

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



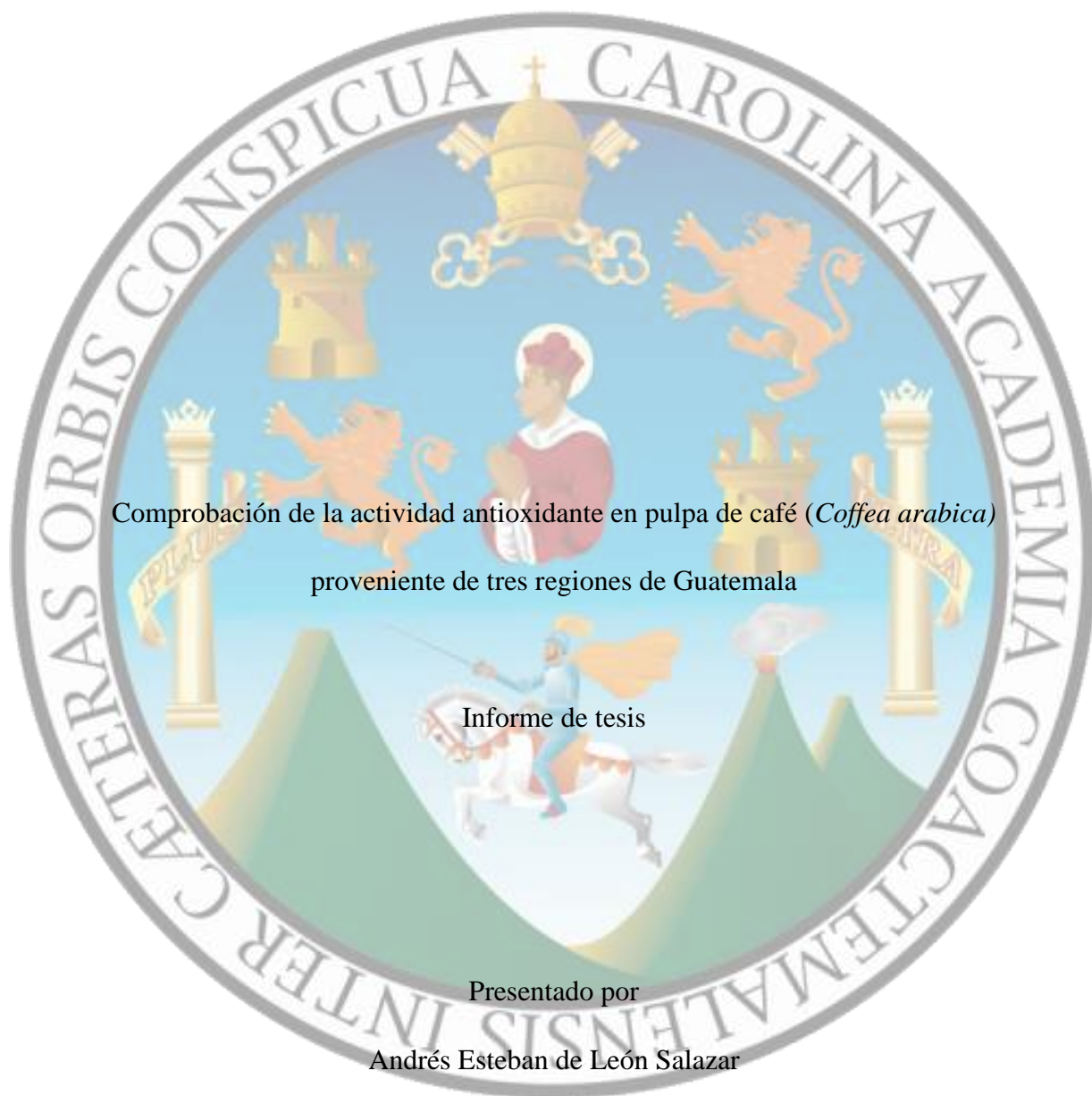
Comprobación de la actividad antioxidante en pulpa de café (*Coffea arabica*)
proveniente de tres regiones de Guatemala

Andrés Esteban de León Salazar

Químico Farmacéutico

Guatemala, noviembre de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Comprobación de la actividad antioxidante en pulpa de café (*Coffea arabica*)
proveniente de tres regiones de Guatemala

Informe de tesis

Presentado por
Andrés Esteban de León Salazar

Para optar al título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, noviembre de 2019

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enríquez Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovanni Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merarí Caceros Castañeda	Vocal V

AGRADECIMIENTO

A la **Universidad de San Carlos de Guatemala**, mi casa de estudio, por haberme brindado la mejor educación superior a nivel nacional, y también por haberme dado la oportunidad de tener mi primer trabajo remunerado, que me sirvió para formarme en mi ámbito profesional.

A la **Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**, por ser una de las mejores facultades de toda la Universidad, y brindarme una excelente educación para mi vida profesional, además de ser el lugar donde conocí amistades que serán para toda la vida.

A mis **Catedráticos**, por dar una educación integral, con mucha paciencia y entrega.

A mi **Asesora, Dra. Sully Cruz**, por guiarme en la realización de esta investigación, sin usted no hubiera tenido la iniciativa de realizar esta tesis, muchas gracias.

A mi **Revisora, Licda. Lucía Arriaga**, por tomarse el tiempo de revisar a fondo esta investigación para poderla culminar, y por su apoyo para poder finalizar esta tesis.

A la **Licda. Nereida Marroquín**, por todo su asesoramiento para ir por el buen camino para poder realizar esta investigación.

A **LIPRONAT**, por toda su ayuda humana e institucional para poder realizar esta investigación.

DEDICATORIA

A mis padres, **Paulino de León y Mirna Salazar**, les dedico este gran triunfo en mi vida, que es gracias a ustedes, se merecen esta satisfacción. Gracias por haberme dado la oportunidad de continuar con mis estudios a nivel superior, la que yo quisiera, gracias siempre por sus consejos, su amor, cariño y paciencia que han tenido conmigo a la largo de toda mi vida, sin ustedes no sería quien soy actualmente, muchas gracias, los amo mucho.

A mi hermano, **Gerardo de León**, gracias por siempre poner el listón en alto, sé que quiero seguir tus pasos y ser un profesional con esa excelencia e inteligencia que te caracterizan, gracias por siempre acompañarme en todo a lo largo de mi vida, por tus consejos, apoyo y cariño. Por ser ese hermano mayor que siempre me ha protegido, me ha aconsejado y guiado para ser un hombre de bien, muchas gracias.

A mis abuelitos, **Francisco Salazar y Elvira Moscoso**, que en paz descansen, gracias por todo el cariño que me dieron a lo largo de mi niñez, siempre los recuerdo con mucho cariño. Se que están celebrando este triunfo conmigo desde el cielo.

A mi abuelita, **Doña Reina**, gracias por todas las veces que me ha demostrado cariño, siempre la llevo en el corazón, espero que siga en mi vida mucho más tiempo.

A mi **Familia**, gracias por todo el cariño que siempre se ha compartido en familia, siempre me recuerdo todos ustedes con mucha alegría y cariño.

A mis **Amigos**, gracias por acompañarme a lo largo de toda esta formación profesional, sé que son amigos para toda la vida.

A **Carolina Monzón**, gracias por acompañarme en esta última etapa de formación profesional, espero que se sigan celebrando triunfos en el futuro.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. OBJETIVOS	12
6. HIPÓTESIS	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
8. RESULTADOS	29
9. DISCUSIÓN	39
10. CONCLUSIONES	44
11. RECOMENDACIONES	45
12. REFERENCIAS	46
13. ANEXOS	50

1. RESUMEN

Actualmente en la producción de café se generan bastantes desechos que pueden ocasionar contaminación en agua, aire y suelo. Se estima que solo el 5% de biomasa generada se utiliza en la elaboración de la bebida. El porcentaje restante son residuos o subproductos, dentro de los cuales está la pulpa. Por lo que se investigó su actividad antioxidante para poder darle alguna aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética.

Ya existen estudios sobre esta actividad en otros países, sin embargo, en Guatemala no hay, por lo que se realizó esta investigación, teniendo como objetivo principal comprobar la actividad antioxidante en extractos de pulpa de café (*Coffea arabica*) proveniente de los departamentos de Guatemala: Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango.

Se recolectaron las muestras de estos lugares y luego se secaron en un horno de convección de aire forzado a 40 °C hasta que cumplió con un porcentaje de humedad menor al 10.0%. Luego del secado se realizó la molienda de la droga vegetal. Posteriormente se determinó cuál fue su mejor solvente, en base al etanol en concentraciones de 30, 50, 70 y 90%. Ya conociendo la concentración de etanol, se extrajo la mayor cantidad de sólidos totales, después se procedió a realizar la extracción por percolación. Una vez obtenido el extracto, este se concentró en un rotavapor y por último se dejó el extracto en una desecadora. Una vez obtenido el extracto bajo condiciones adecuadas se evaluó la actividad antioxidante del extracto etanólico de la pulpa de café mediante cinco metodologías estandarizadas, las cuales fueron una cualitativa, por medio de una cromatografía de capa fina y cuatro cuantitativas, las cuales fueron actividad antioxidante por técnica micrométrica empleando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), técnica micrométrica de cuantificación de fenoles totales y el método macrométrico de la reducción de hierro (FRAP).

Los solventes etanólicos que obtuvieron los mejores porcentajes de sólidos totales fueron el etanol al 70% para las pulpas de Santa Rosa y Quetzaltenango y el etanol al 30% para la pulpa de Zacapa. Y el extracto que obtuvo un mejor porcentaje de rendimiento fue el

de Santa Rosa con un 14.86%, seguido del de Zacapa con un 9.50% y por último el de Quetzaltenango con un 2.84%.

En la cromatografía por capa fina los extractos que obtuvieron actividad moderada fueron los de Santa Rosa y Quetzaltenango, mientras que la de Zacapa obtuvo baja actividad.

En la evaluación de actividad antioxidante el extracto etanólico que obtuvo mejores resultados en las pruebas cuantitativas fue la pulpa de café de Santa Rosa, seguida por la de Zacapa y Quetzaltenango.

El extracto de pulpa de café de Santa Rosa obtuvo en las pruebas de DPPH y ABTS una CI_{50} de 2.11 y 3.70 mg/ml respectivamente. En la prueba de fenoles totales obtuvo 34.12 μg ácido gálico/g de extracto. Y por último en la prueba de FRAP obtuvo 3.55 g Fe^{2+} /g de extracto.

Concluyendo así que los extractos etanólicos de pulpa de café de las tres regiones de Guatemala presentaron actividad antioxidante. Obteniendo mejor actividad antioxidante el extracto de pulpa de café de Santa Rosa. Aduciendo así que esta actividad antioxidante se puede correlacionar a la presencia de compuestos fenólicos, como los ácidos clorogénicos y los ácidos hidroxicinámicos presentes en la pulpa de café. Y que estos extractos pueden tener futuras aplicaciones en la industria gracias a esta actividad.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país agrícola, siendo el café uno de sus principales cultivos, el cual posee un gran prestigio a nivel internacional y alcanzó una producción de 3.32 millones de sacos de 60 kilos en la cosecha 2016/2017 (Menchu, 2017).

