

Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de residuos de café (*Coffea arabica*) de la Región Frailesca de Villaflores, Chiapas

Martínez Molina Esther Candelaria¹, Ramírez Castillo María Leticia¹, Álvarez Gutiérrez Peggy Elizabeth², Gayosso Canales Martha³, Rodríguez Pastrana Blanca Rosa³

¹ Laboratorio de Investigación y Posgrado, Universidad Politécnica de Puebla, 3er Carril del Ejido Serrano S/N, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, Puebla, CP 72640.

² Universidad Politécnica de Chiapas, Eduardo J. Selvas s/n, Col. Magisterial, Tuxtla Gutiérrez Chiapas, CP 29010.

³ Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad Km. 1, Rancho Universitario, Ex Hacienda Aquetzalpa, Tulancingo, Hidalgo.

E-mail: sthermxme@hotmail.com

Resumen.

La producción de café se puede realizar mediante los procesos húmedo, seco y en menor cantidad semi-húmedo; en los que se generan cantidades significativas de residuos. Con el fin de aprovecharlos y darles un valor agregado, en este trabajo se evaluó la extracción de antioxidantes a partir de los desechos de café (constituidos de pulpa y piel) provenientes de la región Frailesca de Villaflores en el Estado de Chiapa. Los residuos fueron caracterizados previamente. Se propuso un diseño factorial 2³ (3 factores 2 niveles) para determinar las mejores condiciones de extracción de antioxidantes evaluando su actividad. Estos compuestos tienen amplias aplicaciones como aditivos alimentarios, han sido obtenidos de diversas fuentes vegetales y también son sintetizados. Los factores estudiados y sus niveles fueron: temperatura, 25 y 75 °C; concentración de etanol como solvente, 30 y 80%; tiempo de maceración, 40 y 100 min. Se obtuvo mayor actividad antioxidante a mayores temperaturas y menor concentración de etanol y el tiempo no fue un factor significativo de acuerdo al ANOVA. El tratamiento con condiciones de 75 °C, 30 % de etanol y 40 min mostró la actividad antioxidante más alta con un valor de 15.702 ± 0.85 mg_{AA}/g_{residuo seco}, donde AA es el equivalente en ácido ascórbico.

Palabras clave: pulpa de café, diseño experimental, antioxidantes.

1 Introducción.

La industria del café es un sector clave en la economía de México debido a que representa una fuente de ingresos y creación de empleo. Chiapas es el principal productor de dicho producto en el país con un 39.7 %, sin embargo durante su proceso, se generan también toneladas de subproductos tales como pulpa, mucílago y cascarrilla [1]. La mayoría de estos residuos son arrojados a vertederos y no se reciclan para otros fines. Además su alta carga orgánica los hace altamente contaminantes debido a que requieren una gran demanda de oxígeno para ser degradados [2].

Sin embargo la pulpa es esencialmente rica en azúcares, proteínas, minerales, cafeína y polifenoles de importancia industrial como el ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido ferúlico [3]. Los compuestos fenólicos antioxidantes, utilizados como aditivos alimentarios, reducen la rancidez, minimizan la producción de moléculas tóxicas de oxidación y extienden la vida de anaquel [4]. Sumado a esto se ha demostrado que los compuestos fenólicos naturales tienen propiedades antimicrobianas evitando la proliferación de patógenos en alimentos, por lo que pueden ser aplicados como conservadores [5]. Debido a lo anterior, una extracción correcta de estos compuestos le daría un valor agregado a los residuos generados en el proceso de obtención de café.

La extracción es el primer paso y el más importante en la recuperación y purificación de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales, por lo que se deben estudiar las mejores condiciones de extracción, siendo recomendable seguir una metodología estadística y no empírica.

Hay pocos estudios referentes a las posibles aplicaciones para los residuos de pulpa de café. La mayoría centra sus investigaciones en residuos de grano tostado y en cascarilla para producir bioetanol, composta, alimento para animales y también se han revalorizado para obtener probióticos, antioxidantes y antimicrobianos [6].

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antioxidante de los extractos de residuos de café obtenidos de un diseño factorial y de esta forma mejorar las condiciones de extracción. Este estudio contribuye a la valorización de los residuos de café, aprovechando sus potenciales propiedades antioxidantes para aplicarse en suplementos alimenticios o en otros sectores industriales.

