (0.004) <sup>a</sup>
II	0.108 (0.001) <sup>b</sup>	0.588 (0.004) <sup>b</sup>	0.412 (0.001) <sup>b</sup>	0.520 (0.002) <sup>b</sup>
III	0.435 (0.003) <sup>c</sup>	0.494 (0.004) <sup>c</sup>	1.373 (0.002) <sup>c</sup>	1.177 (0.008) <sup>c</sup>
IV	0.293 (0.002) <sup>d</sup>	0.494 (0.003) <sup>c</sup>	6.675 (0.007) <sup>d</sup>	1.142 (0.011) <sup>d</sup>
V	0.325 (0.002) <sup>e</sup>	0.648 (0.004) <sup>d</sup>	0.677 (0.001) <sup>e</sup>	1.134 (0.003) <sup>d</sup>
VI	0.487 (0.002) <sup>f</sup>	0.725 (0.003) <sup>e</sup>	1.075 (0.002) <sup>f</sup>	0.568 (0.003) <sup>e</sup>
VII	0.580 (0.004) <sup>g</sup>	0.577 (0.003) <sup>f</sup>	0.747 (0.003) <sup>g</sup>	1.136 (0.008) <sup>d</sup>

\*Las letras diferentes indican  $p < .05$  (Prueba de Tukey)

En la tabla 10 se muestran los resultados de la cuantificación de azúcares totales, en la cual sobresale la región III por la cantidad de azúcares en hoja (2.98 %) y la región I con la mayor cantidad de azúcares en granos (3.29 %).

Tabla 10  
*Cuantificación de azúcares totales*

Región	Hoja	Grano
	Azúcares totales (%)	Azúcares totales (%)
I	2.12 (0.03) <sup>a</sup>	3.29 (0.07) <sup>a</sup>
II	2.22 (0.03) <sup>b</sup>	2.44 (0.03) <sup>b</sup>
III	2.98 (0.02) <sup>c</sup>	2.98 (0.05) <sup>c</sup>
IV	1.61 (0.02) <sup>d</sup>	2.79 (0.05) <sup>d</sup>
V	1.33 (0.04) <sup>e</sup>	1.35 (0.02) <sup>e</sup>
VI	1.57 (0.02) <sup>d</sup>	2.28 (0.06) <sup>f</sup>
VII	2.55 (0.08) <sup>f</sup>	2.87 (0.03) <sup>d</sup>

$p < .05$  (Prueba de Tukey)

El análisis de oligosacáridos evidencia que los granos de la región I presentaron los mayores porcentajes de los diferentes azúcares evaluados, siendo la maltosa el azúcar con mayor porcentaje (0.949 %). Respecto a las hojas la región III presentó los mayores porcentajes de oligosacáridos siendo igualmente la maltosa la de mayor porcentaje (0.866 %) (Tabla 11).

Tabla 11  
*Porcentaje de oligosacáridos en los extractos de café expresado (p/v)*

Regiones	Muestra	Fructosa	Galactosa	Maltosa	Sucrosa	Triosa	Lactosa	Dextrosa	Xilosa	Ramnosa
I	Hoja	0.119 (0.002)	0.555 (0.007)	0.613 (0.009)	0.073 (0.001)	0.276 (0.004)	0.127 (0.002)	0.096 (0.002)	0.203 (0.003)	0.059 (0.003)
	Grano	0.186 (0.005)	0.858 (0.015)	0.949 (0.018)	0.114 (0.002)	0.426 (0.007)	0.196 (0.004)	0.151 (0.004)	0.316 (0.006)	0.099 (0.006)
II	Hoja	0.117 (0.002)	0.599 (0.007)	0.650 (0.009)	0.076 (0.001)	0.299 (0.004)	0.135 (0.002)	0.096 (0.002)	0.212 (0.003)	0.033 (0.003)
	Grano	0.125 (0.002)	0.670 (0.007)	0.721 (0.008)	0.083 (0.001)	0.336 (0.003)	0.150 (0.002)	0.103 (0.002)	0.233 (0.003)	0.021 (0.003)
III	Hoja	0.169 (0.002)	0.789 (0.005)	0.866 (0.006)	0.102 (0.001)	0.393 (0.002)	0.179 (0.001)	0.133 (0.001)	0.286 (0.002)	0.070 (0.002)
	Grano	0.169 (0.003)	0.777 (0.010)	0.859 (0.012)	0.103 (0.002)	0.386 (0.005)	0.178 (0.002)	0.137 (0.002)	0.286 (0.004)	0.089 (0.004)
IV	Hoja	0.082 (0.001)	0.443 (0.004)	0.476 (0.005)	0.055 (0.001)	0.222 (0.002)	0.099 (0.001)	0.068 (0.001)	0.153 (0.002)	0.012 (0.002)
	Grano	0.154 (0.003)	0.734 (0.010)	0.807 (0.012)	0.096 (0.002)	0.365 (0.005)	0.167 (0.002)	0.125 (0.003)	0.267 (0.004)	0.071 (0.004)
V	Hoja	0.069 (0.003)	0.363 (0.009)	0.392 (0.011)	0.046 (0.001)	0.181 (0.004)	0.081 (0.002)	0.057 (0.002)	0.127 (0.004)	0.017 (0.004)
	Grano	0.070 (0.002)	0.365 (0.005)	0.395 (0.006)	0.046 (0.001)	0.183 (0.003)	0.082 (0.001)	0.057 (0.001)	0.128 (0.002)	0.018 (0.002)
VI	Hoja	0.084 (0.001)	0.419 (0.004)	0.457 (0.004)	0.054 (0.001)	0.209 (0.002)	0.095 (0.001)	0.069 (0.001)	0.150 (0.002)	0.030 (0.002)
	Grano	0.120 (0.004)	0.618 (0.013)	0.670 (0.015)	0.078 (0.002)	0.309 (0.006)	0.139 (0.003)	0.098 (0.003)	0.218 (0.006)	0.033 (0.005)
VII	Hoja	0.132 (0.006)	0.693 (0.017)	0.749 (0.021)	0.087 (0.003)	0.347 (0.008)	0.156 (0.004)	0.109 (0.004)	0.243 (0.007)	0.030 (0.007)
	Grano	0.155 (0.002)	0.763 (0.007)	0.834 (0.008)	0.098 (0.001)	0.381 (0.003)	0.173 (0.002)	0.127 (0.002)	0.274 (0.203)	0.060 (0.003)

Respecto a la evaluación de actividad antioxidante se evaluaron cuatro métodos DPPH, ABTS, FRAP y FT, demostrando actividad antioxidante en todos los extractos, se observó que la mayor actividad la presentó la hoja proveniente de la región VI Baja Verapaz por los tres métodos DPPH, ABTS y FRAP, para el grano la región I San Marcos presentó la mejor actividad por el método de DPPH y la región V Huehuetenango por ABTS. La mayor cantidad de fenoles totales expresados como  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/g de extracto, la presentó la hoja proveniente de la región VII Zacapa (87.50) seguida de la hoja de Baja Verapaz (81.05) la cual se correlaciona con su actividad antioxidante, mientras que en el grano lo presentó la región II Quetzaltenango (92.55) y la región IV Santa Rosa (90.40), respecto al método FRAP la región III Villa Canales presentó la mejor actividad.

Tabla 12

Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas y granos de café por diferentes métodos