La pulpa del café es un subproducto agrícola abundante que representa el 40% de todo el grano que se despulpa (López et al, 2013). A nivel internacional se han realizado varios estudios que han demostrado su actividad antioxidante, sin embargo, en Guatemala no se han realizado estudios sobre la misma, que pueden ser de suma importancia, ya que esta actividad previene los efectos adversos de especies reactivas del oxígeno (ROS). Dentro de las principales ROS se pueden mencionar al radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido y peróxido. Estas pueden provocar efectos nocivos sobre las funciones normales de los humanos, al hacerle daño a las macromoléculas. En los lípidos, pueden producir una peroxidación lipídica, afectando la permeabilidad de la membrana, causando edema y muerte celular. En las proteínas causan oxidación de ciertos aminoácidos, además de formar entrecruzamientos de cadenas peptídicas. Y por último en el ácido desoxirribonucleico (ADN), puede causar fenómenos de mutaciones y carcinogénesis (Venereo, 2002).

En adición, la actividad antioxidante de la pulpa de café se podría utilizar en futuras investigaciones para la industria alimentaria, al agregarlo a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa (Coronado, Leon, Gutiérrez, Vásquez y Padilla, 2015).

La importancia de esta investigación es que en Guatemala no existen investigaciones sobre la actividad antioxidante de la pulpa de café, como lo hay en otros países. Por lo que es de vital importancia caracterizar y validar mediante estudios farmacológicos la actividad reportada de dicho cultivo, en nuestro país.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Coffea*

El café pertenece a la familia de las rubiáceas (Rubiaceae), grupo que engloba unos 500 géneros y más de 6.000 especies, la mayoría árboles y arbustos tropicales. Dentro del género *Coffea* hay más de 100 especies, todas ellas autóctonas de África tropical y de algunas islas de Océano Índico, como Madagascar (Rojo, 2014).

La planta de café es una dicotiledónea, proviene de un arbusto perenne que pertenece a la familia de las *Rubiaceae*, puede alcanzar 10 m de altura en forma silvestre y en una plantación de café controlada alcanza 3 m de altura lo cual facilita el cosechado. La mayor parte son árboles y arbustos que crecen en el estrato más bajo de los bosques tropicales. Las ramas primarias se oponen, en sentido horizontal o caídos, y las hojas crecen en pares en tallos cortos. Son de alrededor de 15 cm de longitud, de color verde oscuro y brillante en apariencia. Las primeras flores son producidas entre los 3 y 4 años de edad, estas son de color blanco cremoso y de aroma dulce, aparecen en racimos en las axilas de las hojas, la corola mide cerca de 20 mm de longitud, que en la parte más alta se divide en cinco pétalos. Después de que las flores se marchitan, los ovarios poco a poco se convierten en drupas ovaladas de hasta 18 mm de longitud y 10-15 mm de diámetro, estos se convierten en lo que será más adelante el grano de café. Una flor forma un gramo de café, que es la razón por lo que la planta florea en diferentes etapas durante el año (Temis-Pérez, 2011).

Dos especies son de importancia económica en el mundo: *Coffea arabica* Linneo y *C. canephora* Pierre ex Froehner, las cuales se conocen en el mercado como cafés arábigos y robustas, respectivamente. En general, el café de la especie *C. arabica* presenta aroma y acidez pronunciadas, mientras que el café Robusta se caracteriza por tener mayor cuerpo. El 80 % de la producción mundial corresponde a la especie arábica que se cultiva principalmente en los países centroamericanos, Colombia, Brasil, en algunos países asiáticos como la India y del África como en Kenia y Etiopía (Puerta, 1998).

3.2 *Coffea*

La especie por utilizar en esta investigación es *Coffea arabica*.

3.2.1 Descripción botánica

Se trata de un arbusto grande, de unos 5 metros de altura, con hojas ovaladas y de color verde oscuro brillante. La floración se produce después del periodo de lluvias, y sus flores son blancas, de aroma dulce y están dispuestas en racimo. Los frutos, verdes y ovalados, se vuelven rojos cuando maduran, al cabo de 7-9 meses. Cada fruto contiene habitualmente dos semillas de aspecto chato y aplanado (los granos de café) (Rojo, 2014).

3.2.2 Hábitat y distribución

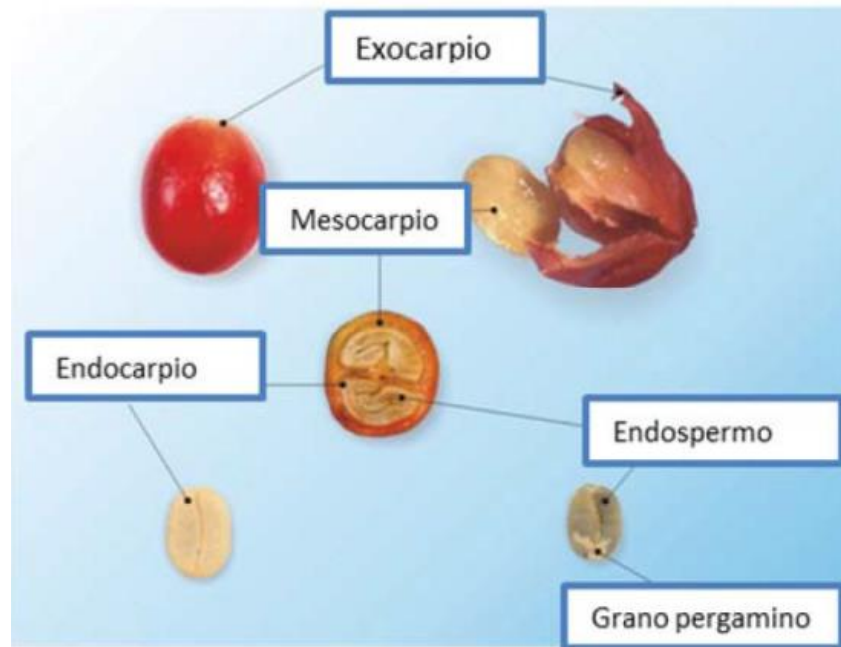
La especie *C. arabica* tiene su origen en las montañas de Etiopía. Históricamente se han distinguido dos variedades de café arábica: *C. arabica* var. *Arabica* o var. *Típica*, la cual se cultivó en los jardines botánicos holandeses. Fue introducida por los franceses al Caribe y desde allí se difundió a los países de Centro y Suramérica, y *C. arabica* var. *Bourbon* cultivada por los franceses en las islas Bourbon o Reunión (Puerta, 1998).

Se cultiva principalmente en los países centroamericanos, Colombia, Brasil, en algunos países asiáticos como la India y del África como en Kenia y Etiopía (Puerta, 1998).

3.2.3 Droga vegetal por utilizar

Pulpa o exocarpio, es la carne o tejido de la fruta que se encuentra por debajo de la cáscara (Temis-Pérez, 2011).

Figura No.1 Partes que conforman el grano de café



Fuente: Temis-Pérez, 2011

3.2.4 Aplicaciones de la droga vegetal

El uso de residuos y subproductos del café es de gran interés porque es una fuente potencial de recursos renovables y materias primas para industrias alimentarias, químicas, farmacéuticas de amplia y variada escala, otras literaturas muestran una perspectiva del uso de residuos como fuente de antioxidantes naturales (Días, 2011).

3.2.5 Principios activos

Contiene pectinas o protopectinas. También posee una serie de azúcares eslabonados y sustancias químicas polifenólicas, antocianinas, proantocianinas, y cianuros, bioflavonoides y taninos, además, por supuesto, de cafeína y ácidos clorogénicos (Rathinavelu y Graziosi, 2005).

3.3 Radicales libres

3.3.1 Definición

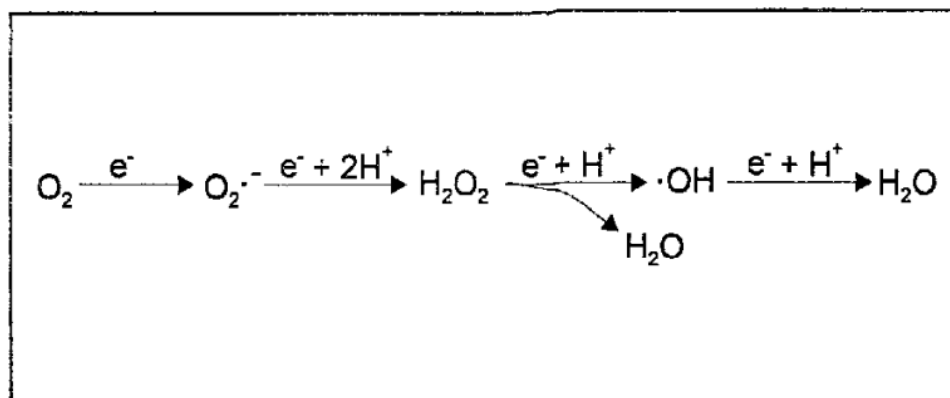
Un radical libre es por definición toda especie química capaz de una existencia independiente, que contenga en su capa electrónica más externa uno o más electrones no apareados, es decir se encuentran solos en un orbital. Se representa en la fórmula por un punto (\cdot) (Korc, 1995).

Los electrones ocupan regiones en los átomos o moléculas conocidas como orbitales. Cada orbital puede contener un máximo de dos electrones, cada uno de ellos con un spin (giro) en un sentido opuesto al otro. A los dos electrones de un orbital se les denomina electrones apareados. Un enlace químico (covalente) consiste en un par de electrones de spin opuesto que comparten el mismo orbital molecular (electrones apareados), contribuyendo con un electrón cada uno de los átomos que forman el enlace. Cuando en el curso de una reacción química se rompe una unión de este tipo, el apareamiento de electrones puede conservarse, lo que en el caso del agua genera dos fragmentos, el ion hidroxilo (OH^-) que se lleva los dos electrones del enlace, y el ion hidrogeno (H^+) que no tiene ninguno. Cuando esto ocurre se trata de una fisión heterolítica. Pero también puede tener lugar una fisión homolítica. En el caso del agua se obtienen dos fragmentos, cada uno con electrones no apareados: un radical libre hidrógeno ($\text{H}\cdot$) y un radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Korc, 1995).

3.3.2 Radicales libres del oxígeno

Los radicales libres del oxígeno se forman continuamente en el organismo por el metabolismo normal, siendo eliminados por las defensas antioxidantes. Cuando son producidos en exceso pueden ocasionar una lesión tisular (Korc, 1995).

Figura No 2. Esquema de la reducción univalente del oxígeno



* $\text{O}_2^{\cdot-}$ radical superóxido. H_2O_2 peróxido de hidrógeno. $\cdot\text{OH}$ radical hidroxilo.

e^- electrón

Fuente: Korc, 1995

El superóxido se genera en la mayoría de las células aeróbicas por transferencia de un electrón al oxígeno molecular como producto colateral del transporte electrónico. La segunda etapa de la reducción univalente del oxígeno es la formación de peróxido de hidrógeno, que puede originarse a partir del superóxido en la reacción de dismutasa catalizada por la superóxido dismutasa. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, sin embargo, es un oxidante, tóxico para las células, cuya incubación con este compuesto puede lesionar el ADN, ocasionar la ruptura de membranas, o liberar iones calcio activando las enzimas proteolíticas dependientes de este ion. El radical hidroxilo tiene una vida muy corta, lo que le permite actuar únicamente en el lugar de su formación. El daño biológico mayor estudiado para este radical es la estimulación de una reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica o lipoperoxidación (Korc, 1995).