2 Materiales y Métodos.

2.1 Materia prima.

Se utilizaron residuos provenientes de una comunidad de productores de la región Frailesca en Villaflores, Chiapas. Los residuos, compuestos de pulpa y piel, fueron secados en estufa durante 24 horas a 60 °C y posteriormente triturados hasta obtener un tamaño no mayor a 2 mm.

2.2 Caracterización de residuos.

Se realizó un análisis proximal para caracterizar los residuos, las muestras se analizaron por triplicado.

2.2.1 Determinación de humedad.

El contenido de humedad se determinó por gravimetría. El residuo se almacenó en estufa 4 h a 105 °C, los resultados se expresan en porcentaje de humedad de acuerdo a la Ecuación (1).

$$\text{Humedad (\%)} = 100 * \frac{A - B}{A} \quad \text{Ec. (1)}$$

Dónde:

A = Peso de la muestra húmeda (g)

B = Peso de la muestra seca (g)

2.2.2 Determinación de cenizas.

Las cenizas fueron obtenidas por calcinación de la muestra en mufla a 600 °C durante 4 horas, los

resultados son expresados en porcentaje de acuerdo a la Ecuación 2.

$$\text{Cenizas (\%)} = 100 * \frac{B - C}{B} \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde:

B = Peso de la muestra seca (g)

C = Peso de cenizas (g)

2.2.3 Determinación de Proteínas.

La determinación de proteína soluble se hizo por el método de Biuret. Se mezcló 1 mL de la muestra diluida con 4 mL del reactivo de Biuret que consiste en sulfato de cobre (0.15 %), tartrato de sodio y potasio (0.6 %) e hidróxido de sodio (0.3 %).

La mezcla se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm usando albúmina bovina sérica como estándar.

2.2.4 Determinación de Azúcares reductores.

La determinación de los azúcares reductores se realizó por el método del DNS (ácido dinitrosalicílico) descrito por Bello Gil y col. (2006) [7].

2.2.5 Determinación de Azúcares totales.

Los azúcares totales se cuantificaron por el método de Fenol-Ácido sulfúrico reportado por Dubois y col. (1956) [8].

2.2.6 Determinación de pectina.

Las determinaciones de pectina se hicieron en base a la Norma Mexicana NMX-F-347-S1980 Frutas y derivados- Determinación de Pectina [9].

2.2.7 Determinación de fibra cruda.

La determinación de fibra cruda se hizo en base a lo establecido en la NMX-F-090-S-1978- Determinación de fibra cruda en alimentos [10].

2.3 Diseño experimental para actividad antioxidante.

2.3.1 Diseño Factorial.

Para la extracción de los antioxidantes, se empleó un diseño experimental 2³, 3 factores y 2 niveles de acuerdo a la Tabla 1. Los factores seleccionados y sus niveles fueron: temperatura (25 y 75 °C), solución hidroalcohólica (30 y 80 %) y tiempo (40 y 100 minutos). Teniendo como variable de respuesta la actividad antioxidante. Los tratamientos se hicieron por duplicado. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un

ANOVA utilizando el programa R versión 2.12.2 con un nivel de significancia del 95 %.

2.3.2 Extracción.

Empleando soluciones hidroalcohólicas, temperaturas y tiempos definidos de acuerdo al diseño factorial, se realizaron las extracciones sólido-líquidas en una relación 1:20 p/v (2 g de residuo seco y 40 mL de solución). Se utilizaron Parrillas de calentamiento con agitación constante a 475 rpm. Después del tiempo de extracción las muestras fueron centrifugadas a 6500 rpm y el sobrenadante fue concentrado en rotavapor. El rendimiento de la extracción fue determinado gravimétricamente. El extracto se resuspendió en 10 mL de solución hidroalcohólica al 30 % y se almacenó a -20 °C para su análisis posterior.

Tabla 1 Variables independientes en el diseño factorial 2^3 donde X_1 : temperatura (°C); X_2 : concentración de etanol (%) y X_3 : tiempo de extracción (min).

