
Explorando las diferencias entre el café Geisha verde y tostado: Identificación de ácidos fenólicos y actividad antioxidante

Abrego González, Kilmara Abrego

Programa de Maestría en Ciencias Químicas con énfasis en Inocuidad Alimentaria, Universidad Autónoma de Chiriquí, Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0001-8385-5917>

Kilmara.abrego@unachi.ac.pa

Vega, Aracelly

Centro de Investigación en Recursos Naturales, Universidad Autónoma de Chiriquí
Chiriquí, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-8587-7439>

aravega@cwpanama.net

Sánchez-Martínez, Hugo Alexis

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0003-3442-797X>

hugo.sanchez02@up.ac.pa

Morales, Abdy

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-4184-2912>

moba245@gmail.com

Morán-Pinzón, Juan Antonio

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-5559-231X>

coljamp@gmail.com

López-Pérez, José Luis

Departamento de Ciencias Farmacéuticas: Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0002-3728-7602>

lopez@usal.es

Santos-Buelga, Celestino

Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Universidad de Salamanca
Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0001-6592-5299>
csb@usal.es

González-Paramás, Ana María

Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Universidad de Salamanca
Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0001-5477-0703>
paramas@usal.es

Del Olmo, Esther

Departamento de Ciencias Farmacéuticas: Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca

Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0002-3965-3290>
olmo@usal.es

Guerrero De León, Estela

Sistema Nacional de Investigación

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas

Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá

Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-0029-1827>
guerrerodleon@gmail.com

ABSTRACT

Due to the fact that the roasting process of coffee can generate changes in its constituents, and therefore in its biological properties, we sought to identify the phenolic acids present in green and roasted Geisha coffee, and at the same time, to evaluate its antioxidant properties. First, the raw material (Geisha coffee beans) was subjected to a “cold extraction” process with 70% ethanol and subsequently the phenolic profile of the ethanolic extracts of green coffee (EEtCG-V) and roasted coffee (EEtCG-T) was determined in a HPLC-MS using 280, 330 and 360 nm. The antioxidant activity was determined in aqueous extracts of green (EACG-V) and roasted (EACG-T) Geisha coffee, obtained through an Italian coffee extraction process, against DPPH and non-enzymatic superoxide anion ($\bullet\text{O}_2^-$) and lipid peroxidation at different concentrations (0,48-1000 mg/mL). The results for EEtCG-V, at 330 nm, indicate the presence of 17 chromatographic peaks corresponding to hydroxycinnamic acid derivatives, similar to those detected in EEtCG-T, with the exception of the appearance

of peaks corresponding to lactones of chlorogenic acids, related to the roasting process. For the results of the antioxidant activity: against the DPPH radical, both for EACG-V and EACG-T it was discrete, compared to $80,4 \pm 1,2\%$ obtained by quercetin; against $\bullet\text{O}_2^-$ it was significant for both extracts between 60 and 70% very similar to the quercetin standard ($75,8 \pm 0,6\%$) and in the lipid peroxidation test, EACG-T was superior ($73,0 \pm 1,7\%$) to EACG-V ($<50\%$), resulting similar to that obtained by our Quercetin standard ($73,7 \pm 2,7\%$). The results presented here are part of the first studies carried out on extracts of green and roasted Geisha coffee.

Keywords: Coffee, Geisha, extract, phytochemical, antioxidant.