3.3.3 Toxicidad

Hoy se sabe que los radicales libres derivados del oxígeno, están implicados en la patogenia de muchas enfermedades, siendo capaces de dañar, en forma reversible o irreversible, diversas biomoléculas muy importantes para ciertas actividades celulares fundamentales para la vida (Korc, 1995).

Los radicales libres, por no contener electrones no apareados son inestables y más reactivos que los no radicales. Si se encuentran dos radicales libres, pueden combinar sus electrones no apareados y formar un enlace covalente. Un radical libre también puede donar su electrón no apareado a un compuesto no radical, o apropiarse de un electrón de otra molecular para formar su par electrónico. En estos casos el radical deja de serlo y la otra molecular se transforma en un radical. Así se puede iniciar y perpetuar una cadena de reacciones como ocurre por ejemplo en la peroxidación de ácidos grasos insaturados (Korc, 1995).

Los efectos deletéreos del oxígeno a través de la formación de radicales libres se pueden observar en diversas patologías tales como los procesos inflamatorios, lesiones por isquemia-reperusión, carcinogénesis, envejecimiento, etc. (Korc, 1995).

3.4 Estudios previos de actividad antioxidante en pulpa de café

Estudios como tal, de la actividad antioxidante de la pulpa del café, resalta una investigación de una universidad ecuatoriana:

Alejandra Días en su tesis de grado “Pulpa de café: *Coffea arabica* L: Como fuente alterna de antioxidantes” (2011). En la cual se trabajó con pulpa fresca y se evaluó su actividad antioxidante mediante cuatro metodologías: FRAP, DPPH, ABT y fenoles totales; con las cuales se llegó a la conclusión de que la pulpa fresca de café tiene una capacidad antioxidante considerable en comparación con frutas reconocidas como fuentes de antioxidantes (Días, 2011).

El resto de los estudios de evaluación de actividad antioxidante del café, se centran en otras drogas vegetales del café, diferentes a la pulpa, dentro de las cuales se pueden mencionar:

Fabián Herrera en su proyecto de grado “Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (*Coffea arabica* L.) empleando fluidos presurizados, una alternativa

de aprovechamiento para este residuo agroindustrial” (2016). En la cual se plantea un grave problema de la actividad cafetera, en la que casi el 80% del fruto del café no tiene algún valor económico, en especial el epicarpio, lo que genera un mal manejo de los residuos. Se llegó a la conclusión de que puede existir un aprovechamiento del epicarpio del café teniendo en cuenta su actividad antioxidante (Herrera, 2016).

Según Libia Fonseca-García “Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia)” (2013). Se evaluaron las actividades antioxidantes del café en muestras comerciales y sin tostar. Se concluyó que todas las muestras presentaron capacidad antioxidante y fenoles totales, incluidos los residuos del procesamiento del café tales como el pergamino, la cáscara y la pulpa de la cereza. Por lo tanto, se confirmó el potencial de los residuos de café como fuentes naturales de antioxidantes (Fonseca-García, 2013)

4 JUSTIFICACIÓN

El café es uno de los principales productos agrícolas; después del petróleo, es el producto comercial natural que mueve las mayores cifras de dinero en el mercado mundial, llegando a generar ingresos anuales superiores a los 15 mil millones de dólares para los países exportadores y dando ocupación directa e indirecta a poco más de 20 millones de personas (Temis-Pérez, 2011).

En los países productores de café, los residuos y subproductos del café constituyen una fuente de grave contaminación y problemas ambientales. Por ese motivo, desde mediados del siglo pasado se ha tratado de inventar métodos de utilizarlos como materia prima para la producción de piensos, bebidas, vinagre, biogás, cafeína, pectina, enzimas pécticas, proteína, y abono (Rathinavelu y Graziosi, 2005).

Guatemala al ser uno de los principales productores y exportadores de café a nivel mundial, también produce una gran cantidad de subproductos del mismo, dentro de los cuales se encuentra la pulpa. Estos subproductos del café, en la mayoría de las ocasiones son tratados como basura y se desechan.

La pulpa de café al poseer principios activos con capacidad antioxidante, se le puede dar diversas aplicaciones, dentro de las cuales destaca su uso como materia prima para las formulaciones de bebidas y alimentos.

En Guatemala no se han realizado estudios sobre la actividad antioxidante de la pulpa de café, así que es de vital importancia caracterizar mediante una investigación de la actividad de dicha planta proveniente de varias regiones de nuestro país.

5 OBJETIVOS

5.1 General

- Comprobar la actividad antioxidante en extractos de pulpa de café (*Coffea arabica*) proveniente de los departamentos de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango, en Guatemala.

5.2 Específicos

- Evaluar la actividad antioxidante en extractos de pulpa de café por medio de las pruebas inhibitorias de radicales libres mediante DPPH, ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), cuantificación de fenoles totales y el método de la reducción de hierro (FRAP).
- Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los extractos de pulpa empleando los métodos para actividad antioxidante DPPH y ABTS.
- Cuantificar los fenoles totales en los extractos etanólicos de pulpa de *Coffea arabica* proveniente de tres regiones de Guatemala.

6 HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de pulpa de *Coffea arabica* provenientes de Santa Rosa, Quetzaltenango y Zacapa presentaran actividad antioxidante.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo

7.1.1 Población

Planta *Coffea arabica*

7.1.2 Muestra

Extractos etanólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica*) proveniente de tres regiones de Guatemala.

7.2 Equipos y materiales

- Algodón
- Atomizador para cromatografía en capa fina
- Horno
- Beakers
- Desecadora
- Incubadora
- Micropipeta
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200 μL
- Puntas azules de 1000 μL
- Percolador de acero inoxidable
- Evaporador rotatorio BUCHI
- Balanza semianalítica y balanza analítica
- Campana de extracción de gases
- Cámaras cromatográficas
- Gradillas para tubo de ensayo
- Estufa eléctrica
- Asperjador de vidrio
- Lámpara de UV/VIS

- Cromatoplaça de Sílicagel 60F254
- Espectrofotómetro AGILENT 8543
- Papel filtro algodón
- Marcador permanente
- Cinta adhesiva
- Capilares de 5 μ L
- Balón para evaporador rotatorio de 1000 ml
- Campana de extracción de gases
- Balones aforados de 100 ml, 50 ml, 25ml y 5 ml
- Sonicador
- Agitador tipo vórtex
- Refrigeradora
- Guantes
- Tijeras
- Tubos de 10 ml con tapón de hule o rosca

Reactivos

- Etanol
- Terc-butilhidroquinona (TBHQ)
- Rutina
- Quercetina
- Vitamina C
- Vitamina E
- Trolox
- Acetato de etilo
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Agua desmineralizada

- 2,2-defenil-2-pricrilhidrazilo (DPPH)
- Metanol
- Buffer de acetato
- 2,2`-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)
- Persulfato de potasio
- Carbonato de sodio 2%
- Acido gálico anhidro
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Reactivo Folin
- Sulfato ferroso
- Cloruro férrico 1%
- Ferrocianuro de potasio 1%
- Solución FRAP
- Acido tricloroacético

7.3 Metodología

7.3.1 Recolección

El material vegetal, es decir la pulpa de *Coffea arabica* se recolectó en la finca Santa Isabel, Santa Rosa; finca Nueva Alianza, Quetzaltenango y Finca Quetzaljuyú, Usumatlán Zacapa. Se utilizaron 200 g del material vegetal para realizar cada extracción etanólica.

7.3.2 Secado y molienda del material vegetal

El secado del material se realizó en un horno de convección de aire forzado a 40 °C, hasta la obtención de un porcentaje de humedad menor al 10%. Luego se disminuyó el tamaño de partícula con el uso de tijeras y se tamizó para su posterior guardado en bolsas plásticas e identificadas para su utilización (Gudiel, 2009).

7.3.3 Determinación de sólidos totales

Se agregó 1g de material vegetal de *Coffea arabica*, a cuatro frascos identificados, se añadió 20 mL de etanol al 30%, 50%, 70% y 90% respectivamente, se dejó reposar por un día. Se colocaron 4 cápsulas identificadas al horno a 110°C por una hora, se desecaron por 10 minutos y se tararon. Pasadas las 24 horas de extracción se colocó 1g de cada extracto en su cápsula respectivamente identificada, se llevó a sequedad con una estufa y posteriormente se secó en un horno a 110°C por una hora, se desecó y peso. Se calculó el porcentaje de sólidos totales extraídos en etanol al 30%, 50%, 70% y 90% (Gudiel, 2009).

7.3.4 Obtención de extractos

7.3.4.1 Llenado del percolador

Se colocó un algodón en un percolador de acero inoxidable a modo de tapar la boquilla por dentro, luego se introdujo un cono de papel filtro en el cual se colocó el material vegetal seco, se agregó el solvente etanólico a la concentración indicada hasta cubrir toda la droga, se dejó reposar por 24 horas y se recolectó el líquido en un Erlenmeyer (Gudiel, 2009).

7.3.4.2 Concentración en rotavapor

El líquido obtenido del percolador se concentró en el evaporador rotatorio; el material vegetal contenido en el percolador se siguió gastando con más solvente etanólico hasta que se agotó (Gudiel, 2009).

7.3.5 Evaluación de la actividad antioxidante

7.3.5.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Gudiel, 2009):

- Se aplicó 10 μ L de muestra y 5 μ L del estándar antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHQ), quercetina, vitamina C y Trolox en la cromatopla de silicagel 60F254.

- Se colocó la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- Se secó y asperjó con 2,2-defenil-2-ricrilhidrazilo (DPPH) (1mg/ml en metanol).
- Detección: si los extractos presentaron actividad antioxidante se observó la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

7.3.5.2 Actividad antioxidante por técnica micrométrica de DPPH

El objetivo de esta técnica fue la determinación de la actividad antioxidante, en base al porcentaje de inhibición del DPPH, método micrométrico (Córdova, 2009; Gudiel, 2009, Om, 2008).

Procedimiento:

- a) Se preparó una solución madre de extracto, a una concentración de 20 mg/mL.
- b) De esta solución madre se preparó la siguiente serie de diluciones:

Tabla 1. Preparación de diluciones para cuantificación de actividad antioxidante

No.	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Dilución	Concentración (mg/ml)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	----	1.0	20

- c) Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) 150 μM en metanol: Se pesó 1.7 mg de reactivo de DPPH y se disolvió con metanol hasta un volumen de 25 ml en un balón aforado. Se agitó la solución y conservó en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se recomienda preparar únicamente lo necesario el mismo día que se va a emplear la solución.

d) Preparación de los pozos de reacción: Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos fueron nuevos. La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.

Se preparó una serie de pozos que contenían los reactivos que se citan a continuación. Todas las mediciones de volumen se realizaron con pipetas automáticas.

