

## Comparación entre el estado de maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.), el contenido de antocianinas y su capacidad antioxidante

### Comparison between the level of maturation of the coffee fruit (*Coffea arabica* L.), and the contents of anthocyanins and their antioxidant capacity

Dr. Miguel A. Puertas-Mejía,<sup>I</sup> Lic. Felix Rivera-Echeverry,<sup>I</sup> Lic. Paola Villegas-Guzmán,<sup>I</sup> Dr. C. Benjamín Alberto Rojano,<sup>II</sup> Dr. Carlos Pelaez-Jaramillo<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>II</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Medellín, Colombia.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la piel o pericarpio del café que define su estado de madurez y calidad, es prácticamente lignocelulosa y no tiene ningún valor comercial, no obstante podría considerarse como una fuente importante de compuestos antioxidantes, sobre todo de antocianinas.

**Objetivos:** comparar el potencial antioxidante del pericarpio del fruto de café en diferentes estados de maduración con respecto al contenido de antocianinas.

**Métodos:** la piel del fruto del café liofilizada en cinco estados de maduración se sometió a extracciones sólido-líquido con metanol acidulado; se determinó el contenido de antocianinas por el método diferencial de pH y el potencial antioxidante se evaluó sobre la base de los métodos de DPPH (catión radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidrazilo), ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) y FRAP (*ferric reducing/antioxidant power*).

**Resultados:** la muestra de granos sobremaduros presentó un contenido de antocianinas 63,14 mg cianidin-3-glucósido/L. Este valor resulta de 2 a 18 veces mayor con respecto a los otros estados de maduración. No obstante, el estado "pintón" fue el que mostró una mayor capacidad antioxidante ( $\geq 2$ -5 veces), en todos los métodos evaluados, lo cual sugiere una mayor presencia de otros componentes con actividad antioxidante durante esta etapa de maduración.

**Conclusiones:** todos los extractos presentaron buena capacidad antioxidante, por lo tanto, aquellos frutos que no sean empleados para la industria de consumo de café pueden ser usados como fuente de antioxidantes, independiente de su estado de maduración.

**Palabras clave:** antioxidantes naturales, antocianinas, café, *Coffee arabica* L., estados de maduración, pericarpio.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the maturity and quality of the coffee beans is defined by the color of its outer and often edible layer (pericarp), and this tissue is mainly lignocellulose without any commercial value; however it could be considered as a source of important antioxidant compounds, mostly anthocyanins.

**Objectives:** to compare the antioxidant potential of the pericarp of the coffee bean at different states of maturation in terms of the content of anthocyanins.

**Methods:** lyophilized and powdered pericarp of *Coffee arabica* on different stages of maturation underwent solid-liquid extractions with acidulated methanol and total anthocyanins content was determined by pH differential method; the antioxidant potential was evaluated by using DPPH (radical cation  $\alpha$ - $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl, ORAC (oxygen radical absorbance capacity) and FRAP (ferric reducing/antioxidant power) tests.

**Results:** the sample from over-matured coffee beans showed a content of anthocyanins equal to 63.14 mg cyanidin-3-glucoside/L, which is 2 to 18 times higher than that of other maturation states. Nevertheless, the "pintón" stage demonstrated the highest antioxidant capacity ( $\geq$  2-5 times) in all the evaluated methods. This indicates the presence of additional components with antioxidant power during this maturation stage.

**Conclusions:** all the extracts showed significant antioxidant capacity, therefore, the undesired fruits to coffee industry may be used as a source of antioxidant compounds regardless of their maturity stage.