Resumen

Debido a que el proceso de tostado del café puede generar cambios en sus constituyentes, y por ende en sus propiedades biológicas, buscamos identificar los ácidos fenólicos presentes en café Geisha verde y tostado, y a su vez, evaluar sus propiedades antioxidantes. Primero, se sometió la materia prima (granos de café Geisha) a un proceso de “extracción en frío” con etanol al 70% y posteriormente el perfil fenólico de los extractos etanólicos del café verde (EEtCG-V) y del café tostado (EEtCG-T) fue determinado en un HPLC-MS utilizando 280, 330 y 360 nm. La actividad antioxidante fue determinada en extractos acuosos de café Geisha verde (EACG-V) y tostado (EACG-T), obtenidos a través de un proceso de extracción en cafetera italiana, frente a los radicales: DPPH, anión superóxido no enzimático ($\bullet\text{O}_2^-$) y peroxidación lipídica a distintas concentraciones (0,48-1000 mg/mL). Los resultados para el EEtCG-V, a 330 nm, indican la presencia de 17 picos cromatográficos correspondientes a derivados de ácidos hidroxicinámicos, similar a los detectados en el EEtCG-T, éste con la excepción de la aparición de los picos correspondientes a lactonas de los ácidos clorogénicos, relacionadas con el proceso de tostado. Para los resultados de la actividad antioxidante: frente al radical DPPH, tanto para el EACG-V y EACG-T fue discreta, en comparación al $80,4 \pm 1,2\%$ obtenido por quercetina; frente al $\bullet\text{O}_2^-$ fue significativa para ambos extractos entre un 60 y 70% muy similar al patrón quercetina ($75,8 \pm 0,6\%$) y en la prueba de peroxidación lipídica, el EACG-T fue superior ($73,0 \pm 1,7\%$) al EACG-V ($<50\%$), resultando similar al obtenido por nuestro patrón de Quercetina ($73,7 \pm 2,7\%$). Los resultados expuestos constituyen una parte de los primeros estudios realizados sobre extractos de café Geisha verde y tostado.

Palabras claves: Café, Geisha, extracto, fitoquímica, antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más populares en el mundo y su consumo aumenta de día en día. Forma parte de numerosos tipos de bebidas debido a su contenido en cafeína y las consiguientes propiedades energizantes y estimulantes [1]. En los últimos años se han hecho estudios exhaustivos para determinar el contenido de sustancias antioxidantes, investigar sus propiedades nutraceuticas [2], y su efecto sobre la prevención de enfermedades, así, hoy en día, se le considera una bebida funcional con propiedades nutraceuticas.

Tanto la cafeína como los ácidos clorogénicos son sustancias que imparten propiedades especiales al café. La cafeína es un estimulante, energizante y vasodilatador, mientras que los ácidos clorogénicos son antioxidantes naturales y protectores potenciales contra enfermedades degenerativas crónicas del ser humano. La relación en miligramos (mg) de ácidos clorogénicos/cafeína determina si un café puede usarse en la industria nutraceutica o no [3]. Cabe señalar que a medida que aumenta la relación de ácidos clorogénicos / cafeína (CGAs/Caf), mayor será la potencialidad de su uso en la industria nutraceutica, por la mayor seguridad que representa para el ser humano.

Se ha reportado que, una taza de café de 100 mL con 10 g de café de especialidad de la variedad Geisha aporta 92,8 mg de cafeína y 394,2 mg de ácidos clorogénicos [4]. En ese mismo estudio, se demuestra que los cafés con mayor contenido de ácidos clorogénicos son de la especie Arábica de altura como el Geisha y el Pacamara y los de más bajo contenido son los de bajura, según el sitio donde son cultivados.

El café Geisha panameño ha sido reconocido internacionalmente por sus altas puntuaciones en catas de cafés de especialidad y por alcanzar altos precios en subastas de café, llegando a ser reconocido como una marca del país [5]. Debido a que el proceso de tostado del café puede generar cambios en sus constituyentes, y por ende en sus propiedades biológicas, nos propusimos identificar los ácidos fenólicos presentes en café Geisha verde y tostado, y a su vez, evaluar sus propiedades antioxidantes.

2. MÉTODO

A. Identificación de ácidos fenólicos

Para determinar los constituyentes fitoquímicos, se sometió 1 g de la materia prima (granos de café Geisha) a un proceso de “extracción en frío” con etanol al 70 % [6] y posteriormente el perfil fenólico de los extractos etanólicos del café verde (EEtCG-V) y del café tostado (EEtCG-T) fue determinado utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a masas (HPLC-MS) utilizando 280, 330 y 360 nm como longitudes de onda preferentes.