Tabla 2. Preparación de muestras en placa de lectura de DPPH

	Muestra	Metanol	Solución de DPPH (150 μ M)
Blanco control	---	220 μ L	---
Control	---	20 μ L	200 μ L
Blanco ensayo	20 μ L	200 μ L	---
Ensayo	20 μ L	---	200 μ L

e.) Distribución en la placa: En una misma placa se pueden leer cuatro muestras distribuidas adecuadamente. En la fila horizontal se colocan las repeticiones (A-C, F-H) y blanco de cada muestra (Columna D y E); y en la fila vertical se coloca cada dilución de ensayo (1-5, 8-12). En la fila 6A y 6H va el blanco del control; en la fila 7A y 7H va el control. Observar el siguiente esquema de distribución de muestras en una microplaca.

Esquema 1. Distribución de las muestras en la placa de lectura de DPPH

		R1	R2	R3		R3	R2	R1			
		H	G	F	E	D	C	B	A		
D-1	1				BMx	BMx				1	D-1
D-2	2				BMx	BMx				2	D-2
D-3	3				BMx	BMx				3	D-3
D-4	4				BMx	BMx				4	D-4
D-5	5				BMx	BMx				5	D-5
	6	BC							BC	6	
	7	CC							CC	7	
D-1	8				BMx	BMx				8	D-1
D-2	9				BMx	BMx				9	D-2
D-3	10				BMx	BMx				10	D-3
D-4	11				BMx	BMx				11	D-4
D-5	12				BMx	BMx				12	D-5
		H	G	F	E	D	C	B	A		
		R1	R2	R3		R3	R2	R1			

D = Diluciones de muestra, R = Repeticiones, BMx = Blanco de Muestra, BC = Blanco control, CC = Control

Se prepararon los pozos de reacción, según se indica en el inciso “C”; la microplaca se agitó en un vórtex para placas durante 30 segundos y luego se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. La lectura integral realizada fue a longitud de onda de 490 nm.

f) Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ inhibición}$$

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Esperando que uno de los valores de porcentaje de inhibición se encuentre entre el 60-70% y empleando la concentración de cada dilución, se elaboró una gráfica lineal. La ecuación de la recta tuvo un r^2 entre 0.97-0.99, por lo que la corrida fue aceptada.

Si no se cumplía con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un r^2 entre 0.97-0.99, se repetirá el ensayo con otras diluciones, en caso la muestra estuviera muy concentrada, y se controló el pipeteo para mejorar el r^2 .

Ya con una ecuación de regresión lineal, se determinó la concentración inhibitoria media, según la siguiente fórmula:

$$CI_{50} = \frac{50\% - \text{intersepto}}{\text{pendiente}}$$

7.3.5.3 Determinación de la actividad antioxidante por ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Re, 1999; Vasco, 2008):

A. Preparación de solución madre: Se pesaron 0.1g de extracto seco y se agregó 5ml de metanol absoluto luego se introdujo en el sonicador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre se prepararon una serie de diluciones:

Diluciones

No. Tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

De estas diluciones se encontró el porcentaje de inhibición que este entre (60-70%), con un r^2 0.97-0.99

B) Preparación de estándares:

- Trolox 2.5mM, se preparó en etanol, empleando diluciones de 0-15 μ M
- Vitamina C: Se pesaron 0.1g y se diluyo con 5ml de metanol, se prepararon diluciones de 0.03-0.04-0.05-0.06-0.07/5ml
- Quercetina: Se pesaron 10mg y se diluyo con 5ml de etanol, se prepararon diluciones de 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5
- Terc-butylhidroxiquinona (TBHQ): Se pesaron 10mg y se diluyo con 5ml de etanol, se prepararon diluciones de 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5

C) Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS+) 7mM en agua: Para preparar 10ml se pesaron 38.41mg y se diluyo con agua hasta 10ml.

D) Solución de persulfato de potasio 2.45mM en agua: Para preparar 5ml se pesaron 3.31mg y se diluyo con agua hasta 5ml.

E) Formación del catión (ABTS): se produjo por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45mM, una proporción 2:1; y dejando la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se preparo un día antes de realizar la prueba.

F) Preparación de la solución de uso: La solución ABTS+ se diluyó con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734nm y equilibrado a 30°C. Se empleó una dilución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.

G) Preparación de los tubos de reacción: Se utilizaron tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, se emplearon tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfirieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Se recubrieron los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Se preparo una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS ⁺	3 ml	3 ml
Dilución de cada muestra	-----	30 µl

* Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se preparó por quintuplicado. El blanco de la corrida fue etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS+ como la muestra estuvieron en la incubadora a 30 °C mínimo 30 minutos antes de que se mezclaron.

La lectura de la absorbancia se tomó a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se empleo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100$$

= % de inhibición

Luego se graficó la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y). Se determinó la ecuación de la recta y el r^2 el cual se encontró entre 0.97-0.99.

Se expresó la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de ABTS. Para ello se empleó la ecuación de la recta, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$CI_{50} = (50 - \text{intercepto}) / \text{pendiente}$$

7.3.5.4 Cuantificación de fenoles totales (técnica micrométrica) (LIPRONAT, 2013)

Preparación de las soluciones:

Solución de Carbonato de Sodio 2%:

- Se pesó en la balanza analítica 2 g de carbonato de sodio anhidro con una espátula plástica.
- Se disolvió en 60 mL de agua desmineralizada hasta disolver la sal; se empleó el sonicador para facilitar el proceso.
- Ya disuelta la sal se trasvasó cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL y se aforó con agua desmineralizada.

Solución de ácido gálico anhidro ($C_7H_6O_5$):

- Se pesó 0.500 g de ácido gálico anhidro en una balanza analítica.
- Se disolvió en 10 mL de etanol; se aforó con agua desmineralizada en un balón de 100 mL. Se colocó la solución en un frasco color ámbar.
- Se realizó la curva de ácido gálico con las siguientes concentraciones 50, 250, 450, 650, 850, 1050 y 1250 μM en etanol.

Extracto:

- Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió en 5 mL de metanol, de ser necesario se puede emplear 20 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido) para extractos apolares.
- De esta solución madre se preparó una dilución de prueba, la cual se esperó que tuviera una absorbancia que este dentro de la curva de ácido gálico, dicha solución se utilizó en la determinación de actividad antioxidante por DPPH, la cual da porcentaje de inhibición entre el 50-70%

Preparar los pozos de la placa de reacción y de la curva de lectura:

- Se utilizó una microplaca de 96 pozos nueva de fondo plano.
- Se realizó la preparación de las placas bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar los estándares.
- Se preparó una serie de pozos con los siguientes reactivos: utilizando pipetas automáticas:

Reactivo/pozo	Muestra/Std	H₂O	Reactivo de Folin	Na₂CO₃ al 2%
Blanco control	-	25 μ l	50 μ l	200 μ l
Ensayo	25 μ l	-	50 μ l	200 μ l

Distribución en la placa

En una misma placa se pudo leer la curva de ácido gálico y varias muestras. Siguiendo el siguiente esquema de distribución

		Diferentes diluciones de estándar								
		H	G	F	E	D	C	B	A	
Curva Ac. Gálico	Repeticiones	1								1
		2								2
		3								3
		4								4
		5								5
		6								6
Repeticiones de muestra		7	BC						BC	7
		8								8
		9								9
		10								10
		11								11
		12								12

Dilución de cada muestra a ensayar

Una vez se sembró la muestra por quintuplicado y el blanco, se agitó la placa en un vórtex durante 30 segundos, luego se incubó a temperatura ambiente protegiéndola de la luz durante 2 horas y se leyó en un lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 630 nm.

- Cálculo de fenoles totales:

Concentración en base a la curva: Absorbancia – Intersecto/Pendiente

µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto:

$[(\text{Concentración obtenida en base a la curva}/0.025) * (\text{peso alícuota}/\text{volumen reconstitución}) * 1000] * \text{Dilución}$

7.3.5.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método macrométrico de la reducción del hierro (FRAP) (LIPRONAT, 2013)

Preparación de reactivos

Preparación de Buffer de fosfatos pH6:

- Se tararon 27.22g de fosfato monobásico de potasio en un balón de 1000 ml y se aforó con agua desmineralizada.
- Se tomó de la solución anterior 50 ml utilizando pipeta automática y se agregaron a un balón de 200ml, luego se adicionó 5.6ml de hidróxido de sodio 0.2M y se aforó con agua desmineralizada.
- Se comprobó el pH6 del buffer de fosfatos con potenciómetro.

Preparación de Ferrocianuro de potasio al 1%:

- Se taró 1g de ferrocianuro de potasio en un beaker limpio.
- Se disolvió en el beaker anterior el ferrocianuro de potasio con un poco de agua desmineralizada, se agitó con varilla de vidrio hasta disolver.
- Se agregó a un balón de 100ml (Nota: se lavaron las paredes del beaker con agua desmineralizada para evitar posible pérdida y se adicionó al balón dicho lavado) y se aforó con agua desmineralizada.

Preparación de ácido tricloroacético 10%:

- Se tararon 10g de ácido tricloroacético en un beaker limpio.
- Se disolvió en el beaker anterior el ácido tricloroacético con un poco de agua desmineralizada, se agitó con varilla de vidrio hasta disolver.
- Se agregó a un balón de 100ml (NOTA: se lavaron las paredes del beaker con agua desmineralizada para evitar posible pérdida y se adicionó al balón dicho lavado) y se aforó con agua desmineralizada.

Preparación de cloruro férrico al 1%:

- Se taró 1g de cloruro férrico en beaker limpio.
- Se disolvió en el beaker anterior el cloruro férrico con un poco de agua desmineralizada, se agito con varilla de vidrio hasta disolver.

- Se agregó a un balón de 100ml (NOTA: lavar paredes del beaker con agua desmineralizada para evitar posible pérdida y adicionar al balón dicho lavado) y aforar con agua desmineralizada.

Procedimiento:

- Se tomó 1ml de la menor dilución elevada en la curva de DPPH. Para el blanco se utilizó 1ml de agua desmineralizada.
- Se adicionaron 2.5ml de buffer de fosfatos pH6 e inmediatamente se adicionó 2.5ml de ferrocianuro de potasio 1%.
- Se incubó a 50 °C por 20 minutos.
- Se sacó de la incubadora y se agregaron 2.5ml de ácido tricloroacético 10% y se centrifugó por 10 minutos.
- Se trasvasaron 2.5ml de sobrenadante a otro tubo de ensayo y se agregaron 2.5ml de agua desmineralizada.
- Se adicionaron 0.5 ml de cloruro férrico 1% y se esperaron 10 minutos.
- Se leyó en el espectrofotómetro a 700 nm.
- El procedimiento se realizó por quintuplicado.

7.4 Diseño Estadístico

Se realizó un ANOVA entre los tres extractos etanólicos de pulpa de café para cada una de las pruebas cuantitativas (DPPH, ABTS, fenoles totales y FRAP), luego se realizó un análisis de Tukey y finalmente una gráfica de cajas para establecer si se presentó una diferencia significativa entre los tres extractos.

8 RESULTADOS

En la tabla 3 se pueden observar los resultados de determinación de sólidos totales para selección de solvente y también se puede observar el rendimiento de la obtención de extracto etanólico, obteniéndose el mejor rendimiento en la pulpa de café de Santa Rosa.