Regiones	Hoja				Grano			
	DPPH	ABTS	FT	FRAP	DPPH	ABTS	FT	FRAP
	CI <sub>50</sub> [IC 95%]	CI <sub>50</sub> [IC 95%]	µg ácido gálico/g de extracto**	g Fe <sup>+2</sup> /g de extracto**	CI <sub>50</sub> [IC 95%]	CI <sub>50</sub> [IC 95%]	µg ácido gálico/g de extracto**	g Fe <sup>+2</sup> /g de extracto**
I	1.92 (0.05) [1.88, 1.96]	2.05 (0.02) [2.04, 2.07]	33.99 (0.92) <sup>a</sup>	4.10 (0.03) <sup>a</sup>	0.816 (0.001) [0.814, 0.817]	1.51 (0.03) [1.48, .154]	78.23 (2.01) <sup>a</sup>	4.39 (0.04) <sup>a</sup>
II	1.47 (0.04) [1.43, 1.50]	2.03 (0.02) [2.01, 2.05]	44.94 (1.20) <sup>b</sup>	3.97 (0.11) <sup>a</sup>	1.03 (0.05) [0.97, 1.09]	1.75 (0.01) [1.74, 1.75]	85.68 (2.37) <sup>b,c</sup>	4.91 (0.04) <sup>b</sup>
III	1.24 (0.06) [1.18, 1.29]	1.44 (0.12) [1.33, 1.54]	53.27 (1.48) <sup>c</sup>	6.37 (0.03) <sup>b</sup>	1.69 (0.01) [1.68, 1.69]	2.28 (0.08) [2.21, 2.35]	86.15 (2.36) <sup>c</sup>	7.37 (0.06) <sup>c</sup>
IV	1.44 (0.06) [1.39, 1.49]	1.97 (0.03) [1.96, 2.00]	50.05 (1.31) <sup>c</sup>	5.23 (0.09) <sup>c</sup>	2.03 (0.10) [1.94, 2.11]	2.03 (0.10) [1.94, 2.11]	90.40 (2.42) <sup>d</sup>	6.91 (0.04) <sup>d</sup>
V	1.16 (0.02) [1.14, 1.18]	1.75 (0.09) [1.67, 1.83]	61.16 (1.71) <sup>d</sup>	7.20 (0.06) <sup>d</sup>	1.03 (0.02) [1.00, 1.06]	1.48 (0.01) [1.47, 1.50]	61.31 (1.57) <sup>e</sup>	7.04 (0.05) <sup>e</sup>
VI	0.63 (0.01) [0.62, 0.64]	0.92 (0.02) [0.90, 0.94]	81.05 (2.09) <sup>e</sup>	7.94 (0.03) <sup>e</sup>	1.03 (0.01) [1.02, 1.04]	1.83 (0.14) [1.70, 1.95]	81.88 (2.22) <sup>a,b</sup>	5.56 (0.04) <sup>f</sup>
VII	1.03 (0.04) [0.98, 1.08]	2.01 (0.08) [1.94, 2.08]	87.50 (2.39) <sup>f</sup>	6.30 (0.06) <sup>c</sup>	1.03 (0.04) [0.98, 1.08]	1.86 (0.05) [1.81, 1.91]	60.85 (1.65) <sup>e</sup>	6.74 (0.04) <sup>g</sup>
Quercetina	0.0749 (0.0004) [0.0745,0.0752]	0.1136 (0.0008) [0.1129,0.1143]	---	66.03 (7.08)	0.0749 (0.0004) [0.0745,0.0752]	0.1136 (0.0008) [0.1129,0.1143]	---	66.03 (7.08)
Trolox	0.1145 (0.0008) [0.1140,0.1154]	0.2726 (0.0006) [0.2721,0.2731]	---	23.19 (1.58)	0.1145 (0.0008) [0.1140,0.1154]	0.2726 (0.0006) [0.2721,0.2731]	---	23.19 (1.58)
TBHQ	0.1147 (0.0007) [0.1141,0.1153]	0.1992 (0.0008) [0.1985,0.1999]	---	36.57 (1.74)	0.1147 (0.0007) [0.1141,0.1153]	0.1992 (0.0008) [0.1985,0.1999]	---	36.57 (1.74)
Vitamina C	0.0876 (0.0105) [0.0783,0.0969]	0.0201 (0.0002) [0.1999,0.2008]	---	30.75 (1.88)	0.0876 (0.0105) [0.0783,0.0969]	0.0201 (0.0002) [0.1999,0.2008]	---	30.75 (1.88)

DPPH = 1,1-difenil-2-picirilhidrazilo; ABTS = 2,2'-azinobis-(ácido-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico); FT = Fenoles Totales; FRAP = Reducción de hierro, CI<sub>50</sub> = Concentración inhibitoria media \*\* Las letras diferentes indican  $p < .05$  (Prueba de Tukey).

## **16. Análisis y discusión de resultados**

Se colectaron muestras de café en siete regiones de Guatemala proveniente de fincas de reserva natural, se observó que la variedad que predomina es la Caturra, esta variedad es originaria de Brasil, mutación de Bourbon, porte bajo, compacto, excelente productor, resistente al viento, se adapta bien en las diferentes regiones del país y prácticamente en todos los rangos altitudinales por lo que predominó en cuatro regiones. Se observó que en todas las regiones estudiadas el cultivo es bajo sombra, según Rodríguez y colaboradores (2016) el sistema foliar de los árboles de café expuestos a una radiación solar mayor presentan menor tamaño, mayor grosor histológico del parénquima y mayor frecuencia estomática, el crecimiento foliar de los árboles de café independientemente de la exposición solar, está estrechamente relacionado con las precipitaciones y la época fenológica del cultivo, por lo que cultivares bajo sombra han presentado mejores características.

Se conoce que hay diferencias de composición entre las especies y otras que son originadas por el clima, composición del suelo, altitud, los mismos influyen sobre la calidad del café. Los beneficios de la sombra se explican principalmente por una reducción del estrés hídrico causado por la exposición a la radiación; así mismo, por proporcionar condiciones óptimas para una buena maduración (Muschler, 2001; Salazar, Burgos & Bautista, 2015).

Se realizó la determinación del rendimiento fresco/seco observándose que el mayor rendimiento se presentó en las hojas provenientes de Santa Rosa (57.1%), la relación del rendimiento fresco/seco presentada en las muestras fue de 15.4-57.1% observándose en regiones como Baja Verapaz, Zacapa y Huehuetenango la mayor cantidad de humedad presente en las hojas. En los granos se observaron mayores rendimientos, ya que presentó una menor cantidad de humedad. Todas las muestras fueron secadas en horno de convección de aire para disminuir la humedad por debajo del 10% para evitar el deterioro del material.

La prueba de sólidos totales permite determinar la concentración alcohólica a la cual se debe realizar la extracción para obtener la mayor cantidad de sólidos, y de esta manera hacer más eficiente la extracción, lo cual demuestra la presencia de compuestos polares

presentes dependiendo del grado alcohólico utilizado. Según los resultados obtenidos se observó la mejor extracción empleando etanol al 50 ° y al 70 ° lo cual evidencia la presencia de compuestos de alta polaridad.

Los resultados de las propiedades físicas del grano se muestran en la Tabla 5, se observaron rangos de densidad aparente de 0.32-0.59 g/mL, la literatura reporta valores de densidad del grano de 1.2-1.3 g/mL (Dutra, Oliveira, Franca, Ferraz, & Afonso, 2001; Franca, Oliveira, Mendonça & Silva, 2004), y la densidad aparente de los granos de café verde en rangos de 0.63-0.64 g/mL y de café tostado 0.33- 0.35 g/ mL (Franca, Mendonça, & Oliveira, 2005). Uribe (1977) reporta la densidad aparente del grano del café pergamino (0.38 g/mL) y grano del café almendra (0.68 g/mL). Montilla y colaboradores (2008) reportaron valores de 0.39 g/mL y 0.70 g/mL para café pergamino y café almendra respectivamente. El desarrollo del fruto está influenciado por múltiples factores, principalmente por la disponibilidad hídrica, tipo de suelo, variedad de café (Mehari, et al., 2016) por lo que es importante caracterizarlo en base a las condiciones propias de cada lugar y características del cultivo.

La determinación de cenizas permite determinar la presencia de material inorgánico y metales en las muestras, observándose que la hoja proveniente de Huehuetenango presentó la mayor cantidad de cenizas totales y ácidas. En el grano la región I San Marcos presentó la mayor cantidad de cenizas. Las cenizas se ha reportado para café verde de 4.8-5.8 % y para café tostado de 4.0-4.9 % (Oliveira, Franca, Mendonça, & Barros, 2005), evidenciándose que en el grano ninguna muestra supera el 5 % de cenizas totales, mientras que en la hoja hay regiones que presentan mayores porcentajes demostrándose que hay mayor acumulación de material inorgánico en las hojas.

Se determinó rendimientos de extracción muy promisorios en todas las muestras, ya que se presentaron rendimientos de 28.80-48.32%, lo cual evidencia la rentabilidad que podrían tener los extractos de hojas, especialmente la hoja proveniente de Baja Verapaz y en el grano la región III Villa Canales y región VII Zacapa. Respecto al aceite obtenido en los granos se observaron rendimientos de 1.3-4.18 %, la región IV Santa Rosa, presentó el

mayor rendimiento de aceite. Estudios previos han reportado el rendimiento del aceite de café verde 0.2-0.3 % (De Azevedo, Mazzafera, Mohamed, Melo, & Kieckbusch, 2008); en granos de café tostado de 12-13 % (Guercia, Berti, Navarini, Demitri, & Forzato, 2016), en granos de café 10-16 % (Patay, Bencsik & Papp 2016), el total de lípidos en materia seca de café verde de 11.7 a 14 %, granos de café Arabica de 13.5 a 17.4 g y en robusta de 9.8 a 10.7 %, las diferencias se deben principalmente al origen geográfico, método de extracción, tiempo de extracción, disolvente utilizado (Garg, 2016).