B. Actividad captadora del radical DPPH

La determinación del porcentaje de inhibición al radical DPPH, se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Pombal et al. (2017) [7]. En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 100 µL de DPPH 600 µM y 100 µL de los productos a ser evaluados, los cuales fueron previamente disueltos en DMSO obteniendo concentraciones desde 0,48 µg/mL hasta 1000 µg/mL. Incubamos en la oscuridad durante 30 minutos y posteriormente, los datos de densidad óptica (DO) se obtuvieron a 492 nm. Cada evaluación se realizó por triplicado; utilizamos quercetina como sustancia de referencia y el porcentaje de inhibición del radical DPPH fue calculado a través de la siguiente fórmula:

FÓRMULA 1

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{OD DPPH} - \text{OD extracto}}{\text{OD DPPH}} \times 100 \%$$

OD: Densidad óptica

C. Capacidad atrapadora del anión superóxido en un sistema no enzimático

La actividad inhibitoria del anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) por parte de los extractos se evaluó mediante el método descrito por otros autores Pombal et al. (2020) [8]. En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 50 µL de los extractos disueltos en DMSO a diferentes concentraciones (0,48 µg/mL hasta 1000 µg/mL). Posteriormente a cada pocillo se le adicionó 50 µL de PMS (120 µM), 50 µL de NADH (936 µM), y finalmente 50 µL de NBT (300 µM). Utilizamos quercetina como sustancia de referencia y todas las concentraciones fueron ensayadas por triplicado. Una vez preparada la placa se procedió a incubar durante 5 minutos en oscuridad a una temperatura de 25°C. Después de este periodo, las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 560 nm.

Ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica

Para cada 100 µl del homogeneizado de huevo (1:25, v/v en solución PBS, pH 7.4), añadimos 10 µL de extracto y 50 µL FeSO₄ (25 mmol/l) y PBS c.s.p. 300 µl. Incubamos a 37 °C durante 15 minutos, y añadimos 50 µl de ácido tricloroacético al 15% p/v. Centrifugamos la muestra (3,500 rpm x 15 minutos), extraemos 200 µl del sobrenadante y añadimos 100 µl de ácido tiobarbitúrico al 0.8%. Calentamos la mezcla a 95 °C durante 30 minutos. Dejamos enfriar antes de medir la absorbancia de las muestras a 532 nm [9].

3. RESULTADOS

A. Identificación de ácidos fenólicos

Los resultados para el EEtCG-V, a 330 nm, indican la presencia de 17 picos cromatográficos (tabla 1) correspondientes a derivados de ácidos hidroxicinámicos (cis ácido 5-cafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, ácido 3-dicafeoilquínico, entre otros). Los compuestos detectados

en el EEtCG-T fueron similares a los descritos para EEtCG-V, con la excepción de la aparición de los picos correspondientes a lactonas de los ácidos clorogénicos, relacionadas con el proceso de tostado tal como se observa en las figuras 1 y 2.

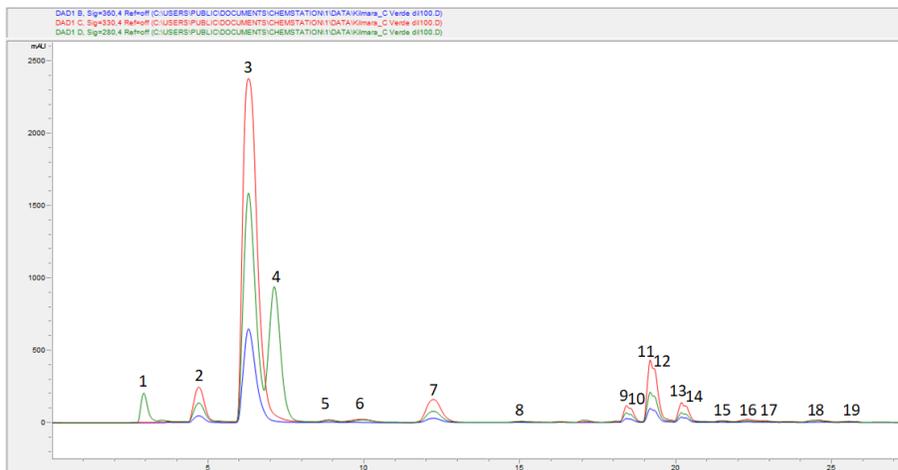


Fig 1. Cromatograma de café verde registrado a 330 nm (rojo), 280 nm (verde) y 360 (azul).