**Key words:** natural antioxidants, anthocyanins, coffee, *Coffee arabica* L., maturity stages, pericarp.

---

## INTRODUCCIÓN

El café en Colombia se destaca por su amplia adaptabilidad a los diversos agroecosistemas y condiciones climatológicas del país y puede encontrarse desde alturas cercanas al nivel del mar hasta los 2 000 m de altitud. Además, los arbustos de café por sus características de área cultivada constituyen hábitat apropiado para muchas especies de la fauna y flora nativas, favoreciendo la conservación de los suelos y la biodiversidad. Por otro lado, en los cafetales colombianos es posible encontrar en cualquier época del año ramas con frutos desde totalmente verdes hasta sobremaduros e incluso con flores. Lo anterior implica que la calidad del café cosechado puede variar en dependencia del método de recolección y es necesario que los frutos en estado maduro se cosechen de manera selectiva para su posterior

---

proceso de beneficio, porque son estos los que al final impactarán la calidad del cultivo. Por lo tanto, su recolección dependerá del estado de madurez de los frutos, que puede determinarse visualmente teniendo en cuenta la coloración de las cerezas o mediante presión con los dedos y constatando una consistencia suave y un fácil desprendimiento de su pedúnculo. Desde el punto de vista medicinal, el café es considerado como un potente estimulante y analgésico, además de poseer propiedades epidemiológicas, afrodisíacas, contra diferentes enfermedades, entre otras;<sup>1,2</sup> también se considera una importante fuente de sustancias funcionales como las antocianinas, que han demostrado poseer una elevada capacidad antioxidante en diversas investigaciones.<sup>3,4</sup> Estos compuestos se encuentran con preferencia en la piel (pericarpio) del fruto y son los principales responsables de su coloración roja. El café maduro presenta una composición en la cual el grano, que es la parte aprovechable para el proceso, representa aproximadamente el 20 % del volumen total de la fruta, de manera tal que, el procesamiento de beneficio genera 80 % del volumen procesado en calidad de desechos; cada uno en un grado diferente constituye un riesgo para el medio ambiente si no se reutiliza de una manera inteligente para otros propósitos. Aunque la piel del café es prácticamente lignocelulosa y no tiene ningún valor como fertilizante, podría considerarse como una fuente importante de compuestos antioxidantes, sobre todo antocianinas, pero también contiene todos los demás compuestos polifenólicos, como el ácido clorogénico y, por supuesto, cafeína. Esas sustancias pueden combinarse de varias maneras para hacer una serie de aditivos a alimentos que pueden tener interés para la industria del `alimento saludable'.<sup>5,6</sup> Por lo tanto, el objeto de este trabajo consistió en evaluar el contenido de antocianinas en diferentes estados de maduración, con el fin de potencializar la utilización de los desechos del proceso de beneficio como potencial fuente de sustancias antioxidantes.

## MÉTODOS

*Material vegetal:* las semillas en diferentes estados de maduración se recolectaron en el municipio de Fredonia (suroeste del departamento de Antioquia), a 58 km de Medellín y una altitud aproximada de 1 800 m sobre el nivel del mar. El material recogido se clasificó como, verde (C1), pintón (C2), maduro (C3), sobremaduro (C4) y pasilla (C5). Al grano se le realizó el beneficio por el método seco y posteriormente el material se sometió a liofilización.

*Obtención de los extractos:* un gramo (1,0 g) de material liofilizado se maceró y después, se realizaron extracciones sólido líquido empleando como disolvente metanol acidulado con ácido clorhídrico (99:1), por un periodo de 3 h con agitación constante a temperatura ambiente (25 °C) y en ausencia de luz para evitar la descomposición de las antocianinas. Los extractos obtenidos se filtraron y se sometieron a rotoevaporación a sequedad; luego se redisolviaron en 1,0 mL de metanol y se conservaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