Tabla 3. Porcentaje de sólidos totales y rendimiento de extractos etanólicos en pulpa de café

Región	Solvente	Sólidos Totales	Rendimiento de extracción
Santa Rosa	Etanol 70%	0.33%	14.86%
Zacapa	Etanol 30%	0.29%	9.50%
Quetzaltenango	Etanol 70%	0.21%	2.84%

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–, laboratorio 106, edificio T10, USAC.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antioxidante, mediante diferentes métodos, como inhibición de radicales libres, determinación de fenoles totales y reducción de hierro. Se puede observar que los extractos etanólicos de pulpa de café presentan actividad antioxidante

Tabla 4. Actividad antioxidante de pulpa de café por diferentes métodos.

Region	CCF DPPH	DPPH CI ₅₀ mg/ml [IC 95%]	ABTS CI ₅₀ mg/ml [IC 95%]	FT µg ácido gálico/g de extracto	FRAP g Fe ⁺² /g de extracto
Santa Rosa	++	2.11 (0.04) [2.07, 2.15]	3.70 (0.18) [3.49, 3.91]	34.12 (0.93)	3.55 (0.16)
Zacapa	+	5.97 (0.15) [5.79, 6.14]	6.71 (0.32) [6.35, 7.08]	20.47 (0.61)	2.12 (0.04)
Quetzaltenango	++	8.18 (0.07) [8.10, 8.26]	7.17 (0.29) [6.84, 7.50]	20.01 (0.55)	1.42 (0.03)
Quercetina	+++	0.0749 (0.0004)	0.1136 (0.0008)	---	10.94 (0.40)
Trolox	+++	0.1145 (0.0008)	0.2726 (0.0006)	---	5.48 (0.10)
TBHQ	+++	0.1147 (0.0007)	0.1992 (0.0008)	---	6.94 (0.16)
Vitamina C	++	0.0876 (0.0105)	0.0201 (0.0002)	---	7.01 (0.42)

Nota. - Ausencia de actividad, + baja actividad, ++ actividad moderada, +++ buena actividad.

CCF = Cromatografía en capa fina. DPPH = 1,1-difenil-2-picrihidrazilo; ABTS = 2,2'-azinobis-(ácido-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico); FT = Fenoles Totales; FRAP = Reducción de hierro, CI₅₀ = Concentración inhibitoria media, IC 95% = Intervalo de confianza al 95%, TBHQ = Terbutil Hidroquinona

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T10, USAC.

En las tablas 5, 7, 9 y 11 se realizó un ANOVA con respecto a las tres muestras provenientes de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango, en las pruebas de DPPH, ABTS, fenoles totales y FRAP respectivamente.

En las tablas 6, 8, 10 y 12 se realizó una prueba Tukey con respecto a las tres muestras provenientes de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango, en las pruebas de DPPH, ABTS, fenoles totales y FRAP respectivamente.

En las gráficas 1, 2, 3 y 4 se realizaron gráficas de cajas en donde se comparan las medias obtenidas en las pruebas de DPPH, ABTS, fenoles totales y FRAP respectivamente, con respecto a las tres muestras provenientes de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango.

Tabla 5. ANOVA prueba de DPPH de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Fuente	Número de observaciones = 15			R al cuadrado = 0.9988	
	Suma de cuadrados parcial	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor p
Modelo	94.251997	2	47.125998	4863.34	0.0000
Grupos	94.251997	2	47.125998	4863.34	0.0000
Residual	0.11628053	12	0.00969004		
Total	94.368277	14	6.7405912		

Fuente: Datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

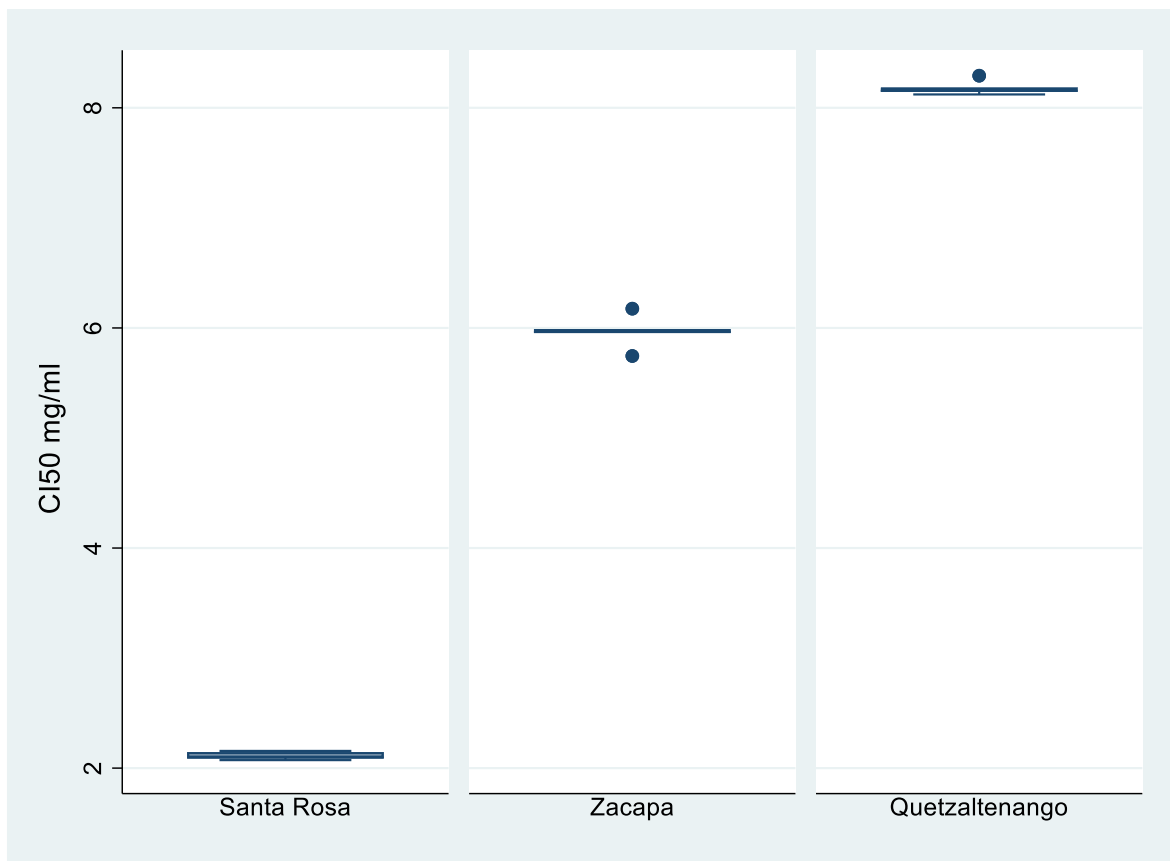
Tabla 6. Tukey prueba de DPPH de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Grupos	Contraste	Error estándar	Tukey	
			[Intervalo de Confianza 95%]	
2 vs 1	3.853036	0.0622577	3.686942	4.019131
3 vs 1	6.066709	0.0622577	5.900614	6.232804
3 vs 2	2.213673	0.0622577	2.047578	2.379768

Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

*Grupo 1: extracto de Santa Rosa, grupo 2: extracto de Zacapa, grupo 3: extracto de Quetzaltenango

Gráfica 1. Gráfica de cajas prueba de DPPH de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango



Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

Tabla 7. ANOVA prueba de ABTS de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Fuente	Número de observaciones = 15			R al cuadrado = 0.9760	
	Error cuadrático medio= 0.269636			R al cuadrado ajustada= 0.9720	
	Suma de cuadrados parcial	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor p
Modelo	35.527699	2	17.76385	244.33	0.0000
Grupos	35.527699	2	17.76385	244.33	0.0000
Residual	0.87244346	12	0.07270362		
Total	36.400143	14	2.6000102		

Fuente: Datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

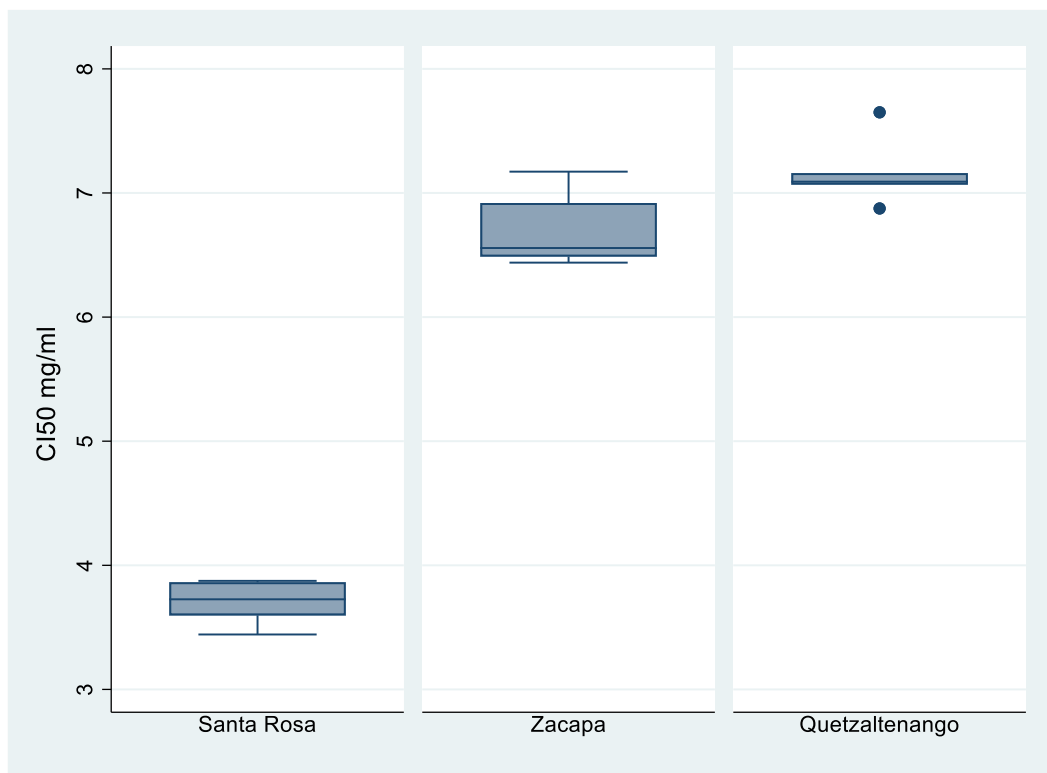
Tabla 8. Tukey prueba de ABTS de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Grupos	Contraste	Error estándar	Tukey	
			[Intervalo de Confianza 95%]	
2 vs 1	3.014062	0.1705328	2.559103	3.46902
3 vs 1	3.467868	0.1705328	3.01291	3.922827
3 vs 2	0.4538067	0.1705328	-0.0011517	0.908765

Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

*Grupo 1: extracto de Santa Rosa, grupo 2: extracto de Zacapa, grupo 3: extracto de Quetzaltenango

Gráfica 2. Gráfica de cajas prueba de ABTS de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango



Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

Tabla 9. ANOVA prueba de fenoles totales de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Fuente	Número de observaciones = 15			R al cuadrado = 0.9906	
	Error cuadrático medio= 0.71485			R al cuadrado ajustada= 0.9890	
	Suma de cuadrados parcial	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor p
Modelo	643.02227	2	321.51114	629.17	0.0000
Grupos	643.02227	2	321.51114	629.17	0.0000
Residual	6.1321219	12	0.51101015		
Total	649.1544	14	46.368171		