Tratamientos	X_1 :T	X_2 :E	X_3 :t
1	-(25)	-(30)	-(40)
2	+(75)	-(30)	-(40)
3	-(25)	+(80)	-(40)
4	+(75)	+(80)	-(40)
5	-(25)	-(30)	+(100)
6	+(75)	-(30)	+(100)
7	-(25)	+(80)	+(100)
8	+(75)	+(80)	+(100)

2.4 Determinación de actividad antioxidante por reducción del ABTS⁺.

La medición de la capacidad antioxidante fue llevada a cabo con ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) de acuerdo al método de Re y col. (1999) [11]. Se preparó una solución ABTS 7 mM. El radical ABTS⁺ fue generado por la adición de persulfato de potasio a la solución de ABTS preparada previamente, obteniendo una concentración total de 2.45 mM, esta solución se almacenó en la oscuridad durante 16 horas. La solución de ABTS⁺ se diluye en etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 (± 0.02) a 734 nm. Las determinaciones se llevaron a cabo tomando 10 μ L de extracto más 1 mL de ABTS⁺ diluido, se incubó durante 6 minutos y se leyó a 734 nm. Los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido ascórbico, utilizando se las unidades de mg_{AA}/g_{rs} donde m_{AA} =mg de Ácido ascórbico y g_{rs} = gramos de residuo seco.

3 Resultados y discusión.

3.1 Caracterización de los residuos de café.

La caracterización de los residuos provenientes de Villaflores, Estado de Chiapas, se muestra en la Tabla 2, como la composición química en porcentaje, también se presentan los resultados de otros estudios donde también se utilizó pulpa de café.

Los residuos analizados en este estudio, presentaron bajos porcentajes de cenizas y azúcares totales y alto contenido de proteína soluble. Se muestran resultados similares a los reportados por Bonilla y col. [3], quienes trabajaron con residuos provenientes de Gerais, Brasil. Sin embargo hay una diferencia notoria en los azúcares totales reportados por Navia y col. (2011) para residuos provenientes de Timbío, Colombia y los de Murthy y Madhava (2013) de pulpa de café originaria de Mysore, India, en estos dos trabajos se reportaron porcentajes de 79 y 72% respectivamente [12,13]. Cabe destacar que la composición de los residuos depende de diversos factores tales como: condiciones climáticas, tipo de suelo de cultivo, especie, temporada de cosecha, entre otros.

Tabla 2. Resultados comparativos de la caracterización de residuos de pulpa de café.

Composición (%)	Bonilla y col. (2014) [3]	Navia y col. (2011) [12]	Murthy y Madhava (2012) [13]	Este trabajo
Humedad	82.44	---	15	11.99
Azúcares totales	9.7	79.16	72.3	8.28
Azúcares reductores	9.63	---	---	6.06
Proteínas	14.79	10.47	7	21.79
Cenizas	7.33	9.39	5.4	1.59
Fibra cruda	14.1	27.19	---	17.22
Pectina soluble	0.7	---	---	1.96

3.2 Extracción de compuestos antioxidantes

Se tomaron referencias de otros trabajos para establecer los factores más relevantes y sus niveles para realizar el diseño factorial [6,14,15], además dado que se han reportado extracciones de compuestos fenólicos con actividad antioxidante usando soluciones hidroalcohólicas [6,15], en este trabajo se empleó etanol, considerando que tiene menos restricciones para aplicaciones en alimentos.

Como se muestra en la Figura 1 las condiciones de extracción afectan significativamente la capacidad antioxidante. Se puede observar que el tratamiento 2 (75 °C, 30 % de EtOH y 40 min), muestra mejores resultados en comparación con el resto de los tratamientos, por lo que se infiere que la alta actividad antioxidante está relacionado con extracciones a altas temperaturas y bajas concentraciones de etanol, estos resultados difieren de los publicados por Costa y col. (2014) [14] quienes trabajaron en la optimización de extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cascarilla, residuo generado después del tostado del grano, reportando mayor actividad antioxidante bajo las siguientes condiciones: concentración de etanol a 50 %, 40 °C y 60 min, sin embargo ellos realizaron sus pruebas con el método del DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

El ANOVA para el diseño factorial de actividad antioxidante con un nivel de significancia de $p < 0.05$ se muestra en la Tabla 3.