Se cuantificó la presencia de cafeína y ácido clorogénico (ACG) en hojas de café, los cuales son dos constituyentes característicos del café, los cuales podrían servir de marcadores químicos para evaluar la calidad del café, se evidenció que la hoja proveniente de la región I San Marcos, presentó la mayor cantidad de ACG (1.04%) y en el grano la región IV Santa Rosa (6.67%).

El contenido de ACG se ha analizado en varios estudios según la especie, variedad, origen geográfico, estado de desarrollo del fruto, proceso de beneficio, tostación y formas de preparación de bebida. Las mayores diferencias se han encontrado entre las especies silvestres de África, con promedio de ACG del 1.4% al 14.4% (suma de los tres isómeros) (Clifford, 1985; Ky et al., 2001), lo cual evidencia que la concentraciones de ACG son menores en hojas.

En las almendras de las variedades comerciales de *C. arabica* se han registrado promedios de ACG del 5 al 8% (Balyaya & Clifford, 1995; Farah, de Paulis, Trugo, & Martin, 2005; Farah, de Paulis, Moreira, Trugo & Martin, 2006; Ohiokpehai, Brumen, & Clifford, 1982), en *C. canephora* del 6.6 al 12.3 % y en *C. liberica* del 7.6 al 14% (Anthony, Clifford, & Noirot 1993; Clifford, & Kazi, 1987; Ky et al., 2001). El ácido clorogénico es un factor importante que determina el sabor del café y contribuye a la acidez final y amargor (Trugo & Macrae, 1984) además le confiere astringencia (Variyar, et al., 2003).

Son pocos los estudios que refieren la cantidad de ACG en hoja, un estudio reportó el CGA total en extractos acuosos en ocho especies de café, en dos épocas diferentes enero y julio, en el cual se determinaron concentraciones mayores en hoja de *C. arabica* colectada en enero 41.0 mg/L (0.0004%), mientras que *C. liberica* mostró la mayor concentración de

todas las especies en julio 127.0 mg/L (0.0127%) (Rodríguez et al., 2018), lo cual evidencia que la época de colecta puede influir en las concentraciones de los metabolitos. De Almeida y colaboradores (2018) reportaron el contenido de ACG en hojas provenientes de tres regiones de Brasil en el cual determinaron concentraciones de 0.2-1.75 %, además determinaron 16 compuestos fenólicos, agrupados como xantonas, ácidos clorogénicos y flavonoides. La principal xantona encontrada fue la mangiferina, el ácido 5-*O*-cafeoilquínico y la rutina el cual le brinda a la hoja un potencial como nutracéutico. Las tres clases de polifenoles mostraron correlación con los ensayos antioxidantes (DPPH, FRAP y ORAC), lo cual confirma que la hoja de café podría ser utilizada como una bebida funcional por sus compuestos polifenólicos que pueden mostrar efectos biológicos positivos, incluyendo actividad antioxidante (Bartsch, Nair, & Owen, 1999).

Del ACG se ha reportado los beneficios a la salud incluyendo el control del estrés oxidativo, inflamación, envejecimiento y cáncer (Chen & Wu, 2014; Han, 2010; Wang et al., 2016), el ácido dicafeoilquínico y feruloilquinico se ha detectado en hojas de *C. canephora* (Mondolot et al., 2006).

La región VI Baja Verapaz, demostró la mayor cantidad de fenoles totales (81.05 µg ácido gálico/g de extracto) y se evidenció una correlación de la actividad antioxidante con el contenido fenólico. Según el análisis estadístico hay diferencia entre las muestras a excepción de la región I San Marcos y II Quetzaltenango, las cuales no mostraron diferencias.

La hoja de café arábigo y de Bengala ha reportado ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido clorogénico, *p*-coumárico, ferúlico, sinápico, rutina, quercetina, kaempferol, isoquercitrina, isómeros cis de ácido clorogénico se ha observado en altas cantidades en la hoja de café Arábigo comparado con las semillas. Se ha sugerido que la radiación UV puede proveer isomerización geométrica en las hojas (Clifford, Kirkpatrick, Kuhnert, Roozendaal, & Salgado, 2008). Se ha detectado *C*-glucosilxantona, mangiferina, ésteres de ácido feruloilquinico en gran cantidad en las hojas de café, la mangiferina se ha aislado de las hojas, corteza y piel de mango (*Mangifera indica* L) y es bien conocida por sus propiedades

farmacológicas como antiinflamatoria, antidiabética, antihiperlipidémica, neuroprotectiva y por su actividad antioxidante y antimicrobiana (Campa et al., 2012).

Se reportó la concentración de manguiferina en cultivares de Brasil (0.67-4.97 g/kg) y Costa Rica (0.85-4.01 g/kg) mostrando dominancia del 80% de manguiferina respecto a isomanguiferina (Trevisan, de Almeida, Soto, Virginio, Ulrich & Owen, 2016), lo cual demuestra el potencial de la hoja en el mantenimiento de la salud por su composición de compuestos fenólicos como antioxidantes.

Patay y colaboradores (2016) compararon un extracto etanólico al 5% de hojas de *C. benghalensis* el cual presentó ácido caféico, isoquercitrina, rutina y como mayoritario ácido clorogénico (428 µg/mL), contra un extracto hidrolizado con HCl 2 N, el cual presentó ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, quercetina, kaempferol y ácido caféico (125.55 µg/mL) como mayoritario; mientras que *C. arabica* presentó ácido caféico, ácido *p*-coumárico, isoquercitrina, rutina y ácido clorogénico (605.65 µg/mL) como mayoritario y el extracto hidrolizado presentó ácido caféico, ácido *p*-coumárico, ácido sinápico, quercetina, kaempferol y ácido ferúlico (103.90 µg/mL) como mayoritario.

Un estudio demostró que la edad de las hojas y el tipo de procesamiento afecta el perfil fitoquímico y por ende influye en la actividad antioxidante y antiinflamatoria, se observó que las hojas jóvenes pueden constituir un potencial para producción de compuestos naturales para la salud por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, mientras que las hojas de mayor maduración podrían mitigar la presión alta reduciendo el daño cardiovascular o proteger contra agentes microbianos (Chen, Ma, & Kitts, 2018).

Para el café almendra se han presentado un contenido de cafeína del 0.09% al 3.3%, (Anthony, Clifford, & Noirot, 1993; Guyot, Petnga, & Vincent, 1988), Farah y colaboradores (2006) reportaron contenidos de cafeína en granos de café verde (0.96-1.23 %), Belay et al., (2008) reportó cafeína en granos provenientes de cuatro regiones del Sur de Etiopía (0.90-1.10 %), según los resultados obtenidos en este estudio se presentaron en las siete regiones de Guatemala valores de cafeína en hoja de (0.453- 0.725 %), siendo el más alto para la región VI Baja Verapaz, mientras que en grano se presentaron concentraciones más altas

(0.520-1.193 %), siendo la región I San Marcos la que presentó la mayor concentración de cafeína.

Cafeína y trigonellina se ha reportado en granos de café verde encontrando 0.84-1.15 % (p/p) y 0.83-1.13 % (p/p) respectivamente (Yisak, Redi-Abshiro, & Chandravanshi, 2018). Otros estudios han reportado 0.87-1.38% para cafeína y 0.98-1.32% para trigonellina (Mehari, et al., 2016); 0.8-1.4% de cafeína y 0.6-1.2% de trigonellina (Belitz, Grosch & Schieberle, 2009), 0.90–1.10% (Belay, Ture, Redi & Asfaw, 2008) y 0.62–1.16% para cafeína, además se correlacionó la altura con el contenido de cafeína el cual indica claramente que los contenidos de cafeína son más bajos en los granos de café verde obtenido de plantas cultivadas a mayores altitudes mientras que los contenidos de cafeína son más altos en los granos de café verde obtenidos de las plantas cultivadas en altitudes más bajas en Etiopía (Hagos et al., 2018), en las diferentes regiones de Guatemala se observó que las de mayor altura presentaron en su mayoría la mayor cantidad de cafeína, de acuerdo al análisis estadístico se determinó que existen diferencias en la concentración de ácido clorogénico en la hoja y en el grano, mientras que en el contenido de cafeína en hojas es igual en la región III y IV pero difieren con las otras regiones y en el grano no existen diferencias en la región IV, V y VII y en la región II y VI presentaron menor cantidad de cafeína los granos que la hoja.

La cantidad de alcaloides (cafeína, teobromina y trigonellina) es influenciada por factores como propiedades genéticas, factores ambientales (suelo, altura, exposición solar), parámetros climáticos (temperatura, precipitación pluvial), madures en la cosecha, prácticas agrícolas (fertilización), todos estos factores proveen diferentes características al café y atributos a la bebida (Mehari, et al., 2016).