Fuente: Datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

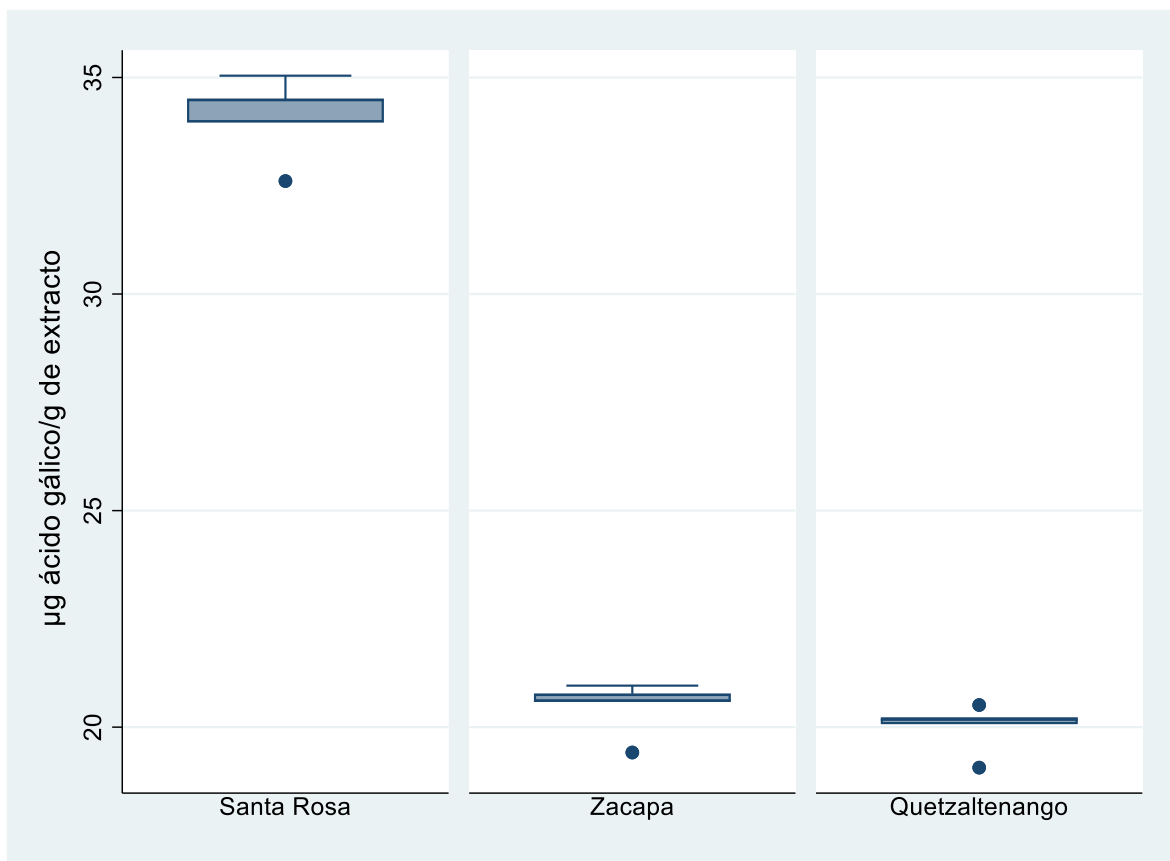
Tabla 10. Tukey prueba de ABTS de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Grupos	Contraste	Error estándar	Tukey	
			[Intervalo de Confianza 95%]	
2 vs 1	-13.6528	0.4521107	-14.85897	-12.44663
3 vs 1	-14.11389	0.4521107	-15.32006	-12.90772
3 vs 2	-0.4610931	0.4521107	-1.667263	0.7450765

Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

*Grupo 1: extracto de Santa Rosa, grupo 2: extracto de Zacapa, grupo 3: extracto de Quetzaltenango

Gráfica 3. Gráfica de cajas prueba de fenoles totales de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango



Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

Tabla 11. ANOVA prueba de FRAP de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Fuente	Número de observaciones = 15			R al cuadrado = 0.9937	
	Error cuadrático medio= 0.077684			R al cuadrado ajustada= 0.9927	
	Suma de cuadrados parcial	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor p
Modelo	11.427282	2	5.7136411	946.77	0.0000
Grupos	11.427282	2	5.7136411	946.77	0.0000
Residual	0.07241853	12	0.00603488		
Total	11.499701	14	0.8214072		

Fuente: Datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

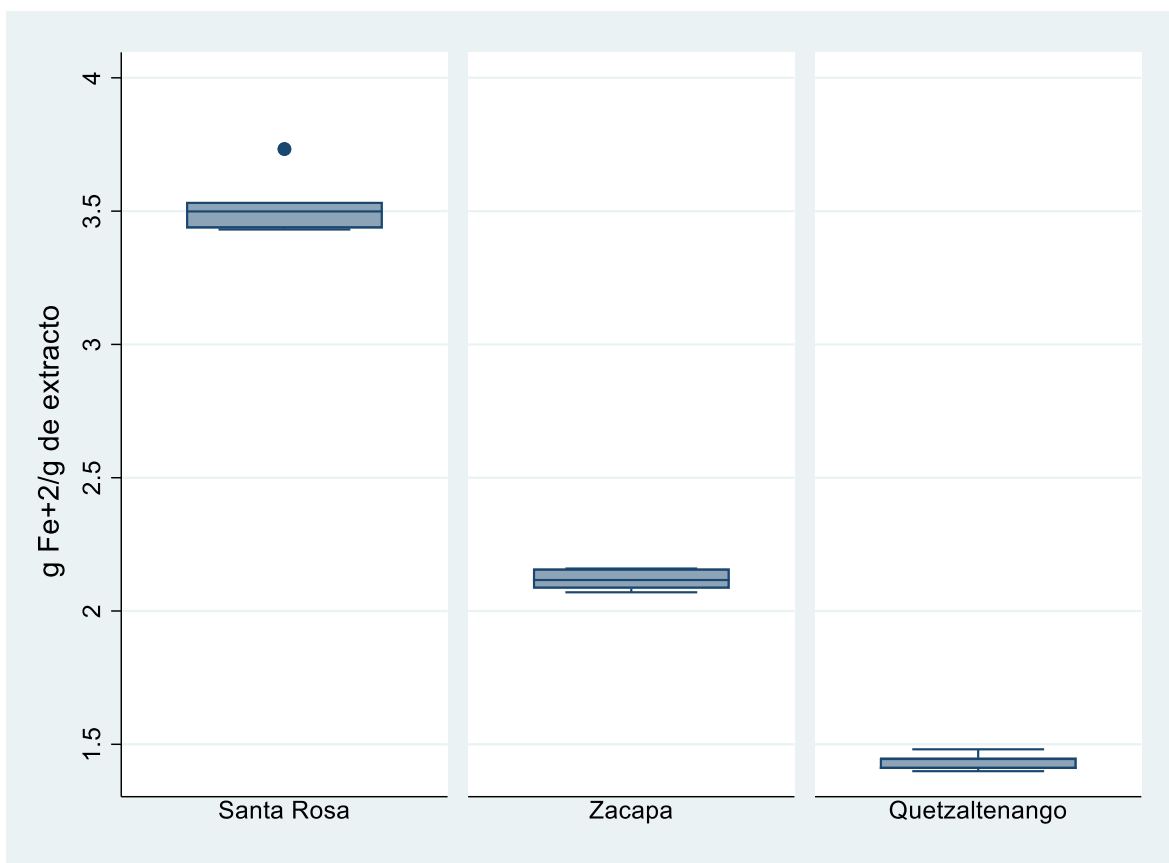
Tabla 12. Tukey prueba de FRAP de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango

Grupos	Contraste	Error estándar	Tukey	
			[Intervalo de Confianza 95%]	
2 vs 1	-1.409002	0.049132	-1.54008	-1.277925
3 vs 1	-2.09706	0.049132	-2.228137	-1.965982
3 vs 2	-0.6880574	0.049132	-0.8191348	-0.55698

Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

*Grupo 1: extracto de Santa Rosa, grupo 2: extracto de Zacapa, grupo 3: extracto de Quetzaltenango

Gráfica 4. Gráfica de cajas prueba de FRAP de los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de las regiones de Santa Rosa, Zacapa y Quetzaltenango



Fuente: datos experimentales obtenidos de STATA 15.1

9 DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizaron pulpas de café de tres regiones de Guatemala, siendo estas de Santa Rosa, Quetzaltenango y Zacapa. En las cuales se pudo observar que el solvente etanólico que mejores resultados obtuvo en la prueba de sólidos totales fue el etanol al 70% para la pulpa de café de Santa Rosa y Quetzaltenango, mientras que el etanol al 30% fue el mejor para la de Zacapa. Así que se utilizaron estos solventes para estas respectivas pulpas de café, para así poder obtener los mejores rendimientos de extracción posibles por medio de concentración por rotavapor. Así fue como se obtuvo el mejor porcentaje de extracción en la pulpa de Santa Rosa, con un porcentaje de rendimiento de 14.86%, en comparación a los porcentajes de rendimiento de Zacapa, que obtuvo un 9.5% y de Quetzaltenango que fue de 2.84% (Tabla 3).

Para medir la actividad antioxidante de estos extractos etanólicos de pulpa de café se utilizaron diferentes métodos. El primer método fue la cromatografía de capa fina de DPPH, en la cual las pulpas de café de Santa Rosa y Quetzaltenango mostraron una actividad antioxidante moderada, mientras que la de Zacapa presentó baja actividad antioxidante, en comparación con los estándares utilizados, los cuales fueron quercetina, Trolox, TBHQ y vitamina C, de los cuales ya se sabe que poseen una buena capacidad antioxidante (tabla 4). Mientras que la cuantificación de actividad antioxidante se evaluó por los métodos de DPPH, ABTS y FRAP, y además se determinó el contenido de fenoles totales.

En todas las evaluaciones de actividad cuantitativa de actividad antioxidante mencionadas anteriormente (Tabla 4), la región que presentó una mayor actividad antioxidante fue la de Santa Rosa, seguida por la de Zacapa y Quetzaltenango.

En el estudio de Fonseca, Calderón y Rivera, (2014), su objetivo secundario fue evaluar la capacidad antioxidante de los subproductos de la industria del café (pergamino, pulpa y cáscara), con el fin de explotar otros posibles usos de estos residuos. Se utilizaron los métodos de ABTS, FRAP y contenido de fenoles totales por Folin Ciocalteu. Se obtuvieron valores dentro del rango de 2.265 a 1894 y de 71.78 a 233.0 μmol Trolox/ g café por FRAP y ABTS respectivamente. Mientras que en la prueba de fenoles totales se reportó como mg

equivalentes de ácido gálico por gramo de café, obteniéndose valores en el intervalo de 52.57 a 1094 mg EAC/g café. Concluyendo así que todas las muestras evaluadas, tanto las comerciales como las de sin tostar, registraron fenoles totales y capacidad antioxidante, incluso los subproductos del café como el pergamino, pulpa y cáscara.