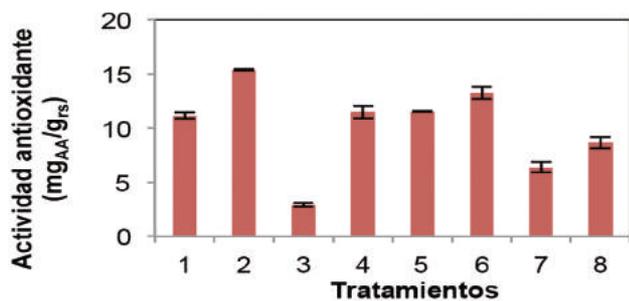


Figura 1. Grafica de actividad antioxidante en función de los tratamientos del diseño factorial, AA=Ácido ascórbico y rs=residuo seco.

De acuerdo a este análisis estadístico se puede resaltar que para la obtención de alta actividad antioxidante, los efectos más significativos fueron: la temperatura (T), la concentración de etanol (EtOH) y las interacciones T:EtOH y T:t. Es decir que a mayor temperatura y menor concentración de etanol se obtiene mayor actividad antioxidante, en otras palabras la T tiene efecto positivo y el aumento en la concentración de etanol efecto negativo en la actividad antioxidante. En la Figura 2 se muestran los resultados de manera gráfica. En la Figura 2a se observa que a bajas concentraciones de etanol se obtienen las mayores actividades antioxidantes. Con respecto al tiempo, si bien no tuvo efecto significativo de manera individual (Figura 2b), si lo muestra en la interacción con la temperatura. En la Figura 2c, se observan bajas actividades para la temperatura baja de 25 °C con un ligero incremento de la actividad al aumentar el

tiempo de maceración, sin embargo se obtienen los mejores resultados a menor tiempo y altas temperaturas.

Tabla 3. ANOVA para el diseño factorial 23 de actividad antioxidante

Efecto	GD	SC	SC ajust	F	P-Valor
T (°C)	1	0.0495	0.0495	437.26	2.870e-08
EtOH (%)	1	0.0835	0.0835	737.69	3.638e-09
t (min)	1	0.0002	0.0002	1.85	0.210088
T:EtOH	1	0.0041	0.0041	37.030	0.000294
T:t	1	0.0136	0.0136	120.39	4.229e-06
EtOH:t	1	0.0010	0.0010	8.90	0.017495
T:EtOH:t	1	0.0025	0.0025	22.081	0.001543
Residuales	8	0.0009	0.0001		

GD, Grado de libertad; SC, Suma de cuadrados; F, estadístico de prueba; P-Valor, significancia observada.

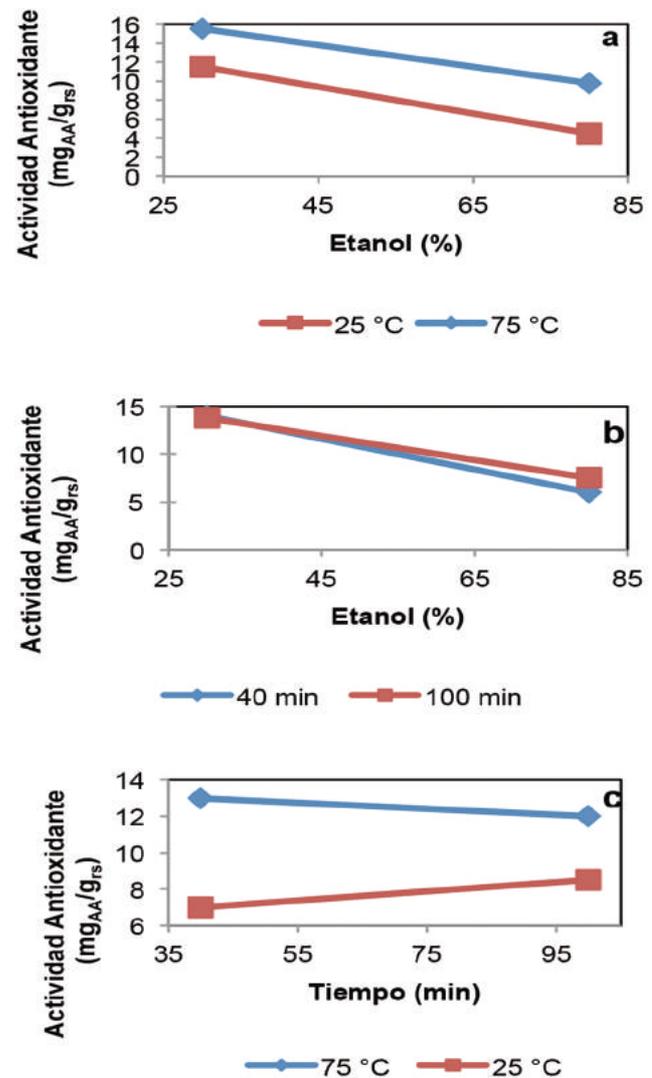


Figura 2. Efecto de las interacciones: a) tiempo-etanol, b) Temperatura-etanol y c) tiempo-Temperatura. , AA=Ácido ascórbico y rs=residuo seco.