Respecto al porcentaje de azúcares totales en hoja de café se observaron rangos de 1.33-2.98 %, siendo la región III (Villa Canales) la que presentó el porcentaje más alto, mientras que en granos se presentaron concentraciones de 1.35-3.29 %, se determinó que en las hojas no existe diferencia en la región IV y VI, mientras que en los granos no hay diferencias en la región IV y VII.

El contenido total de carbohidratos de bajo peso molecular definido como mono y oligosacáridos en granos de café verde es relativamente bajo. Sucrosa es uno de los principales carbohidratos encontrados (9 % del peso seco). Bradbury describe la los contenidos de sucrosa de 5-8.5 % para granos de arabica y 2-5 % para robusta. Recientemente mediante análisis de cromatografía de intercambio iónico se ha detectado concentraciones promedio de 7.3 % en arabica y para robusta promedios de 4.5 %. El total de azúcares reductores es más alto en robusta que en arabica. Glucosa y fructosa son los principales monosacáridos encontrados en arabica y robusta y sus contenidos pueden variar como consecuencia del manejo poscosecha, menores cantidades de galactosa, arabinosa, ramnosa y manosa han sido descritas en granos de café (Murkovic & Derler, 2006; Knopp, Bytof, & Selmar, 2006).

Se han reportado contenido de polisacáridos solubles en agua de granos de café por diferentes métodos de poscosecha observándose porcentajes de 1.95-2.79 %. Diversos polisacáridos se han reportado en granos de café siendo estos fructosa (5 %), rafinosa (0.77 %), staquiosa (0.51 %), glucosa (2.95 %), galactosa + arabinosa+ ramnosa y manosa (0.13 %), la sucrosa es uno de los principales carbohidratos de bajo peso molecular y arabinoglactanos de tipo II y galactomanano acetilado presentes en café verde, los carbohidratos juegan un papel importante en la generación de las características del aroma, sabor, color del café tostado, contribuyen al contenido de fibra en la dieta y pueden modular la respuesta celular inmune in vitro y los arabinogalactanos han presentado actividad antitusiva in vivo (de Oliveira, 2015).

La forma más extendida de evaluar la actividad antioxidante de una sustancia es mediante métodos in vitro espectrofotométricos. Los principales son ORAC, FRAP, TEAC y DPPH. El ensayo FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico tripiridil triazina. Por su facilidad de operación, los ensayos DPPH y TEAC son los más extendidos, el ensayo DPPH se basa en la detección del radical cromógeno DPPH (Prior & Cao, 2000) Se ha establecido en granos de café verde contiene antioxidantes como ácido clorogénico, ácidos fenólicos, polifenoles y alcaloides y su contenido depende de la especie y su origen (Belay, Ture, Redi & Asfaw, 2008; Chu, Lin, Yu & Ye, 2007)

Todas las muestras presentaron actividad antioxidante moderada comparada con los estándares, en la prueba de reducción de hierro se evidenció que solo los extractos de región V Huehuetenango y región VI Baja Verapaz son diferentes respecto a las otras regiones, y la región VI mostró la mayor actividad antioxidante en hojas, mientras que en grano lo presentó la región II Quetzaltenango. Se determinó que en las hojas existe diferencia entre el contenido de fenoles totales en todas las regiones, mientras que en los granos se observó que la región II no existen diferencias con la región III y la región VI es similar a la región I y II.

En la cantidad de hierro que reduce el extracto se observó en las hojas que la región I y II no presentan diferencias, al igual que la región IV y VII, mientras que en el grano todas las regiones presentaron diferencias.

La actividad antioxidante de las hojas de café corresponde particularmente a la presencia de compuestos fenólicos incluyendo ácido cafeico, clorogénico, *p*-coumárico, ferúlico y sinapico, quercetina, isoquercitrina, rutina, catequina, epicatequina, manguiferina e isomanguiferina (Patay et al., 2016). Una alta concentración de ácido clorogénico es considerada como un constituyente que aporta a la actividad antioxidante en las hojas, ya que el ácido clorogénico puede atrapar radicales libres, metales y regular la expresión de enzimas antioxidantes (Liang, Xue, Kennepohl, & Kitss, 2016). Se ha reportado actividad antioxidante de otros compuestos fenólicos como manguiferina, rutina, antocianinas, catequina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico los cuales pueden contribuir a la actividad antioxidante en extractos de hoja de café (Chen, Ma & Kitss, 2018; Dar et al., 2005; Yan, Guo, & Yuan, 2008).

Patay y colaboradores (2018) compararon la composición fitoquímica de *C. benghalensis*, *C. arabica* y *C. liberica*, encontrando ácidos fenólicos como los principales constituyentes en todos los extractos, los trómeros de procianidinas se presentaron exclusivamente en hojas, en *C. benghalensis* detectaron como principales constituyentes ácido 5-cafeolquínico y ácido 4-cafeolquínico, flavan-3-ols fue detectado en pericarpios y hojas, mientras que el ácido 4-feruloilquínico fue descrito en semillas y los ácidos

dicafeolquínico solamente en semillas maduras, la manguiferina la detectaron en hojas, pericarpio maduro y semillas.

Teboukeu y colaboradores (2018) evaluaron varios métodos para optimizar la extracción de antioxidantes naturales en hojas de *C. robusta* encontrando que empleando disolventes como el metanol 80%, empleando una extracción con soxhlet a 53.70 °C, con una duración de 5.6 horas, obtuvieron valores de polifenoles totales de 127.06 mg de equivalentes de ácido gálico/g y una inhibición de radicales libres del 90.65%

Estudios realizados en hojas de *C. arabica*, han descrito el contenido de fenoles totales reportando un rango de 1.65 a 20.60 g de ácido gálico/100 g de extracto y un rango de flavonoides totales de 0.26 a 14.96 g de rutina/100 g de extracto, se cuantificó el ácido cafeoilquínico encontrando rangos de 2.29 a 5.50 g/100 g de extracto (Segheto, Santos, Werneck, Vilela, de Sousa & Rodarte, 2018). La eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos empleando disolventes polares y metanol ha sido descrita en la literatura (Ramalakshmi et al., 2008).

Los compuestos fenólicos en hojas de café juegan un rol como mecanismo de defensa contra factores externos, resistencia a infecciones por patógenos e infestación de plagas, estados fenológicos y crecimiento de plantas (Campa et al., 2012). Los derivados de ácidos fenólicos se han encontrado en hojas de café, con cantidades importantes en café verde, café tostado y bebidas, el ácido clorogénico (ácido caféico, coumárico y ferúlico) están asociados con la acción antioxidante y antiinflamatoria (Górnas et al., 2016). El contenido de ácido cafeoilquínico en granos de café verde varía entre 3.59 y 3.91g/100 g (Monteiro & Farah, 2012) y 2.9 a 3.4 g/100 g (Mehari et al., 2016). La diferencia es debida al proceso de extracción y disolventes utilizados, basado en los porcentajes encontrados de ácido clorogénico en hojas, esta parte de la planta puede constituir un buen recurso de fenoles totales.

Pérez-Martínez y colaboradores (2010) reportaron el contenido de polifenoles en diferentes tipos de cafés variedad arábica colombianos con tres tipos de tostados reportando

rangos de 37-55 mg/g, además Hečimović y colaboradores (2011) reportaron para cafés variedad arábica rangos de polifenoles de 25-40 mg/g y para flavonoides dependiendo el grado de tostado encontró rangos de 15.41-17.29 mg/g.

Se reportó la actividad antioxidante del extracto metanólico y fracciones de *C. arabica* hojas demostrando  $CI_{50}$  entre 7.47 (0.12) a 122.76 (1.38)  $\mu\text{g/mL}$  por el método DPPH y 4.67 (0.02) a 71.90 (0.22)  $\mu\text{g/mL}$  por el método FRAP (Segheto et al., 2018), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para las siete regiones de Guatemala, sin embargo se observan diferencias por la forma de expresar los resultados en otros estudios. El efecto antioxidante ha sido reportado en varios estudios, sin embargo en hojas de café no ha sido suficientemente explorada. Hasanaha et al., (2016) reportó en el extracto etanólico, acuoso y la fracción de acetato de etilo una  $CI_{50}$  de 39.7, 82.8, y 28.2  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Los resultados de este estudio demuestran que todas las regiones presentaron actividad antioxidante importante, al igual que constituyentes químicos como cafeína, fenoles y ácido clorogénico, aunque existen diferencias se demuestra la potencialidad de cada una de las regiones y es un primer hallazgo del potencial que pueden representar las hojas como antioxidantes, las cuales son subutilizadas y abre la oportunidad para continuar con estudios en búsqueda de actividad y evaluación de la toxicidad para que se consideren aptas para el consumo humano y proponer nuevos productos en base a las hojas y darle un aprovechamiento sostenible.