Días, (2011), cuantificó la actividad antioxidante en pulpa de café de Ecuador, en donde se utilizaron las metodologías de DPPH, ABTS, FRAP y fenoles totales. Los resultados por DPPH, ABTS y FRAP se expresaron como μMol equivalente de Trolox/ g pulpa fresca, mientras que los resultados de fenoles totales se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/ 100 g de pulpa fresca. Con la gran diferencia de que en esta investigación se trabajó con la pulpa fresca, es decir jamás pasó por un horno de convección de aire forzado para que cumpliera cierto parámetro de humedad, por lo que los resultados pueden variar. De acuerdo con los resultados obtenidos en la investigación, quien presentó mejor actividad antioxidante por DPPH, ABTS, FRAP y fenoles totales fue el extracto donde se utilizó la mezcla de solventes metanol/acetona.

Murthy y Madhava, (2012), encontraron fenoles totales en subproductos entre 1 y 1,5 % (pulpa= 1.48 % y cáscara= 1.22 %) y una producción de conservas entre 11.7 y 25 %, con un contenido de ácidos clorogénicos de 10-23 %.

Evidenciando así que existen otros estudios donde se ha determinado la actividad antioxidante de la pulpa de café, por las diferentes metodologías utilizadas en esta investigación, con la diferencia de que no hay investigaciones de este tipo para la pulpa de café en nuestro país Guatemala.

Según un artículo de Wright, et al., (2001), existe una clasificación que describe los métodos para medir actividad antioxidante según sea su mecanismo de reacción, pues se conoce que los antioxidantes pueden estabilizar radicales libres siguiendo dos mecanismos, uno llamado Transferencia de Átomos de Hidrogeno (TAH) y otro denominado Transferencia de Electrones (TE), los cuales pueden ocurrir de forma paralela; ambos dan como resultado la estabilización del radical libre

Según describe Guija, et al, (2015), en la técnica que se utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH, el radical libre es susceptible de reaccionar con

compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorción en función del tiempo. Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida posteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta. La reacción antes descrita se puede observar en el anexo No. 10.

El fundamento del método desarrollado por Brand-Williams et al. (1995), DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente.

El método de ABTS que fue descrito por Kuskoski, et al, (2005), el radical formado de ABTS se va midiendo por espectrofotometría, en el cual se va leyendo la absorción, mientras que hay una disminución de color, por la reacción entre el radical ABTS con la muestra de antioxidante. Durante la reacción entre estos dos compuestos para estabilizar el radical $ABTS^{\bullet+}$, de primero se forma el ABTS reducido y un radical libre fenoxil. Este radical libre fenoxil puede tomar tres vías alternativas: 1) El ABTS reducido reacciona con el radical fenoxil regresando a los compuestos originales; 2) el radical fenoxil encuentra otro radical fenoxil y se neutralizan entre ellos formando un dimero; 3) el radical fenoxil encuentra un segundo radical $ABTS^{\bullet+}$ y estabilizarlo formando dos iones, el ion fenolato y el ion $ABTS^{2+}$. Así como se puede observar en el anexo No. 11

En esta misma investigación de Kuskoski, et al, (2005), menciona que tanto el método de DPPH como el de ABTS presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH 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, enzimática, o también eletroquímica. En este caso, en esta investigación se generó en una reacción química con persulfato de potasio. 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 $ABTS^{\bullet+}$ tiene, además, 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.

Por estas razones es que el extracto de pulpa de Santa Rosa obtuvo la mejor CI_{50} para estas dos pruebas, la de DPPH y ABTS, ya que ambas pruebas utilizan un radical libre estable, en el cual ocurren los dos mecanismos de THA y TE, dando así una reacción colorimétrica que se puede cuantificar por métodos espectrofotométricos a cierta longitud de onda.

Siguiendo en la misma investigación de Kuskoski, et al, (2005), dice que la prueba de determinación de fenoles totales es un método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos.

Según varios estudios de diferentes autores Cao et al., (1998); Fernández Pachón et al., (2006); Mora H., (2009), el ensayo FRAP también se trata de un método espectrofotométrico que mide la reducción de un complejo formado por un cromógeno, normalmente de TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina), y hierro férrico (Fe^{3+}) incoloro a un complejo ferroso Fe^{2+} de un intenso color azul verdoso en presencia de antioxidantes en un medio ácido. Según la metodología utilizada lo que se formó fue un ion complejo de ferrocianuro férrico, el cual, con la incorporación de la muestra antioxidante, se redujo a hierro ferroso, siguiendo el mismo principio de la metodología descrita.

Por lo que se puede afirmar que estas dos últimas metodologías, determinación de fenoles totales y FRAP, siguen un mecanismo reductor de transferencia de electrones, por lo que los resultados en comparación con las pruebas de radicales libres (DPPH y ABTS) fueron diferentes, siempre teniendo a la pulpa de café de Santa Rosa como la que obtuvo mejores resultados, seguida de la pulpa de café de Zacapa y Quetzaltenango.

En el artículo de Wright, et al., (2001), se menciona que el método FRAP sigue un mecanismo típicamente TE y, por lo tanto, en combinación con otros métodos puede ser útil para distinguir el mecanismo dominante de diferentes antioxidantes.

Según Fonseca, Calderón y Rivera, (2014), las propiedades antioxidantes de la pulpa de café se pueden atribuir a la presencia de ácidos clorogénicos. Se han identificado varios polifenoles en la pulpa por HPLC, tales como: ácido 5-cafeoilquínico, epicatequina, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5- dicafeoilquínico, catequina, ácido protocatéquico, rutina, ácido ferúlico y ácido 5-feruloilquinico.

En una tesis de maestría de Tobon, (2015), en donde se cuantificaron los compuestos fenólicos de la pulpa de café por medio de HPLC-DAD, se obtuvo que para la cuantificación de los ácidos clorogénicos se obtuvo: ácido clorogénico (971.28 ppm), ácido neoclorogénico (72.85 ppm), ácido criptoclorogénico (117.31 ppm), ácido cafeico (24.97 ppm), ácido 3,5-dicafeoilquinico (265.51 ppm) y ácido 4,5-dicafeoilquinico (52.55) y para los ácidos Hidroxicinámicos: ácido cumárico (63.74 ppm), ácido ferúlico (75.70 ppm) y ácido sinápico (90.71 ppm).

Según Auerbach y Gray, (1999), los fenoles pueden clasificarse según el número de carbonos que contenga la cadena lateral, dentro de los principales grupos se encuentran los ácidos hidroxicinámicos, una gran cantidad de compuestos fenólicos son antioxidantes. Estos son capaces de donar rápidamente un átomo de hidrógeno a la molécula en peligro de oxidación transformándola en un producto más estable. En la industria alimentaria, se utilizan antioxidantes sintéticos como el hidroxibutiltolueno (BHT), el hidroxibutilanisol (BHA) y el polietilenglicol (PG) para reducir los procesos oxidativos. Sin embargo, su uso es objeto de serias discusiones en relación con los efectos tóxicos y carcinogénicos que provocan. Por el contrario, las tendencias actuales se orientan a la utilización de antioxidantes como ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, caféico, p-cumárico y sinápico) provenientes de fuentes naturales.

Entre las aplicaciones de los polifenoles en la industria, pueden mencionarse: dar a los productos una vida útil más prolongada ya que los protege de frente al deterioro oxidativo, además de sus posibles efectos benéficos en los humanos y animales. Estudios recientes, sugieren que el consumo regular de esos alimentos ricos en polifenoles, reducen el riesgo de enfermedades asociadas al daño oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

10 CONCLUSIONES

- 10.1. Los extractos etanólicos de pulpa de café provenientes de Santa Rosa, Quetzaltenango y Zacapa presentaron actividad antioxidante por los métodos de DPPH, ABTS, FRAP y fenoles totales.
- 10.2. El extracto etanólico de pulpa de café proveniente de Santa Rosa presentó la mejor actividad antioxidante para las pruebas de radicales libres de DPPH y ABTS, seguida del extracto de pulpa de café de Zacapa y Quetzaltenango, al haber obtenido la menor CI_{50} expresado como mg de extracto por ml de solución.
- 10.3. El extracto etanólico de pulpa de café de Santa Rosa presentó la mejor actividad antioxidante para la prueba de cuantificación de fenoles totales, seguida del extracto de pulpa de café de Zacapa y Quetzaltenango, al haber obtenido la mayor concentración de fenoles totales expresados como μg de ácido gálico por gramo de extracto.
- 10.4. El extracto etanólico de pulpa de café de Santa Rosa presentó la mejor actividad antioxidante en la prueba de FRAP, seguida del extracto de pulpa de café de Zacapa y Quetzaltenango, al haber reducido la mayor cantidad de hierro en estado férrico a ferroso, obteniendo el mayor valor de mg de Fe^{2+} por gramo de extracto.
- 10.5. La actividad antioxidante presente en los extractos etanólicos de la pulpa de café, se puede correlacionar a sus compuestos fenólicos, como los ácidos clorogénicos y los ácidos hidroxicinámicos.
- 10.6. La diferencia de resultados entre las cuatro metodologías de actividad antioxidante se debió a que las pruebas por radicales libres, es decir las pruebas de DPPH y ABTS son por medio de transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones, mientras que las pruebas de fenoles totales y FRAP son únicamente por transferencia de electrones, en donde se evidencia el poder reductor de la muestra.

11 RECOMENDACIONES

- 11.1. Investigar la actividad antioxidante en otros subproductos del café en Guatemala.
- 11.2. Dar diferentes aplicaciones a la pulpa de café en Guatemala, como por ejemplo en la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética.
- 11.3. Identificar los compuestos fenólicos presentes en la pulpa de café en Guatemala.
- 11.4. Gracias a la actividad antioxidante presente en los extractos etanólicos de pulpa de café, se le podría dar diferentes usos a la pulpa como fuente promisoría de sustancias químicas funcionales y bioactivas para la industria, en lugar de ser desperdiciada y que contamine al medio ambiente.
- 11.5. Explorar otras actividades en la pulpa de café para evaluar su potencial biológico, como por ejemplo la actividad cicatrizante.

12 REFERENCIAS

- Arellano, M. (2009). *Estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxicinámicos obtenidos de la pulpa de café*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, División de ciencias biológicas y de la salud. México
- Auerbach, R. y Gray, D. (1999). Oat antioxidant extraction and measurement towards a commercial process. *J Sci Food Agric*, 79 (1), 385-389.
- Brand-Williams, W. et al. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Rev LWT- Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30.
- Cao, G., et al. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 44(6), 1309-1315.
- Córdova D., Menéndez C. Dardón R. (2009). *Determinación y Cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricoséuticos*. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala
- Coronado, M., Leon, S., Gutiérrez, R., Vásquez, M. y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42 (2), 206-212
- Días, A. (2011). *“Pulpa de café: Coffea arabica L: Como fuente alternativa de antioxidantes”* Tesis de grado previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica particular de Loja. Ecuador
- Fernández P., et al. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 56 (2), 110-122.

- Fonseca, L., Calderón, L., y Rivera, M. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en el Norte de Santander (Colombia). *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 21(3), 228-236.
- Gudiel L. (2009). *Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de Polypodium triseriale SW. (calahuala)*. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Guija, E. et al. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Rev Horiz Med*, 15 (1), 57-60
- Herrera, F. (2016). “*Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (Coffea arabica L.) empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial*” Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero Ambiental. Universidad Libre. Colombia.
- Korc, I., Bidegain, M. y Martell, M. (1995). Radicales libres bioquímica y sistemas antioxidantes implicancia en la patología neonatal. *Revista médica uruguaya*, 1 (11), 121-135
- Kuskoski, E. et al. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante de la pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 25 (4), 726-732
- LIPRONAT. (2013). Cuantificación de fenoles totales técnica micrométrica. Laboratorio de investigación de productos naturales. Universidad San Carlos de Guatemala.
- LIPRONAT. (2019). Determinación de la actividad antioxidante por el método macrométrico de la reducción de hierro (FRAP). Laboratorio de investigación de productos naturales. Universidad San Carlos de Guatemala.