Con estos resultados se observa que la actividad antioxidante tiende a subir con altas temperaturas y

bajas concentraciones de etanol, contrario a lo publicado por Costa y col. [14], quienes divulgan que el aumento de temperatura no mejoró los resultados del ensayo DPPH para actividad antioxidante. Sin embargo, los residuos que ellos estudiaron difieren de los utilizados en este trabajo, estos autores utilizaron cascarilla de café tostado y en este trabajo se utilizó pulpa y piel sin ningún tratamiento térmico previo a las extracciones realizadas.

4 Conclusiones.

Este estudio contribuye a la revalorización de los residuos de café para la extracción y evaluación de la actividad antioxidante. Se empleó un diseño factorial para observar el efecto a dos niveles de los factores tiempo, temperatura y concentración de etanol, los resultados mostraron al incrementar la temperatura y disminuir la concentración de etanol se obtiene mayor actividad antioxidante y que el tiempo no tiene un efecto significativo. Es necesario realizar más investigaciones con estos residuos, en el caso de este trabajo aplicar los antioxidantes obtenidos en la industria de alimentos o cosmética y continuar estudiando los residuos para la obtención de compuestos bioactivos como antimicrobianos o probióticos.

Agradecimientos.

Al CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de Maestría en Ingeniería de la Ing. Esther Candelaria Martínez Molina, No. 563405.

Referencias.

- [1] SIAP-SAGARPA, «Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera,» (2013). [En línea]. Available: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. [Último acceso: 12 febrero 2014].
- [2] Beyene A., Kassahun Y., Addis T., Amsalu A., Legesse W., Kloos H. y Triest L. (2012). The impact of traditional coffee processing on river water quality in Ethiopia and the urgency of adopting sound environmental practices. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184: 7053-7063.
- [3] Bonilla H., Duarte W. y Freitas S. (2014). Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresource Technology*, 166: 142-150.
- [4] Rodríguez A., Sánchez M., Zapata C., Vázquez J. y Franco D. (2012). Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chemistry*, 165: 290-299.
- [5] Kołodziejczyka K., Sójkaa M., Abadiasb M. y Viñas I. (2013). Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Industrial Crops and Products*, 51: 279-288.
- [6] Jiménez Z.A., Pastoriza S. y Rufián H.J.A. (2015). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 61: 12-18.
- [7] Bello Gil D., Carrera Bocourt E. y Díaz Maqueira Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 40(2): 45-50.
- [8] Dubois M., Guilles K., Hamilton P. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.
- [9] Norma Oficial Mexicana NOM-F-347-S-1980-Frutas y Derivados- Determinación de Pectina. Disponible en Diario Oficial de la Federación, SEGOB: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4857911&fecha=01/08/1980. Accesado: 19 de mayo 2015.
- [10] NMX-F-090-S-1978-Determinación de fibra cruda en alimentos. Disponible en Diario Oficial de la Federación, SEGOB: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4799842&fecha=27/03/1979. Accesado: 19 de mayo 2015.
- [11] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice E.C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9): 1231-1237.
- [12] Navia P.D.P., Velasco M.R.J. y Hoyos C.J.L. (2011). Production of ethanol from coffee processing by-products. *Revista de la Facultad de Química and evaluation Farmacéutica*. 18(3):287-294.
- [13] Murthy P.S. y Madhava N.M. (2012). Recovery of Phenolic Antioxidants and Funcional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3): 897-903.
- [14] Costa A.S.G., Alves R.C., Vinha A.F., Barreira S.V.P., Nunes M.A., Cunha L.M. y Oliveira M.B.P.P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53: 350-357.
- [15] Gan C.Y. y Latiff A.A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod usin response surface methodology. *Food Chemistry*, 124(3): 1277-1287.