## **17. Conclusiones**

**17.1** Se caracterizó la composición química y actividad antioxidante de extractos de hojas y granos provenientes de siete regiones de cultivo de café, en la cual predomina la variedad

Caturra en cuatro de ellas, determinándose la presencia de ácido clorogénico, cafeína, azúcares, compuestos fenólicos y la correlación con la actividad antioxidante.

- 17.2** La prueba de sólidos totales demostró la presencia de compuestos de alta y media polaridad ya que los mayores porcentajes se observaron con las concentraciones de etanol de 50° y 70 °
- 17.3** Los granos de café presentaron propiedades físicas las cuales se ven influenciadas por factores genéticos, ambientales, agronómicos, manejo post cosecha reportando diferencias en cuanto al color, densidad y ancho.
- 17.4** Se determinó que las hojas presentaron mayores porcentajes de cenizas totales (4.73-8.33 %) respecto a los granos (3.06-4.16 %) lo cual evidencia mayor acumulación de material inorgánico en hojas.
- 17.5** Los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron en las hojas (28.80 -48.32 %), siendo la región VI la que presentó el mayor rendimiento, mientras que en los granos el mayor rendimiento se observó en la región III y VII (29.83 %) y el mejor rendimiento de aceite lo presentó la región IV (4.18 %).
- 17.6** Se determinó que el mayor contenido de marcadores químicos como ácido clorogénico, cafeína y azúcares, se presentó en los granos, siendo la región IV la que presentó la mayor cantidad de ácido clorogénico (6.675 %) y la región I la que presentó la mayor cantidad de cafeína (1.193 %) y azúcares (3.29 %), siendo la maltosa la que presentó la mayores concentraciones.
- 17.7** Se demostró actividad antioxidante en todos los extractos siendo las hojas de la región VI la que presentaron la mejor actividad por DPPH, ABTS y FRAP, lo cual se correlacionó con la cantidad de fenoles presentes, en el grano la región I presentó la mejor actividad antioxidante por DPPH, la región V por ABTS y la región III por FRAP y la mayor cantidad de fenoles en la región IV, lo cual evidencia que existe mayor variabilidad en los granos que en las hojas respecto a su actividad.
- 17.8** De acuerdo a la composición química se determinó en las hojas y granos que existe mayor variabilidad entre las regiones respecto a la concentración de ácido clorogénico, mientras que en cafeína presente en hojas hay dos regiones en las cuales no existen diferencias (región III y IV), en el grano en tres regiones IV, V y VII no hay diferencias,

y en azúcares no hay diferencias en dos regiones tanto en hoja (región IV y VI) como en grano (IV y VII).

**17.9** La actividad antioxidante se correlacionó mejor con la composición química de las hojas con respecto al grano, y se evidenció la potencialidad de las hojas como alimento funcional por la presencia de fenoles totales y ácido clorogénico.

**17.10** Todas las regiones presentaron potencialidad, algunas por los rendimientos de extracción, por su composición química o actividad biológica por lo que cada una tiene sus oportunidades las cuales puede aprovechar y explorar para la propuesta de productos antioxidantes.

### **18. Impacto esperado**

Los resultados generados permitieron caracterizar cuatro variedades de café cultivadas en siete regiones de Guatemala, se detectaron los metabolitos secundarios que tienen importancia en la actividad antioxidante, los cuales se pueden proponer como marcadores químicos del café siendo el ácido clorogénico y cafeína los que pueden permitir diferenciar el café, para el aprovechamiento de las especies con diversas aplicaciones, para darle un valor agregado a la especie. Es importante continuar con los estudios que permitirán generar nuevos productos naturales y brindar opciones alternativas de diversificación y aprovechamiento de subproductos como la hoja la cual actualmente no tiene mayor utilidad y sobresalió su actividad antioxidante como un primer hallazgo. Ante los precios variables del grano de café, la posibilidad de desarrollar un producto innovador de las hojas actualmente no utilizadas podría contribuir a mejorar los ingresos de los productores, así como ofrecer alternativas de infusiones cordiales en el país, actualmente dominado por *Camellia sinensis* que es principalmente importada.

## 19. Referencias

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Almeida, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A., & Glória, M. B. A. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8738-8743. doi: 10.1021/jf0617317
- Almeida, A. A. P., Naghetini, C. C., Santos, V. R., Antonio, A. G., Farah, A., & Glória, M. B. A. (2012). Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Research International*, 49, 459-461. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.026
- Anthony, F., Clifford, M. N., & Noirot, M. (1993). Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40(2), 61-70.
- Antonio, A. G., Iorio, N. L. P., Pierro, V. S. S., Candreva, M.S., Farah, A., Santos, K. R., & Maia, L. C. (2011). Inhibitory properties of *C. canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralization of deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*, 56, 556-564. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.12.001
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.
- Balyaya, K.J., & Clifford, M.N. (1995). Chlorogenic acids and caffeine contents of monsooned Indian Arabica and Robusta coffees compared with wet and dry processed coffees from the same geographic area. *16<sup>th</sup> COLLOQUE Scientifique International sur le Café, ASIC*.
- Bartsch, H., Nair, J., & Owen, R. W. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 20(12), 2209-2218.
- Belay, A., Ture, K., Redi, M., & Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, 108(1), 310-315. doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.024
- Belayneh, A., & Bussa, N. F. (2014). Ethnomedicinal plants used to treat human ailments in the prehistoric place of Harla and Dengego valleys, eastern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10, 18. doi: 10.1186/1746-4269-10-18
- Belguidoum, K., Guebailia, H. A., Boulmouk, Y., & Houache, O. (2014). HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45, 1314-1320. doi:10.1016/j.jtice.2014.03.014
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Coffee, tea, cocoa. *Food Chemistry*, vol. 938-970

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bertrand, B., Boulanger, R., Dussert, S., Ribeyre, F., Berthiot, L., Descroix, F., & Joët, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*, 135, 2575–2583. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.060
- Bhupathiraju, S. N., Pan, A., Malik, V. S., Manson, J. E., Willett, W. C., van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2013). Caffeinated and caffeine-free beverages and risk of type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 155–166. doi:10.3945/ajcn.112.048603.
- Bisht, S., & Sisodia, S.S. (2010). *Coffea arabica*: A wonder gift to medical science. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 1, 58-66.
- Bresciani, L., Calani, L., Bruni, R., Brighenti, F., & Rio, D. D. (2014). Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, 61, 196-201. doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.047
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(4), 221-247.
- Buffo, R. A., & Freire, C. C. (2004). Coffee flavour: an overview. (2004). *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 99-104. doi: 10.1002/ffj.1325
- Campa, C., Mondolot, L., Rakotondravao, A., Bidel, L. P., Gargadennec, A., Couturon, E., & Davis, A. P. (2012). A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Annals of Botany*, 110(3), 595-613. doi: 10.1093/aob/mcs119.
- Cano-Marquina, A., Tarín, J.J., Cano, A. (2013). The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75,7–21. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.02.002
- Casal, S., Alves, M. R., Mendes, E., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, M. A. (2003). Discrimination between Arabica and Robusta coffee species on the basis of their amino acid enantiomers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6495–6501. doi: 10.1021/jf034354w
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (2000). HPLC/diode-array to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*, 68, 481–485. doi: 10.1016/S0308-8146(99)00228-9
- Chen, W. P., & Wu, L. D. (2014). Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8797.
- Chen, X. M., Ma, Z., & Kitts, D. D. (2018). Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chemistry*, 249, 143-153. doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.073
- Chen, X., Kitts, D. D., Ji, D., & Ding, J. (2019). Free radical scavenging activities of phytochemical mixtures and aqueous methanolic extracts recovered from processed