*Contenido de antocianinas totales (TAC):* se determinó de acuerdo con el método de diferencial de pH<sup>7</sup> con algunas modificaciones. Brevemente, una alícuota de la muestra (c.a. 1,0 mL) se colocó en un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó el volumen con una solución buffer de pH 1,0 (0,025 M cloruro de potasio). De manera similar otra alícuota de la muestra se colocó en un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó el volumen con una solución *buffer* de pH 4,5 (0,4 M acetato de sodio). Posteriormente, la absorbancia se midió a 510 y 700 nm, después de transcurridos 40 min de reacción para cada una de las soluciones contenidas en los balones. La absorbancia final se calculó con la expresión:

$$\text{Abs} = [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0}] - [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}]$$

y el TAC se halló sobre la base de la ecuación:

$$\text{TAC (mg/L)} = (\text{Abs} \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1\,000) (\varepsilon \times 1)$$

Donde, Abs es la absorbancia, PM el peso molecular (449,2) para la cianidin-3-glucósido, FD, el factor de dilución y  $\varepsilon$ , la constante de absorptividad molar (29,600). El resultado se expresó como mg de cianidin-3-glucósido por litro de solución. Los valores de TAC se normalizaron todos como contenido de cianidin-3-glucósido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

*Ensayo de decoloración del catión radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidrazilo (DPPH):* la capacidad antioxidante de cada fracción en diferentes concentraciones se determinó de acuerdo con la metodología descrita por *Puertas-Mejía* y otros,<sup>8</sup> con algunas modificaciones y se determinó la concentración efectiva (EC<sub>50</sub>) a la cual el 50 % de DPPH fue removido. En resumen, una alícuota (0,080 mL) de cada muestra (con la dilución necesaria) se adicionó a 1,920 mL de una solución etanólica de DPPH (80,5  $\mu$ M). A continuación, se midió la absorbancia a 514 nm y luego cada 30 s los primeros 2 min, después, cada minuto hasta los 5 min, y finalmente en intervalos de 5 min hasta la obtención del estado estacionario en la reacción o una disminución en la absorbancia menor que 10 %. La concentración inicial exacta del DPPH en el medio de reacción se determinó mediante una curva de calibración de soluciones de DPPH (5 a 80  $\mu$ M) medidas a 514 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

*Ensayo de FRAP (ferric reducing/antioxidant power):* se usó el método descrito en *Puertas-Mejía* y otros<sup>9</sup> con algunas modificaciones. Una alícuota (0,10 mL) de cada muestra se adicionó a 0,9 mL de una solución que contenía el reactivo de FRAP (*buffer* de acetato de sodio 0,3  $\mu$ M, pH 3,6; 10  $\mu$ M de tripiridiltriazina (TPTZ) en una solución 40 mM de HCl y 20  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) y la mezcla de reacción se incubó por 30 min a 37 °C. La absorbancia se determinó a 593 nm. La capacidad de las muestras de reducir el ion férrico se calculó a partir de la curva de calibración y la capacidad antioxidante se expresó como miligramos de ácido ascórbico por 100 g de muestra seca. Los análisis se hicieron en cubetas desechables (1 cm x 1 cm x 4,5 cm). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

*Ensayo ORAC (oxygen radical absorbance capacity):* se utilizó la metodología descrita en *Ou* y otros<sup>10</sup> con pequeñas modificaciones. Se emplearon soluciones de fluoresceína 1x10<sup>-2</sup> M en PBS (75 mM), radical AAPH [2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride] 0,6 M en PBS (75 mM). Alícuotas de 50,0  $\mu$ L de extracto previamente diluido (1:1 000) se mezclaron con 2,9 mL de una solución *buffer* pH= 7,4; 30,0  $\mu$ L de solución de fluoresceína y finalmente 50,0  $\mu$ L de solución de radical libre AAPH. Las lecturas se realizaron a  $\alpha$  de excitación de 483 nm, y la toma de datos se realizó a  $\alpha$  de emisión de 515 nm, con un tiempo de reacción de 40 min. Como sustancia de referencia se usó Trolox. El efecto protector del antioxidante se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, la cual se comparó con la curva del Trolox y los datos se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra ( $\mu$ mol Trolox/g muestra), de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{ORAC} = [(\text{AUC} - \text{AUC}^\circ) / (\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}^\circ)] \times F \times \text{Conc}_{\text{Trolox}}$$