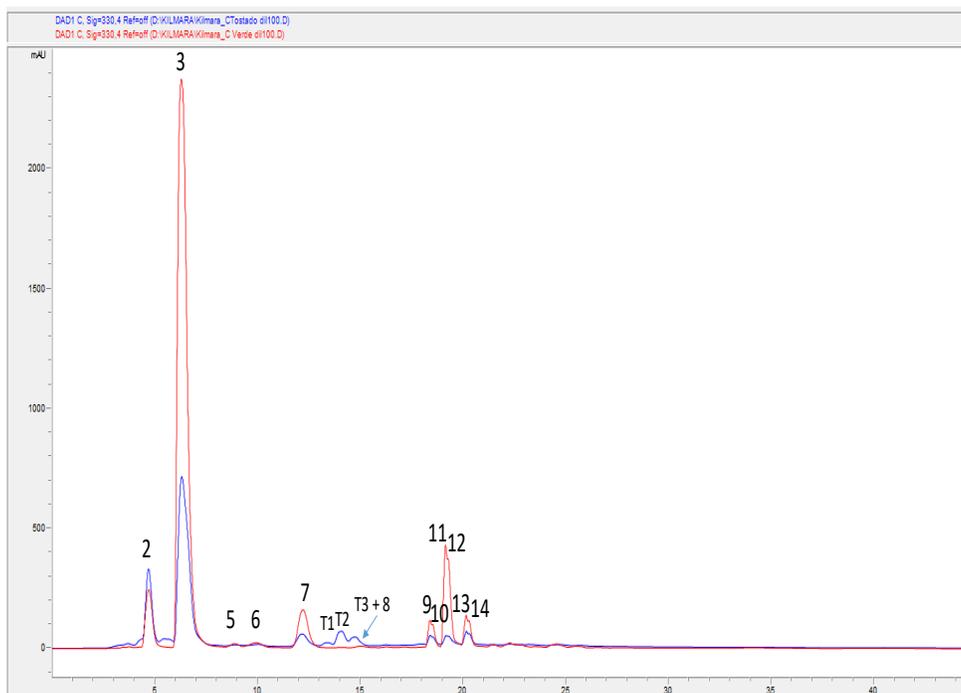


Fig 2. Cromatograma de café verde (rojo) y café tostado (azul) registrado a 330 nm.

Tabla 1. Identificación tentativa de los picos observados en el cromatograma

Tr	Pico	Identificación Tentativa
3	1	quinic acid + Caffeic acid Glucoside (traces)
4.7	2	3-CaffeoylQuinic Acid
6.3	3	5-CaffeoylQuinic Acid
7.1	4	Hydroxybenzoic acid derivative
8.9	5	3-Feruloylquinic acid cis 5-CaffeoylQuinic Acid
9.9	6	5-p Coumaroylquinic Acid
12.2	7	5-Feruloylquinic acid
13.4	T1	caffeoylquinic acid lactone
14	T2	caffeoylquinic acid lactone
14.7	T3	caffeoylquinic acid lactone
15	8	Feruloylquinic acid isomer
18.4	9	3,4-diCaffeoylquinic acid
18.5	10	3,4-diCaffeoylquinic acid isomer
19.2	11	4,5-diCaffeoylquinic acid
19.3	12	3,5-diCaffeoylquinic acid
20.2	13	4,5-diCaffeoylquinic acid isomer
20.3	14	4,5-diCaffeoylquinic acid isomer
21.4	15	4,5-caffeoylferuloylquinic acid
22.3	16	3-Feruloyl-5-caffeoylquinic acid
22.8	17	4,5-caffeoylferuloylquinic acid
24.5	18	Caffeoyl-N-Tryptophan
25.5	19	4,5-dimethoxycinnamoyl-feruloylquinic acids

B. Actividad captadora del radical DPPH

La evaluación frente al radical DPPH resultó en nula actividad antioxidante para el EACG-V, sin embargo, un $25,1 \pm 6.1$ % de inhibición se obtuvo con el EACG-T, frente al $80,4 \pm 1,2$ % desarrollado por el patrón quercetina (tabla 2).

Capacidad atrapadora del anión superóxido en un sistema no enzimático

La actividad inhibitoria del anión superóxido no enzimático fue de $66,8 \pm 2,3$ %, $64,1 \pm 1,8$ % y $75,8 \pm 0,6$ % para el EACG-V, EACG-T y quercetina, respectivamente (tabla 2).

Ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica

Para evaluar la actividad de los extractos sobre TBARS, el EACG-T mostró una capacidad

antioxidante de 73.0 ± 1.7 % a la concentración de $15.6 \mu\text{g/mL}$, similar al obtenido por nuestro producto estándar Quercetina (% de inhibición = 73.7 ± 2.7) a la concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$. Para el EACG-V, la actividad captadora frente al radical (TBARS) fue menor del 50 % en comparación con el efecto generado por nuestro estándar Quercetina (% de inhibición = 73.7 ± 2.7) (tabla 2).