- coffee leaves. *International Journal of Food Science & Technology*. doi:10.1111/ijfs.14099
- Chen, X., Mu, K., & Kitts, D. D. (2019). Characterization of phytochemical mixtures with inflammatory modulation potential from coffee leaves processed by green and black tea processing methods. *Food chemistry*, 271, 248-258
- Chu, Q., Lin, M., Yu, X., & Ye, J. (2008). Study on extraction efficiency of natural antioxidant in coffee by capillary electrophoresis with amperometric detection. *European Food Research and Technology*, 226(6), 1373-1378. doi:10.1007/s00217-007-0667-z
- Ciaramelli, C., Palmioli, A., & Aioldi, C. (2019). Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. *Food chemistry*, 278, 47-55.
- Clifford, M. N. (1985). Chlorogenic acids. In R. J. Clarke & R. MacRae (Eds.), *Coffee chemistry* (pp. 153–202). Amsterdam: Elsevier Applied Science.
- Clifford, M. N., & Kazi, T. (1987). The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chemistry*, 26(1), 59-69. doi.org/10.1016/0308-8146(87)90167-1
- Clifford, M. N., Kirkpatrick, J., Kuhnert, N., Roozendaal, H., & Salgado, P. R. (2008). LC–MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry*, 106(1), 379-385.
- Cooper, R., & Kronenberg, F. (Eds.) (2009). *Botanical medicine*. New Rochelle, NY: Mary Ann Liebert.
- Cuadras, S. (2017). Café de Guatemala. Fórum Café. Guatemala. Anacafé. www.anacafe.org
- Dar, A., Faizi, S., Naqvi, S., Roome, T., Zikr-ur-Rehman, S., Ali, M., ... Moin, S. T. (2005). Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: The structure activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(4), 596–600. doi:10.1248/bpb.28.596
- Davis, A. P., Chester, M., Maurin, O., & Fay, M. F. (2007). Searching for relatives of Coffea (Rubiaceae, Ixoroidea): the circumscription and phylogeny of Coffeae based on plastid sequence data and morphology. *American Journal of Botany*, 94, 313-329. doi: 10.3732/ajb.94.3.313
- De Almeida, R. F., Trevisan, M. T. S., Thomaziello, R. A., Breuer, A., Klika, K. D., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2018). Nutraceutical compounds: Echinoids, flavonoids, xanthenes and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three regions of Brazil. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.006
- De Azevedo, A. B. A., Mazzafera, P., Mohamed, R. S., Melo, S. A. B., & Kieckbusch, T. G. (2008). Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(3), 543-552.

- De Maria, C. A. B., Trugo, L. C., Moreira, R. F. A., & Werneck, C. C. (1994). Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. *Food Chemistry*, *50*, 141–145. doi: 10.1016/0308-8146(94)90111-2.
- De Oliveira, C.L. (2015). Polysaccharides in coffee and their relationship to health: An overview. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 163-172).
- Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, *125*(4), 1430-1435
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Dong, W., Tan, L., Zhao, J., Hu, R., & Lu, M. (2015). Characterization of fatty acid, amino acid and volatile compound compositions and bioactive components of seven coffee (*Coffea robusta*) cultivars grown in Hainan Province, China. *Molecules*, *20*, 16687-16708. doi: 10.3390/molecules200916687
- Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *9*(2), 14-32 doi:10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092
- Dutra, E. R., Oliveira, L. S., Franca, A. S., Ferraz, V. P., & Afonso, R. J. C. F. (2001). A preliminary study on the feasibility of using the composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast. *Journal of Food Engineering*, *47*(3), 241-246. doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00116-3.
- Escobar Molina, M. C. (2017). *Selección de cultivares promisorios de café Coffea arabica L. basado en resistencia a roya del café Hemileia vastatrix Berk. & Br. in vitro y en condiciones de campo en zonas cafetaleras de Guatemala CA* (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).
- Eskenasy, E. (2018). El entorno económico mundial es positivo para el 2018. *Revista El Cafetal*, *1*, 10-14.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, *46*, 488–495. doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028
- Farah, A. (2009). Coffee as specialty and functional beverage. In P. Paquin (Ed.), *Functional and Specialty beverage technology*. (pp 370–390). Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, USA.
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*(1), 23–36. doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003
- Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 374-381. doi:10.1021/jf0518305
- Farah, A., DePaulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acids lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1505–1513. doi: 10.1021/jf048701t

- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), 373-380
- Farhoosh, R. (2018). A Kinetic Approach to Evaluate the Structure-Based Performance of Antioxidants During Lipid Oxidation. *Journal of Food Science*, 83(1), 101-107.
- Fattorusso, E., & Scafati, O. T. (2008). *Modern alkaloids. Structure, isolation, synthesis and biology*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Ferrari, M., Ravera, F., de Angelis, E. Liverani, F.S., & Navarini, L. (2010). Interfacial properties of coffee oils. *Colloid and Surfaces A*, 365, 79–82. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.02.002
- Franca, A. S., Mendonça, J. C., & Oliveira, S. D. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT-Food Science and Technology*, 38(7), 709-715. doi:10.1016/j.lwt.2004.08.014
- Franca, A. S., Oliveira, L. S., Mendonça, J. C. F., & Silva, X. A. (2004). Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chemistry*, 90(1–2), 84–89. doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.028
- Freedman, J. E., Parker, C., Li, L., Perlman, J. A., Frei, B., Ivanov, V...Folts, J. D. (2001). Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, 103, 2792-2798. doi.org/10.1161/01.CIR.103.23.2792.
- Garg, S. K. (2016). Green coffee bean. In *Nutraceuticals* (pp. 653-667).
- Gebeyehul, B. T., & Bikila, S. L. (2015). Determination of caffeine content and antioxidant activity of coffee. *American Journal of Applied Chemistry*, 3(2), 69-76. doi: 10.11648/j.ajac.20150302.16
- Ghimire, K., & Bastakoti, R. R. (2009). Ethnomedicinal knowledge and healthcare practices among the Tharus of Nawalparasi district in central Nepal. *Forest Ecology and Management*, 257, 2066-2072. doi:10.1016/j.foreco.2009.01.039
- Górnás, P., Dwiecki, K., Siger, A., Tomaszewska-Gras, J., Michalak, M., & Polewski, K. (2016). Contribution of phenolic acids isolated from Green and roasted boiled-type coffee brews to total coffee antioxidant capacity. *European Food Research and Technology*, 242(5), 641-653.
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., ... & Elmore, S. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food Chemistry*, 264, 471-475. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.012.
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Filho, J. M., Torres, R. P., & Pinto, E. (2010). Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash content in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*, 120, 585–590. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.028.
- Guercia, E., Berti, F., Navarini, L., Demitri, N., & Forza, C. (2016). Isolation and characterization of major diterpenes from *C. canephora* roasted coffee oil. *Tetrahedron: Asymmetry*, 27, 649-656. doi:10.1016/j.tetasy.2016.06.008

- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Angulo-Escalante, M. A., León-Félix, J., & Heredia, J. B. (2017). Effect of In Vitro Digestion on the Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 3 Species of Oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). *Journal of Food Science*, 82(12), 2832-2839.
- Guyot, B., Petnga, E., & Vincent, J. C. (1988). Analyse qualitative d'un café Coffea canephora var. Robusta en fonction de la maturité, 1: Evolution des caractéristiques physiques, chimiques et organoléptiques. *Café, Cacao, Thé (France)* 32(2), 127-140.
- Hagos, M., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Ele, E., Mohammed, A. M., & Mamo, H. (2018). Correlation between caffeine contents of Green coffee beans and altitudes of the coffee plants grown in southwest Ethiopia. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 32(1), 13-25. doi:10.4314/bcse.v32i1.2
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Han, E. H., Kim, J. Y., Kim, H. G., Chun, H. K., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2010). Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Chemico-biological interactions*, 183(3), 397-404. doi:10.1016/j.cbi.2009.11.015
- Hasanah, M., Hilma, H., & Suwasono, P. (2016). Antioxidant activity of extract and fractions from *Coffea arabica* L. leaves by DPPH radical scavenging method. *Scientific Journal of PPI-UKM*, 3(4), 162-165.
- Hashemi, S. M. B., Mousavi Khaneghah, A., Fidelis, M., & Granato, D. (2018). Effects of pulsed thermosonication treatment on fungal growth and bioactive compounds of *Berberis vulgaris* juice. *International Journal of Food Science & Technology* doi:10.1111/ijfs.13740.
- Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food chemistry*, 129(3), 991-1000. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.059
- Heck, C. I., & de Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72, 138–181. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x
- Henry-Vitrac, C., Ibarra, A., Roller, M., Merillon, J.M., & Vitrac, X. (2010). Contribution of chlorogenic acids to the inhibition of human hepatic glucose-6-phosphatase activity in vitro by svetol, a standardized decaffeinated green coffee extract. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 58, 4141–4144. doi: 10.1021/jf9044827
- Herman, A., & Herman, A. P. (2013). Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin pharmacology and physiology*, 26(1), 8-14. doi:10.1159/000343174
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89–143. doi: 10.1080/104008690390826464
- Huang, M. T, Smart, R. C., Wong, C. Q., & Conney, A. H. (1988). Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research*, 48, 5941-5946.