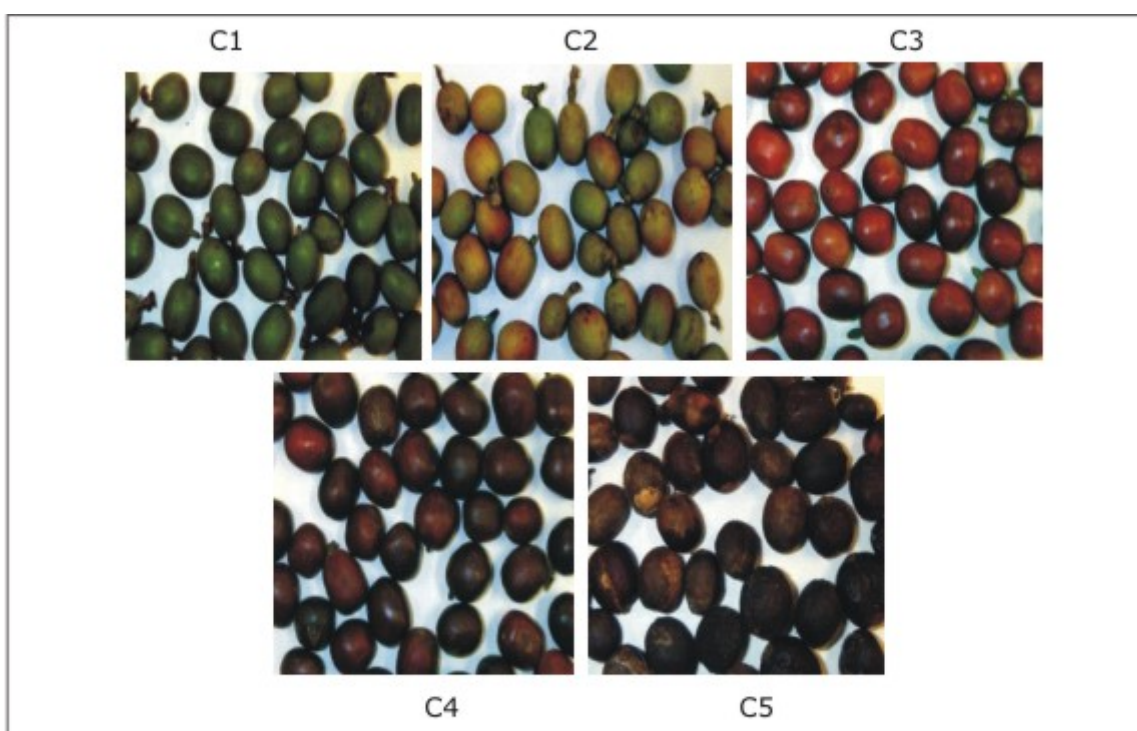
Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC<sup>°</sup> área bajo la curva para el control, AUC<sub>Trolox</sub> área bajo la curva para el Trolox, y *F* es el factor de dilución de los extractos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Todos los experimentos de actividad antioxidante se hicieron en un espectrofotómetro *ThermoSpectronic Genesis 2*.

### Análisis estadístico

Los diferentes valores mostrados en las tablas y figuras corresponden al promedio  $\pm$  las desviaciones estándares de tres mediciones en paralelo.

## RESULTADOS

En la figura se observan los diferentes estados de maduración del material recolectado para el presente estudio. Estos fueron seleccionados de manera manual y de un mismo cultivo.



C1: verde, C2: pintón, C3: maduro, C4: sobremaduro, C5: pasilla.