- López, T., Prado-Barragán, A., Nevarez-Moorillon, G., Contreras, J., Rodríguez, R. y Aguilar, C. (2013). Incremento de la actividad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido. *Journal of food*, 11 (4), 359-365
- Menchu, S. (2017). Producción de café en Guatemala. Recuperado de <https://lta.reuters.com/article/domesticNews/idLTAKBN16T2TZ-OUULD>
- Mora H. (2009). Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*, 16 (3), 311-319.
- Murthy, P. y Madhava, N. (2012). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry byproducts. *Food Bioprocess Technol*, 5 (3), 897-903.
- Om P. Sharma. (2008). Revisión de ensayo antioxidante de DPPH. *International Journal of PharmTech Rsearch*, 1 (4), 1317-1321.
- Puerta, G. (1998). Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica L.* cultivadas en Colombia. *Revista Cenicafe*, 49 (4), 265-278
- Rathinavelu, R. y Graziosi, G. (2005). Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Italia. Recuperado de <http://www.ico.org/documents/ed1967c.pdf>
- Re, R. et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (2), 1231-1237
- Rojo, E. (2014). Café I (G. *Coffea*). *Revista Reduca*, 7 (2), 113-132

- Temis-Pérez, A. et al. (2011). Producción de café (*Coffea arabica L.*): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Revista Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5 (2), 54-74
- Tobon, N. (2015). *Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (Coffea arabica L.) variedad Castillo*. Tesis de maestría en innovación alimentaria y nutrición. Corporación universitaria Lasallista, Facultad de ingeniería. Colombia
- Vasco Catalina. (2008) “El total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los frutos importantes de Ecuador”. *Food Chemistry*, 111(4), 816-823
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista cubana de medicina*, 31 (2), 126-133
- WRIGHT, J., et al. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123 (6), 1173-1183.

13 ANEXOS

Anexo No. 1 pulpa de café seca y molida proveniente de Quetzaltenango, Santa Rosa y Zacapa



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No. 2 prueba de Solidos totales con solvente etanólico al 30%, 50%, 70% y 90%



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No. 3 reconcentración del extracto por rotavapor



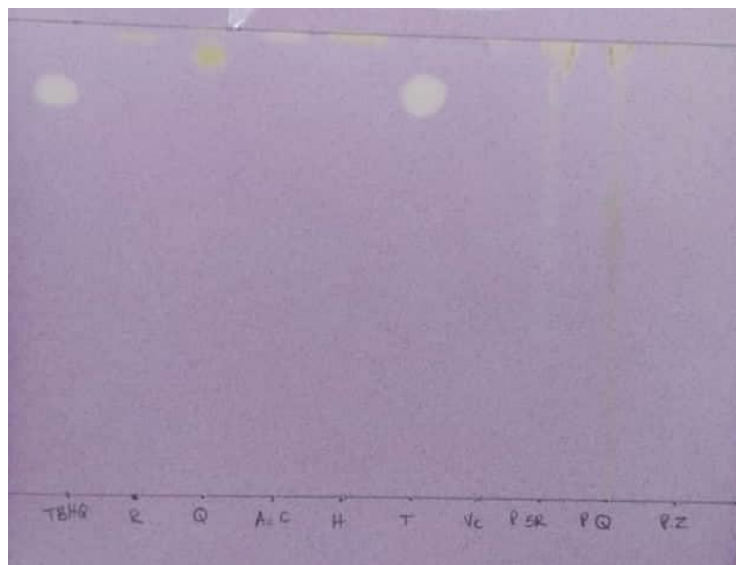
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No.4 Obtención del extracto etanólico



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–, laboratorio 106, edificio T10, USAC

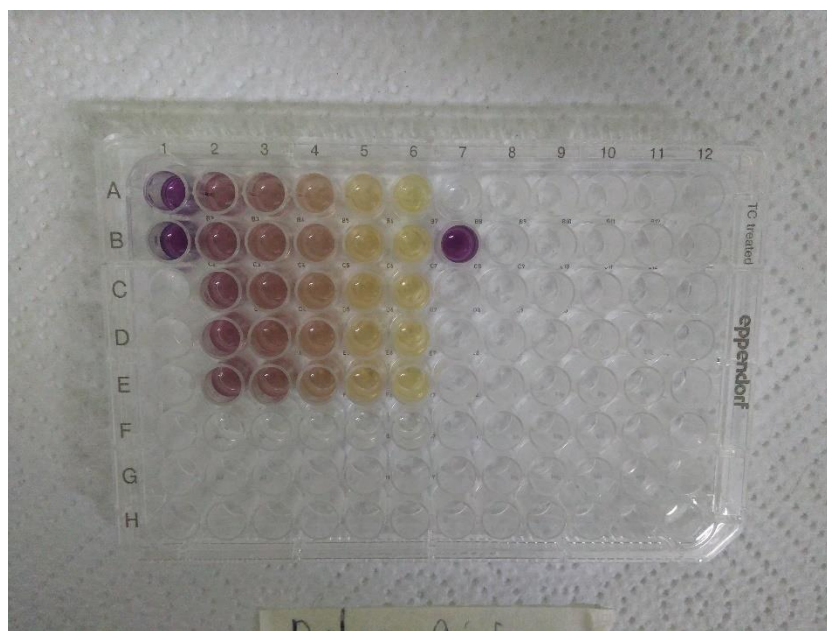
Anexo No.5 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina por DPPH



TBHQ: Terbutil hidroquinona
 R: Rutina
 Q: Quercetina
 AC: Ácido clorogénico
 H: Hiperósido
 T: Trolox
 Vc: Vitamina C
 PSR: Pulpa Santa Rosa
 PQ: Pulpa Quetzaltenango
 PZ: Pulpa Zacapa

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T

Anexo No.6 Actividad antioxidante por técnica micrométrica de DPPH



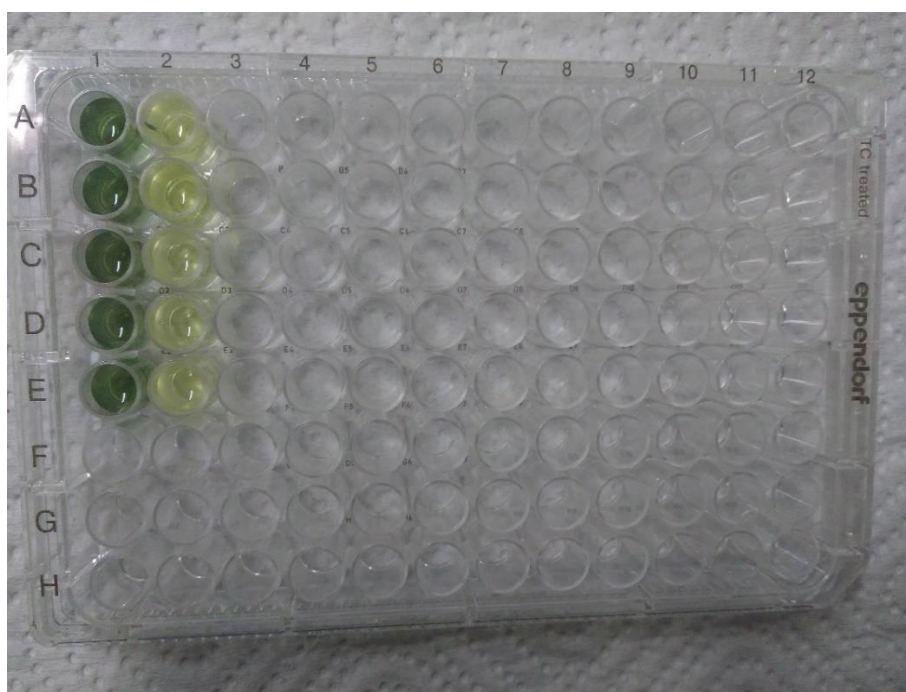
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No.7 Determinación de la actividad antioxidante por ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No.8 Cuantificación de fenoles totales (técnica micrométrica)



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No.9 Determinación de la actividad antioxidante por el método macrométrico de la reducción del hierro (FRAP)



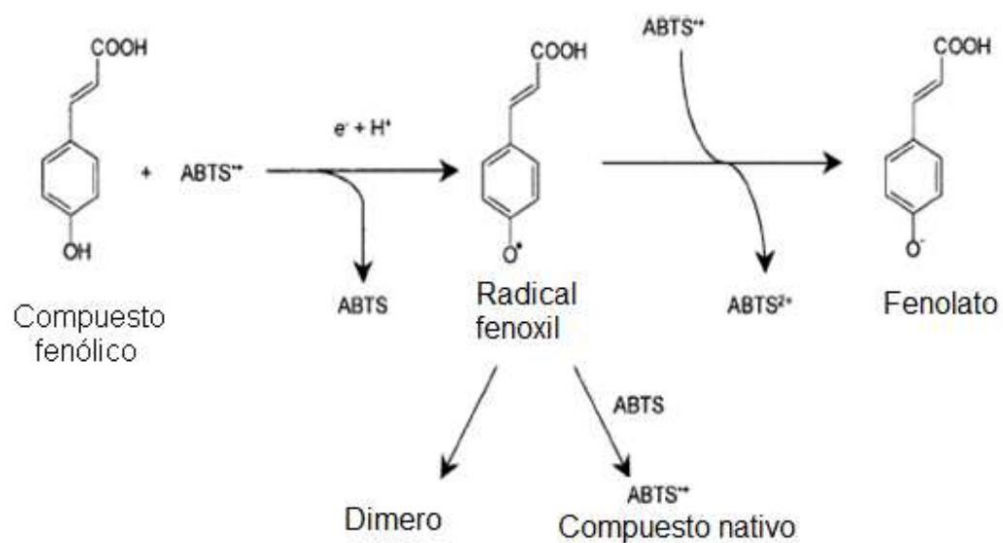
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T10, USAC

Anexo No. 10 reacción general entre el radical DPPH y un compuesto con actividad antioxidante



Fuente: Guija, et al, 2015

Anexo No. 11 vías alternas del radical libre fenoxil



Fuente: Kuskoski, et al, 2005



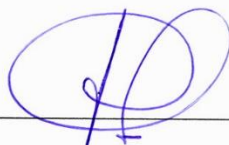
Andrés Esteban de León Salazar

Autor de Tesis



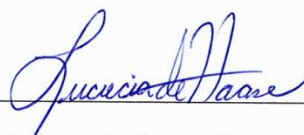
Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

Asesora



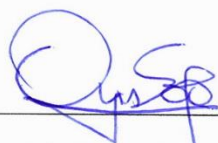
Licda. Irma Lucía Arriaga Tórtola

Revisora



M.A. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de Escuela de Química Farmacéutica



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano de la Facultad Ciencias Químicas y Farmacia