- Igho, O., Rohini, T., & Edzard, E. (2011). The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterology Research Practice*, *31*,1–6. doi: [10.1155/2011/382852](https://doi.org/10.1155/2011/382852).
- Iwasa, K., Setoyama, D., Shimizu, H., Seta, H., Fujimura, Y., Miura, D., ... Nakahara, K. (2015). Identification of 3-methylbutanoyl glycosides in green *Coffea arabica* beans as causative determinants for the quality of coffee flavors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *63*, 3742–3751. doi:10.1021/jf5054047
- Jang, H., Ahn, H.R., Jo, H., Kim, K.A., Lee, E.H., Lee, K.W., Jung, S.H., & Lee, C.Y. (2010). Chlorogenic acid and coffee prevent hypoxia-induced retinal degeneration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *62*, 182–191. doi: 10.1021/jf404285v
- Júnior, A. P. D., Shimizu, M. M., Moura, J. C. M. S., Catharino, R. R., Ramos, R. A., Ribeiro, R. V., & Mazzafera, P. (2012). Looking for the physiological role of anthocyanins in the leaves of *Coffea arabica*. *Photochemistry and Photobiology*, *88*(4), 928-937.
- Kalschne, D. L., Viegas, M. C., De Conti, A. J., Corso, M. P., & de Toledo Benassi, M. (2019). Effect of steam treatment on the profile of bioactive compounds and antioxidant activity of defective roasted coffee (*Coffea canephora*). *LWT*, *99*, 364-370.
- Khare, C.P. (2007). *Indian medicinal plants*. Berlin: Springer.
- Kim, I. H., & Lee, J. H. (2018). Antibacterial and Whitening Activities of *Coffea arabica* Ethanol Extract. *Korean Chemical Engineering Research*, *56*(2), 245-251. doi: 10.9713/kcer.2018.56.2.245
- Kiran, B., Baruah, R., Ojha, R., Lalitha, V., & Raveesha, K. A. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of *Coffea benghalensis* Roxb. Ex. Schult. Fruit against human bacteria. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Science*, *2*, 856-865.
- Knopp, S., Bytof, G., & Selmar, D. (2006). Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *European Food Research and Technology*, *223*(2), 195. doi:10.1007/s00217-005-0172-1
- Kosem, N., Han, Y. H., & Moongkarndi, P. (2007) Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *Science Asia* *33*, 283-292. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.283.
- Kraft, K., & Hobbs, C. (2004). *Pocket guide to herbal medicine*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, *25*(4), 726-732
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noirot, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, *75*, 223–230. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00204-7

- Liang, N., Xue, W., Kennepohl, P., & Kitts, D. D. (2016). Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food chemistry*, *213*, 251-259. doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.041
- Lima, C. S., Spindola, D. G., Bechara, A., Garcia, D. M., Palmeira-dos-Santos, C., Peixoto-da-Silva, J., ... & Paredes-Gamero, E. (2017). Cafestol, a diterpene molecule found in coffee, induces leukemia cell death. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *92*, 1045-1054. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.109
- Liu, A. G., Smith, S. R., Fujioka, K., & Greenway, F. L. (2013). The effect of leptin, caffeine/ephedrine, and their combination upon visceral fat mass and weight loss. *Obesity*, *21*(10), 1991-1996. doi: 10.1002/oby.20416
- Lopez-Garcia, E., van Dam, R. M., Rajpathak, S., Willett, W. C., Manson, J. E., & Hu, F. B. (2006). Changes in caffeine intake and long-term weight change in men and women. *American Journal Clinical Nutrition*, *83*, 674-680
- Mao, Z. X. Fu, H., Nan, Z. B., & Wan, C. G. (2015). Fatty acid, amino acids, and mineral composition of four common vetch seeds on Qinghai-Tibetan plateau. *Food Chemistry*, *171*, 13–18. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.090
- Mehari, B., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Atlabachew, M., Combrinck, S., & McCrindle, R. (2016). Simultaneous determination of alkaloids in green coffee beans from Ethiopia: chemometric evaluation of geographical origin. *Food Analytical Methods*, *9*(6), 1627-1637. doi:10.1007/s12161-015-0340-2
- Mehari, B., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Combrinck, S., Atlabachew, M., & McCrindle, R. (2016). Profiling of phenolic compounds using UPLC–MS for determining the geographical origin of green coffee beans from Ethiopia. *Journal of Food Composition and Analysis*, *45*, 16-25. doi: 10.1016/j.jfca.2015.09.006
- Meng, X., Li, Y., Li, S., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2018). Natural Products for Prevention and Treatment of Chemical-Induced Liver Injuries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(2), 472-495.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, MAGA. (2013). El impacto de la roya del café en el país. Guatemala. 24 p.
- Mondolot, L., Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., Kochiko, A., & Campa, C. (2006). Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany*, *98*(1), 33-40. doi: 10.1093/aob/mcl080
- Monente, C., Ludwig, I. A., Irigoyen, A., de Peña, M. P., & Cid, C. (2015). Assessment of total (free and bound) phenolic compounds in spent coffee extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *63*, 4327–4334. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01619
- Monteiro, M. C., & Farah, A. (2012). Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. *Food Chemistry*, *134*, 611-614. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.118
- Montilla, J., Arcila, J., Aristizábal, M., Montoya, E. C., Puerta, G. I., Oliveros, C. E., & Cadena, G. (2008). Caracterización de algunas propiedades físicas y factores de conversión del café durante el proceso de beneficio húmedo tradicional. Moreira, M. D.,

- Melo, M. M., Coimbra, J. M., dos Reis, K. C., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2018). Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. *Waste Management*, 82, 93-99. doi:10.1016/j.wasman.2018.10.017
- Mullen, W., Nemzer, B., Stalmach, A., Ali, S., & Combet, E. (2013). Polyphenolic and hydroxycinnamate contents of whole coffee fruits from Chinese, India, and Mexico. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 61, 5298–5309. doi: 10.1021/jf4003126
- Murkovic, M., & Derler, K. (2006). Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69, 25–32. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.02.001
- Muschler, R. G. (2001). Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. *Agroforestry systems*, 51(2), 131-139.
- Neuwinger H D. (2000). *African traditional medicine*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- Nkondjock, A. (2009). Coffee consumption and the risk of cancer. An overview. *Cancer Letters*, 277, 121-125. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.022
- Ogawa, M., Kamiya, C., & Iida, Y. (1989). Contents of tocopherols in coffee beans, coffee infusions and instant coffee. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36, 490–494. doi:10.3136/nskkk1962.36.6\_490.
- Ohiokpehai, O., Brumen, G., & Clifford, M. N. (1982). The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. In *Proceedings of 10th ASIC Colloquium, Salvador. ASIC: Paris*.
- Oliveira, L. S., Franca, A. S., Mendonça, J. C., & Barros-Junior, M. C. (2006). Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 235-239. doi:10.1016/j.lwt.2005.01.011
- Organización Panamericana de la Salud (OPS), Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) (2012). Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. Segunda edición, tercera reimpresión. *Guatemala, febrero*.
- Patay, É. B., Alberti, Á., Csernák, O., Stranczinger, S., & Papp, N. (2018). Comparative phytochemical analysis of *Coffea benghalensis* Roxb Ex Schult, *Coffea arabica* L. and *Coffea liberica* Hiern. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(8), 480.
- Patay, E. B., Nemeth, T., Nemeth, T. S., Filep, R., Vlase, L., & Papp, N. (2016). Histological and Phytochemical Studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne Ex Schult., compared with *Coffea arabica* L. *Farmacia*, 64(1), 125-130.
- Patay, E., Bencsik, T., & Papp, N. (2016). Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(12), 1127-1135. doi:10.1016/j.apjtm.2016.11.008
- Pérez-Hernández, L. M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. Á., & Gámez Meza, N. (2012). Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), 430-435.