**Fig.** Granos de café (*Coffee arábica*) durante el proceso de maduración.

La obtención de antocianinas a partir del pericarpio del fruto de café aumentó durante el proceso de maduración, alcanzando un máximo de concentración en el estado sobremaduro y una pérdida de casi 95 % en el estado pasilla (tabla 1). De acuerdo con los resultados, hay buena correlación entre el rendimiento de la extracción y el contenido de antocianinas en todos los extractos de *C. arabica* evaluados, como era de esperarse, porque son los principales responsables de la coloración de la cereza de café y adicionalmente son los indicadores de la calidad de los frutos y también de la frescura de sus productos procesados.

El potencial antioxidante de los diferentes extractos se indica en la tabla 2.

Aunque todos presentaron una excelente capacidad antioxidante, el extracto C2, proveniente de los granos en estado pintón (*semimaduro*) fue el que presentó mayor actividad, seguido del estado *sobremaduro*, disminuyendo esta actividad en los demás extractos. No obstante, todos los extractos mostraron un alto potencial antioxidante comparado con sustancias de reconocidas propiedades antioxidantes como el ácido ascórbico y el BHA.

**Tabla 1.** Determinación del contenido de antocianina por el método de diferencial de pH en frutos de *Coffea arábica* durante el proceso de maduración

Muestra	Rendimiento extracción, %	TAC, mg de cianidin-3-glucósido/L
C1	36,55 ± 0,74	12,88 ± 0,18
C2	53,11 ± 2,88	30,94 ± 0,27
C3	43,97 ± 4,24	39,80 ± 0,23
C4	59,54 ± 8,68	63,14 ± 0,28
C5	15,97 ± 4,43	3,49 ± 0,16

C1: verde, C2: pintón, C3: maduro, C4: sobremaduro; C5: pasilla, TAC: antocianinas totales.

**Tabla 2.** Capacidad antioxidante de los extractos de *Coffea arábica* durante el proceso de maduración

Muestra	EC <sub>50</sub> , kg extracto/mmol DPPH	FRAP, mg ácido ascórbico/g MS	ORAC, μmol trolox/g MS
C1*	0,260 ± 0,01	37,84 ± 4,34	335,78 ± 9,23
C2	0,089 ± 0,00	93,66 ± 1,61	1 581,1 ± 82,3
C3	0,160 ± 0,03	58,03 ± 2,96	340,24 ± 31,5
C4	0,150 ± 0,08	87,81 ± 9,2	795,59 ± 46,8
C5	0,378 ± 0,00	18,74 ± 2,01	290,69 ± 53,4

C1: verde; C2: pintón; C3: maduro; C4: sobremaduro; C5: pasilla, MS: materia seca, FRAP: ferric reducing/antioxidant power, ORAC: oxygen radical absorbance capacity, DPPH: catión radical α-α-difenil-β-picrilhidrazilo.

## DISCUSIÓN

La importancia de identificar y cuantificar los constituyentes con capacidad antioxidante presentes en las matrices vegetales se revierte en un mayor valor agregado a estas cuando se considera su importancia a nivel de la salud y la protección que pueden ofrecer contra diferentes enfermedades, lo cual conduce a un creciente interés de los fabricantes de alimentos y de los consumidores hacia la tendencia por elaborar estos con valores específicos para la salud. Por lo tanto, la capacidad antioxidante se utiliza comúnmente como un buen indicador de la potencialidad de ciertos alimentos a ser consumidos con mayor frecuencia. No obstante, es importante tener en cuenta que para un mismo extracto puede existir o no una correlación directa entre la cantidad de estos componentes funcionales y el método que evalúa la capacidad antioxidante. Esta afirmación se justificaría si se analizan los distintos compuestos fenólicos que pueden existir en un extracto. Por ejemplo, el extracto C2 con una concentración de antocianinas menor comparada con el extracto C4, presentó un mayor efecto antioxidante, lo cual puede ser explicado por la presencia de compuestos diferentes a las antocianinas, como el ácido clorogénico y el ácido cafeico previamente encontrado y estudiado en el café,<sup>2,11,12</sup> que contribuyen a aumentar el potencial antioxidante. Salgado<sup>13</sup> y otros



realizaron un estudio similar en las hojas del café y encontraron un mayor contenido de fenoles en las hojas más jóvenes que en las maduras con fruto ( $174,0 \text{ mg.g}^{-1}$  y  $138,9 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivamente) y sin formación de fruto ( $186,5 \text{ mg.g}^{-1}$  y  $127,6 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivamente). Luego, al comparar los resultados de diferentes extractos por diversos autores, se debe considerar que la eficiencia de los compuestos antioxidantes depende fuertemente de las condiciones de oxidación, del sustrato oxidable presente y del método seleccionado para determinar la capacidad antioxidante.

El desarrollo de esta investigación genera un valor agregado importante sobre un desecho directo originado durante el proceso de beneficio del café, porque el pericarpio se desecha sobre todo para alimentos de animales. Luego, los resultados presuponen una potencial utilización de este subproducto con propiedades antioxidantes, que podría ser apto en el desarrollo de alimentos para consumo humano. Este trabajo es el primer estudio reportado en Colombia conocido hasta ahora por los autores que comprende la valoración de uno de los subproductos de la industria del café como origen de agentes antioxidantes. En conclusión, los frutos de café desechados durante su beneficio podrían ser usados como fuentes alternativas de compuestos funcionales con altas posibilidades de ser empleados como aditivos, bien sea en el incremento del color de los productos (alimentos, cosméticos, etc.) o como antioxidantes en la industria alimentaria, farmacéutica, de aromas y en la medicina tradicional, entre otras.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado en el Grupo de Investigación en Compuestos Funcionales de la Universidad de Antioquia. Todos los experimentos se realizaron bajo las normas y leyes colombianas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Higdon JV, Frei B. Coffee and Health: A review of recent human research. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*. 2006;46(2):101-23.
2. Sisodia S, Bisht S. *Coffee arabica*: A wonder gift to medical science. *J Natural Pharmaceuticals*. 2010;1(1):58-65.
3. Segura-Carretero A, Puertas-Mejía MA, Cortacero-Ramírez S. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis*. 2008;29(13):2852-61.
4. Sun J, Peng H, Su W. Anthocyanins extracted from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) pericarp tissues as potential natural antioxidants. *J Food Biochemistry*. 2011;35(5):1461-7.
5. Orozco AL, Pérez MI, Guevara O. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. *PyGC/MS analysis. J Analytical Applied Pyrolysis*. 2008;81(2):247-52.

6. Pandey A, Soccol CR, Nigam P. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering J.* 2000;6(2):153-62.
7. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC International.* 2005;88(5):1269-78.
8. Puertas MM, Mesa V A, Sáez V J. *In vitro* radical scavenging activity of two Colombian Magnoliaceae. *Naturwissenschaften.* 2005;92(8):381-4.
9. Puertas-Mejía M, Gómez-Chabala L, Rojano B. Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Rev Cubana Plant Med.* 2009;14(2): 1-11.
10. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agricultural Food Chemistry.* 2001;49(10):4619-26.
11. Madhava Naidu M, Sulochanamma G, Sampathu SR. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry.* 2008;107(1):377-84.
12. Ramalakshmi K, Kubra IR, Rao LJM. Physicochemical characteristics of green coffee: Comparison of graded and defective beans. *J Food Science.* 2007;72(5):S333-S7.
13. Salgado PR, Favarin JL, Leandro RA. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Sci Agric (Piracicaba, Braz).* 2008;65(4):354-9.

Recibido: 14 de febrero de 2012.

Aprobado: 19 de junio de 2012.

*Miguel A. Puertas-Mejía.* Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia. Teléf.: +57(4) 219 5653; Fax: +57(4) 219 8612. Correo electrónico: [mpuertas@exactas.udea.edu.co](mailto:mpuertas@exactas.udea.edu.co)