Tabla 2. Valores del efecto inhibitorio máximo (Emax) y de la concentración inhibitoria 50 (CI50) obtenidos con los extractos de Café Geisha ensayados contra los radicales DPPH, $\bullet\text{O}_2^-$ y peroxidación lipídica

Extractos	DPPH		$\bullet\text{O}_2^-$		Peroxidación lipídica	
	Emax (%)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Emax (%)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Emax (%)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Quercetina	$80,4 \pm 1,2$	44,1	$75,8 \pm 0,6$	15,9	$73,7 \pm 2,7$	80,5
EACG-T	$25,1 \pm 6,1$	Nd	$64,1 \pm 1,8$	Nd	$73,0 \pm 1,7$	Nd
EACG-V	$-1,9 \pm 2,7$	14,7	$66,8 \pm 2,3$	Nd	$39,0 \pm 3,4$	1,1

Los datos de Emax se presentan como la media \pm DS para un $n=3$ $\dagger p<0,05$ vs Quercetina. Nd= No determinado.

4.CONCLUSIONES

Los resultados expuestos constituyen una parte de los primeros estudios realizados sobre extractos de café Geisha verde y tostado, que pretenden conocer las características fitoquímicas y actividad antioxidante con el objetivo de enriquecer los estudios de inocuidad alimentaria para este producto, así como explorar el potencial nutracéutico de sus constituyentes.

REFERENCIAS

- [1] Wanyika, H. N., Gatebe, E. G., Gitu, L. M., Ngumba, E. K., & Maritim, C. W. (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food Science*, 4(6), 353–358.
- [2] Perrone, D., Farah, A., & Donangelo, C. M. (2012). Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4265–4275. <https://doi.org/10.1021/jf205388x>
- [3] Babova, O., Occhipinti, A. y Maffei, M.E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin, *Phytochemistry*, 123, 33-39 (2016).
- [4] Vega, A., De León, J. A., Reyes, S. M., & Miranda, S. Y. (2018). Bioactive components of 34 commercial brands of coffee from Panama: Relationship between chlorogenic acids and caffeine. *Informacion Tecnologica*, 29(4), 43–54. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642018000400043>
- [5] Hernández, K. (2021, September 28). El café geisha, un romance en Panamá | La Prensa Panamá. La Prensa, Martes Financiero. <https://www.prensa.com/impresamartes-financiero/el-cafe-geisha-un-romance-en-panama/>

- [6] Affonso, R. C. L., Voytena, A. P. L., Fanan, S., Pitz, H., Coelho, D. S., Horstmann, A. L., Pereira, A., Uarrota, V. G., Hillmann, M. C., Varela, L. A. C., Ribeiro-Do-Valle, R. M., & Maraschin, M. (2016). Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1923754>
- [7] S. Pombal, Y. Hernández, D. Diez, E. Mondolis, A. Mero, J. Morán-Pinzón, E. I. Guerrero, J. M. Rodilla, "Antioxidant Activity of Carvone and Derivatives against Superoxide Ion," *Nat Prod Commun.*, vol. 12, no. 5, pp. 653-655, May 2017
- [8] Pombal, S., M. Roncero, A., E. Tobal, I., García, N., Silva, L., Diez, D., Mondolis, E., Mero, A., Morán-Pinzón, J., Guerrero, E. I., & Rodilla, J. M. (2020). Antioxidant Activity of New Carvone Derivatives. *Natural Product Communications*, 15(2). <https://doi.org/10.1177/1934578X20908081>
- [9] Y. Zhao, J. Dou, T. Wu, H. A. Aisa, "Investigating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceum*," *Molecules*, vol. 8, no. 1, pp. 951–962, January 2013.

AUTORIZACIÓN Y LICENCIA CC

Los autores autorizan a APANAC XIX a publicar el artículo en las actas de la conferencia en Acceso Abierto (Open Access) en diversos formatos digitales (PDF, HTML, EPUB) e integrarlos en diversas plataformas online como repositorios y bases de datos bajo la licencia CC:

Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

Ni APANAC XIX ni los editores son responsables ni del contenido ni de las implicaciones de lo expresado en el artículo.