- Prior, R. L., & Cao, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of AOAC International*, 83(4), 950-956.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Ramalakshmi, K., Kubra, I. R., & Rao, L. J. M. (2008). Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 41(1), 96-103.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Riedel, A., Hochkogler, C. M., Lang, R., Bytof, G., Lantz, I., Hofmann, T., & Somoza, V. (2014). N-Methylpyridinium, a degradation product of trigonelline upon coffee roasting, stimulates respiratory activity and promotes glucose utilization in HepG2 cells. *Food & Functional*, 5, 454-462. doi: 10.1039/c3fo60320b
- Rodrigues, N. P., Salva, T. J. G., & Bragagnolo, N. (2015). Influence of coffee genotype on bioactive compounds and the in vitro capacity to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 63, 4815-4826. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00530
- Rodríguez Larramendi, L. A., Guevara Hernández, F., Gómez Castro, H., Fonseca Flores, M., Gómez Castañeda, J. C., & Pinto Ruiz, R. (2016). Anatomía foliar relacionada con la ruta fotosintética en árboles de café (*Coffea arabica* L., var. Caturra Rojo) expuestos a diferentes niveles de radiación solar en la Sierra Maestra, Granma, Cuba. *Acta Agronómica*, 65(3), 248-254.
- Rodríguez-Gómez, R., Vanheuverzwijn, J., Souard, F., Delporte, C., Stevigny, C., Stoffelen, P., ... & Kauffmann, J. M. (2018). Determination of Three Main Chlorogenic Acids in Water Extracts of Coffee Leaves by Liquid Chromatography Coupled to an Electrochemical Detector. *Antioxidants*, 7(10), 143. doi.org/10.3390/antiox7100143
- Rohwer, J.G. (2002). *A trópusok növényei*. Budapest: Magyar Könyvklub.
- Romano, R., Santini, A., Grottaglie, L. L., Manzo, N., Visconti, A., & Ritieni, A. (2014). Identification markers based on fatty acid composition to differentiate between roasted Arabica and Canephora (Robusta) coffee varieties in mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35, 1-9. doi: 10.1016/j.jfca.2014.04.001
- Ross, I.A. (2005). *Medicinal plants of the world*, vol. 3. Totowa: Humana Press Inc.
- Salazar, J. C. S., Burgos, E. R., & Bautista, E. H. D. (2015). Efecto de las condiciones de cultivo, las características químicas del suelo y el manejo de grano en los atributos sensoriales de café (*Coffea arabica* L.) en taza. *Acta agronómica*, 64(4), 342-348.
- Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J. L., García-Diz, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2018). Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 269-278.

- Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, *94*, 442–447. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.033
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1), 215S–217S.
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, *14*, 111-125. doi:10.1016/j.jff.2015.01.043
- Schmid, K., Ivemeyer, S., Vogl, C., Klarer, F., Meier, B., Hamburger, M., & Walkenhorst, M. (2012). Traditional use of herbal remedies in livestock by farmers in 3 Swiss Cantons (Aargau, Zurich, Schaffhausen). *Forschende Komplementärmedizin*, *19*, 125-136. doi: 10.1159/000339336
- Segheto, L., Santos, B. C. S., Werneck, A. F. L., Vilela, F. M. P., de Sousa, O. V., & Rodarte, M. P. (2018). Antioxidant extracts of coffee leaves and its active ingredient 5-caffeoylquinic acid reduce chemically-induced inflammation in mice. *Industrial Crops and Products*, *126*, 48-57. doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.027
- Sharifian, H., Mollabashi, Z., Jaffary, F., & Nilforoushzadeh, M.A (2016). Review of the mechanisms of caffeine effect on skin and hair health. *Journal of Isfahan Medical School*. *34*(376), 299-305
- Shetty, M., Subbannayya, K., & Shivananda, P. G. (1994). Antibacterial activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) with special reference to *Salmonella typhimurium*. *Journal of Communicable Diseases*, *26*(3), 147-150.
- Shimoda, H., Seki, E., & Aitani, M. (2006) Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complement Alternative Medicine* *17*, 6–9. doi: 10.1186/1472-6882-6-9
- Smarke, S., Kroslakova, I., Gloess, A.N., & Yeretizian, C. (2015). Differentiation of degrees of ripeness of *Catuai* and *Tipica* green coffee by chromatographical and statistical techniques. *Food Chemistry*, *174*, 637–642. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.060
- Solís, L., & Herrera, C. (2005). Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café. *Agronomía Costarricense*, *29*(2), 99-107.
- Solís, P. N., Guerrero de Solís, N., Gattuso, S., & Cáceres, A. (2005). *Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos*. Guatemala: Proyecto OEA/AICD/USAC.
- Speer, K., & Kölling-Speer, I. The lipid fraction of the coffee bean. (2006). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*, 201–216. doi.org/10.1590/S1677-04202006000100014
- Stadler, R. H., Varga, N., Milo, C., Schilter, B., Arce Vera, F., & Welti, D. H. (2002). Alkylpyridiniums. 2. Isolation and quantification in roasted and ground coffees. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*, 1200–1206. doi: 10.1021/jf011235c
- Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I., & Saito, I. (2002) Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertensive Research*, *25*, 99–107. doi.org/10.1291/hypres.25.99

- Tabuti, J. R. S., Lye, K. A., & Dhillon, S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 19-44. doi:10.1016/S0378-8741(03)00161-2
- Teboukeu, G. B., Djikeng, F. T., Klang, M. J., Karuna, M. S. L., & Womeni, H. M. (2018). Optimization of the extraction of natural antioxidants from *Coffea robusta* leaves and evaluation of their ability to preserve palm olein from oxidation during accelerated storage. *Food Science & Nutrition*, 6(6), 1751-1761. doi.org/10.1002/fsn3.702
- Tesfaye, K., Govers, K., Bekele, E., & Borsch, B. (2013). ISSR fingerprinting of *Coffea arabica* throughout Ethiopia reveals high variability in wild populations and distinguishes them from landraces. *Plant Systematic Evolution*, 300(5), 881-897. doi: 10.5897/AJB2016. 15601
- Tian, X., & Schaich, K. M. (2013). Effects of molecular structure on kinetics and dynamics of the trolox equivalent antioxidant capacity assay with ABTS+•. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5511-5519.
- Toci, A. T., & Farah, A. (2014). Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: Corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. *Food Chemistry*, 153, 298–314. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.040
- Toci, A. T., Neto, V. J. M. F., Torres, A. G., & Farah, A. (2013). Changes in triacylglycerols and free fatty acids composition during storage of roasted coffee. *LWT-Food Science Technology*, 50, 581–590. doi: 10.1016/j.lwt.2012.08.007
- Trevisan, M. T., de Almeida, R. F., Soto, G., Virginio Filho, E. D. M., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2016). Quantitation by HPLC-UV of mangiferin and isomangiferin in coffee (*Coffea arabica*) leaves from Brazil and Costa Rica after solvent extraction and infusion. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2649-2655.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst*, 109(3), 263-266. doi:10.1039/AN9840900263
- Uribe, H. (1977). Constantes físicas y factores de conversión en café. *Avances Técnicos Cenicafé (Colombia)(no. 65) 4 p.*
- Variyar, P. S., Ahmad, R., Bhat, R., Niyas, Z., & Sharma, A. (2003). Flavoring components of raw monsooned arabica coffee and their changes during radiation processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(27), 7945-7950. doi: 10.1021/jf030408q
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111 (4), 816-823.
- Velásquez, R (2017). Variedades de café. *Revista El Cafetal*, 3, 14-15.
- Wagner, R. (2001). *Historia del café de Guatemala*. Villegas Asociados.
- Wang, J., Li, J., Liu, J., Xu, M., Tong, X., & Wang, J. (2016). Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced DNA damage in vascular smooth muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4063-4068. doi:10.3892/mmr.2016.5743

- Westerterp-Plantenga, M. S., Lejeune, M. P., & Kovacs, E. M. (2005). Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. *Obesity Research*, *13*(7), 1195-1204. doi: 10.1021/jf303771s
- Williamson, E., Driver, S., & Baxter, K. (2009). *Stockley's herbal medicines interactions*. London: Pharmaceutical Press; p. 145-147, 186–187.
- Xu, J. G.; Hu, Q. P.; & Liu, Y. (2012). Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *Journal Agriculture Food Chemistry*, *60*, 11625–11630. doi: 10.1021/jf303771s
- Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(6), 1060-1066. doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.010
- Yao, L. H., Chen, Y., Cheng, C., & Liu, Y. (1993). The kinetics of black tea infusion. *Journal of Food Fermentation and Industries*, *19*, 38–44.
- Yao, L. H., Cheng, C., Chen, Y., & Liu, Y. (1992). The kinetics of green tea infusion. *Journal of Food Science*, *13*, 3–6. doi: 10.1002/jsfa.2740321115
- Yisak, H., Redi-Abshiro, M., & Chandravanshi, B. S. (2018). Selective determination of caffeine and trigonelline in aqueous extract of green coffee beans by FT-MIR-ATR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, *97*, 33-38. doi:10.1016/j.vibspec.2018.05.003
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, *114*(1), 310-316.

## Lista de los integrantes del equipo de investigación

### Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Sully Margot Cruz	
Armando Cáceres	

### Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago	Firma
María Nereida Marroquín Tínti	Titular II	20110171	Si	
Silvia Alajandra Pinales Tobar	Auxiliar de investigación I	20180665	Si	
Mónica Michelle Ramos Medina	Auxiliar de investigación I	20180709	Si	

Guatemala 09 de enero de 2019.

---

Sully Margot Cruz Velásquez  
Coordinadora de Proyecto

---

Ing. Agr. Rufino Salazar  
Coordinador de Programa  
de Investigación

---

Ing. Agr. Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas