

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio Politécnico**

**Estudio de la actividad antioxidante de los extractos de  
melanoidinas - polifenoles del café (*Coffea sp.*) ecuatoriano a través  
de los métodos: Método ABTS (\*) y Método FRAP (\*\*)**

**\* (2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)**

**\*\* (Capacidad reductora del hierro)**

**Diana Lizeth Guevara Rosero**

**Bárbara Yamila Álvarez, D.Sc., Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería  
de Alimentos

Quito, noviembre 2012

**Universidad San Francisco de Quito**  
**Colegio Politécnico**

**HOJA DE APROBACIÓN TESIS**

**Estudio de la actividad antioxidante de los extractos de  
melanoidinas - polifenoles del café (*Coffea sp.*) ecuatoriano a través  
de los métodos: Método ABTS (\*) y Método FRAP (\*\*)**

**\* (2.2'-azobis-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)**

**\*\* (Capacidad reductora del hierro)**

**Diana Lizeth Guevara Rosero**

Bárbara Yamila Álvarez, D.Sc.  
Director de la Tesis .....

Lucía Ramírez, Ph.D.  
Codirector de Tesis .....

Javier Garrido, M.Sc  
Miembro del Comité de Tesis .....

Stalin Santacruz, Ph.D  
Miembro del Comité de Tesis .....

Mario Caviedes, Ph.D  
Miembro del Comité de Tesis .....

Santiago Gangotena, Ph.D  
Decano del Colegio Politécnico .....

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----

Nombre: Diana Lizeth Guevara Rosero

C. I.: 1721403705

Fecha: 23 noviembre 2012

**DEDICATORIA**

*A Dios por darme salud y vida para  
alcanzar este primer logro profesional.*

*A mis amados padres por guiarme  
en todos estos años de estudios con  
sus consejos, afecto y cariño  
incondicional.*

*A mi querida hermana por ser la alegría  
de mi corazón y por su apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue posible gracias a la colaboración de José Ángel Rufián Henares, PH,D. Investigador de la Universidad de Granada, España, quién con su gran experiencia me supo guiar durante todo el desarrollo de esta investigación. Además de facilitarme los reactivos necesarios para llevar a cabo esta tesis.

Otras personas que colaboraron en la elaboración de este trabajo fueron la Dra. Susana Espín y a la Ing. Beatriz Brito, del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Estación Santa Catalina. Departamento de Nutrición y Calidad. Quienes permitieron el uso de los equipos necesarios para el proceso de extracción de las melanoidinas -polifenoles del café.

Agradezco también a la Ing. Diana Farfán y al Ing. Luis Duicela, del Consejo Cafetalero Nacional, COFENAC, por facilitarme las muestras de café ecuatoriano y ayudarme en el proceso de tostado.

Por su valiosa colaboración agradezco también, al Dr. Manuel Baldeón y la Ing. Stephany Santander, por asistirme en llevar a cabo los métodos de análisis, ABTS y FRAP y permitirme usar los equipos y materiales necesarios de las instalaciones del Hospital de los Valles y del Laboratorio de Entomología Médica de la USFQ.

Agradezco también a los profesores de la Universidad San Francisco de Quito: Bárbara Yamila Álvarez, MSc; Lucía Ramírez, PhD; Mario Caviedes, PhD; Javier Garrido, MSc y Stalin Santacruz, PhD; por su ayuda en la revisión de los resultados de esta investigación.

A todos ustedes muchas gracias por su apoyo.

## RESUMEN

Se analizó la actividad antioxidante (AAO) de los extractos de melanoidinas – polifenoles del café ecuatoriano, a través de los métodos: captura de radicales (ABTS) y capacidad reductora del hierro (FRAP); la cuantificación de polifenoles totales fue determinada por colorimetría aplicando el Método Folin-Ciocalteu. Las melanoidinas - polifenoles fueron obtenidos mediante un proceso de ultrafiltración de una bebida preparada en base a la concentración de café que consumen los ecuatorianos (50g/L). Las bebidas se elaboraron a partir de dos especies de café: *C. canephora* (Robusta) y *C. arabica* (Arabica) con diferentes grados de tostado (ligero y medio), obteniéndose los tratamientos: Robusta Ligero (RL), Robusta Medio (RM), Arabica Ligero (AL) y Arabica Medio (AM).

Se aplicó un Diseño completamente al azar con arreglo factorial de  $2^2$ , usando el programa SPSS.17.0. Se analizaron tres variables de respuesta: porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse, capacidad antioxidante determinada por los métodos: ABTS y FRAP; y cuantificación de polifenoles totales de los tratamientos.

El rango de actividad antioxidante para los cuatro tratamientos, determinado por el Método ABTS, estuvo entre 745.24 y 947.39 $\mu\text{molTE/g}$  de muestra; mientras que con el Método FRAP fue entre 675.70 y 952.26 $\mu\text{molTE/g}$  de muestra. El tratamiento RL, presentó la máxima actividad antioxidante. La actividad antioxidante de las melanoidinas - polifenoles disminuyó progresivamente cuando el grado de tostado cambió de Ligero a Medio.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante, por efecto del grado de tostado, utilizando el método ABTS, mientras que con el método FRAP, la actividad antioxidante varió por efecto de la especie y el grado de tostado.

El porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse fue entre 13.82 – 16.90% para los tratamientos de los cuales RL, RM y AM presentaron porcentajes correspondientes al grado de tostado medio.

El contenido de polifenoles totales determinado en los extractos de melanoidinas - polifenoles, varió entre 86.51 y 106.24mg GAE/g de muestra.

La correlación entre las variables de respuesta (ABTS y FRAP vs cantidad de polifenoles totales, respectivamente), fue baja. Sin embargo, se apreció una tendencia creciente de la actividad antioxidante, al aumentar los polifenoles adheridos a las estructuras de melanoidinas.

Estudios anteriores que usaron diferentes tipos de café (origen, procesado, especie), mostraron valores inferiores de actividad antioxidante con respecto a los resultados obtenidos en este estudio. De esta manera, el consumo de café ecuatoriano, por su actividad antioxidante, podría ser importante en la prevención de varias enfermedades crónicas.

Palabras claves: ABTS, FRAP, Melanoidinas, bebida de café.

## ABSTRACT

Antioxidant activity (AOA) of Ecuadorian coffee melanoidins was analyzed through the methods: Radical scavenging (ABTS) and The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP); quantification of total polyphenols by colorimetry method (Folin-Ciocalteu) was performed. Coffee melanoidins were obtained by ultrafiltration (5kDa) and subsequent diafiltration from a coffee beverage (50g/L). Brews were prepared from green coffee beans toasted at two different degrees (light and medium) and from two coffee species: *C. canephora* (Robusta) and *C. arabica* (Arabica). Thus, 4 treatments (RL, RM, AL, AM) were obtained.

A completely randomized design with a factorial arrangement of  $2^2$  was applied, using the program SPSS.17.0. Three variables were analyzed: percentage weight loss of roasted coffee beans, antioxidant capacity was measured using ABTS and FRAP methods and Total phenolics compounds were measured using the Folin & Ciocalteu for treatments. The range of antioxidant activity determined by the ABTS assay, was between 745.24 and 947.39 $\mu$ molTE/g sample, whereas by FRAP assay was between 629.06 and 919.33 $\mu$ molTE/g sample. The maximum antioxidant activity was determined in the treatment, Robusta Light (RL). Antioxidant activity of melanoidins - polyphenols progressively decreases when the degree of roasting change from light to medium. No significant differences were found in the antioxidant activity, due the degree of roasting, using ABTS method, whereas using FRAP method, the antioxidant activity varies due to the degree of roasting and to the coffee species. The percentage



weight loss of roasted coffee beans was between 13.82 - 16.90%. The treatments RL, RM and AM showed percentages corresponding to the medium degree of toasting.

The total polyphenol content determined in extracts of melanoidins, varied between 86.51 and 106.24mg GAE / g sample.

The correlation between the response variables (ABTS and FRAP vs. amount of total polyphenols, respectively) was low. However, there was a trend of increasing of antioxidant activity when the amount of polyphenols increases, in the structure of melanoidins.

Earlier studies using different types of coffee, show lower values of antioxidant activity than the results obtained in this study. Thus, Ecuadorian coffee consumption, for their antioxidant activity may be important in the prevention of many chronic diseases.

Keywords: ABTS, FRAP, melanoidins, drink coffee.

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general.....	5
Objetivos Específicos.....	5
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Reactivos.....	6
Muestras.....	6
Tostado.....	6
Molienda.....	6
Preparación de la bebida de café.....	6
Extracción de las melanoidinas - polifenoles .....	7
Ensayo ABTS.....	7
Ensayo FRAP.....	8
Contenido de Polifenoles Totales.....	8
Diseño Experimental.....	9
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	10
Porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse.....	10
Capacidad antioxidante.....	11
Método ABTS.....	13
Método FRAP.....	15
Contenido de Polifenoles Totales.....	16
Correlación entre las variables: contenido de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante.....	19
<b>CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	22
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	23
<b>ANEXOS</b> .....	30

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información general y descripción de las especies de café analizadas.....	30
Tabla2. Temperaturas aplicadas durante el tostado de los granos de café.....	30
Tabla 2. Diseño experimental.....	31
Tabla 4. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de pérdida de peso de los granos de café .....	10
Tabla 5. Porcentaje de pérdida de peso de los granos de café.....	11
Tabla 6. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante por ABTS de los tratamientos.....	13
Tabla 7. Actividad Antioxidante determinada por el Método ABTS.....	14
Tabla 8. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante evaluada por FRAP de los tratamientos.....	15
Tabla 9. Actividad antioxidante evaluada por el Método FRAP.....	16
Tabla 10. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de polifenoles totales en los tratamientos.....	18
Tabla 11. Contenido de Polifenoles Totales en los extractos de melanoidinas-polifenoles.....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Formación de las melanoidinas.....	32
Figura 2: Actividad Antioxidante de las melanoidinas - polifenoles determinada por los Métodos ABTS y FRAP.....	12
Figura 3: Contenido de Polifenoles Totales de los extractos de melanoidinas – polifenoles.....	17
Figura 4: Polifenoles Totales vs Actividad Antioxidante por el Método ABTS .....	20
Figura 5: Polifenoles Totales vs Actividad Antioxidante por el Método FRAP.....	20

## INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, según informes del Consejo Cafetalero Nacional, el café se produce en 22 de las 24 provincias del país, lo cual denota la gran importancia socioeconómica del sector. Esta amplia distribución se presenta porque el Ecuador es uno de los países que tiene producción mixta, es decir, cultiva las dos especies de mayor importancia comercial, *C. arabica* (Arabica) y *C. canephora* (Robusta). Aproximadamente de las 220.000 hectáreas cultivadas con ambas especies, el 68% corresponde a *C. arabica* y el 32% a *C. canephora* (COFENAC, 2009).

Un gran número de investigaciones científicas ha reportado un papel importante de los antioxidantes en la prevención de varias enfermedades degenerativas inducidas por el estrés oxidativo y relacionadas con la edad (Aeschbacher et al., 1990; Yen & Tsai, 1993; Pérez et al., 2002; Huang et al., 2005; Butt & Sultan, 2009; Gu et al., 2010; Butt et al., 2011; Verzelloni et al., 2011). Entre estos, los compuestos fenólicos han recibido considerable atención por sus efectos biológicos (Birt et al., 2001; Nardini et al., 2002; Santos, 2008).

Actualmente, otra clase de antioxidantes como las melanoidinas ha sido parte de estas investigaciones (Adams et al., 2005; Pastoriza et al., 2012). Las melanoidinas se convirtieron en un tema de gran interés, pues son productos con actividad antioxidante, formados naturalmente durante el procesado y almacenado de los alimentos (COST, 1998; Delgado, Rufián & Morales, 2005) y debido a su actividad antioxidante (Bedinghaus & Ockerman, 1995; Borrelli et al., 2002; Lindenmeier et al.,

2002; Delgado & Morales, 2005; Morales, Fernández & Jiménez, 2005; Gniechwitz et al., 2008).

Las melanoidinas son productos complejos que se forman al final de la Reacción de Maillard (Figura 1, Anexos), originada durante el proceso de tostado de los granos de café (Miranda et al., 2007). Químicamente, se definen como sustancias nitrogenadas (Borrelli et al., 2002), solubles en agua (Cammerer et al., 2002), y de alto peso molecular (Gniechwitz et al., 2008; Bekedam et al., 2006). Las melanoidinas están presentes en varios alimentos como la cerveza, pan, cereales para el desayuno, malta tostada, pasta de tomate, café entre otros.

Algunos efectos fisiológicos han sido probados en la bebida de café; entre estos, su actividad antioxidante, atribuida generalmente a los productos de la reacción de Maillard (PRM) formados durante el tostado (Oosterveld et al., 2003), además de ciertos compuestos fenólicos naturales (ácido clorogénico (CGA), ácido caféico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico) presentes en los granos verdes de café (Lakenbrink et al., 2000; Chaurin et al., 2002; Morales & Babbel, 2002). El contenido de estos ácidos es alto en el café verde, pero después del calentamiento térmico aplicado durante el tostado, su concentración disminuye (Gutiérrez, 2002; Cammerer & Kroh, 2006; Hecimovic et al., 2011). Por otro lado, PRM, principalmente las melanoidinas, se aumentan en este paso y son los compuestos que predominan en el mantenimiento de la actividad antioxidante del café (Delgado, Rufián & Morales, 2005; Delgado & Morales, 2005).

Algunos autores han confirmado que este efecto se debe a la capacidad de las melanoidinas de romper la cadena de los radicales por donación de un hidrógeno

(Yen & Hsieh, 1995; Morales & Jiménez, 2004), su afectividad como agentes quelantes de metales (Homma & Murata, 1995; Torres et al., 2000), su capacidad para reducir hidropéroxido a productos no radicales, o captación de radicales hidroxilo (Morales, 2005).

La composición química de las bebidas de café está fuertemente influenciada por la composición de los granos verdes de café, el proceso de tostado y las condiciones de extracción (Illy & Viani, 1995; Bekedam et al., 2006).

La capacidad antioxidante de las bebidas del café ha sido evaluada, usando diferentes métodos (Daglia et al., 2000; Richelle et al., 2001; Del Castillo et al., 2002; Natella et al., 2002; Pellegrini et al., 2003; Daglia et al., 2004). Entre ellos se destacan el Método ABTS y el Método FRAP. El Método ABTS es un método de decoloración que mide la capacidad de los antioxidantes para reaccionar directamente con los radicales cationes  $ABTS^+$  generados por un método químico. El  $ABTS^+$  es un radical de nitrógeno de color azul-verde, que cuando se reduce por los antioxidantes a su forma no radical (ABTS) se vuelve incoloro. El método cuantifica la capacidad antioxidante midiendo la absorbancia de la reacción antioxidante - radicales a 645, 680, 734, 815 y 820nm, en un tiempo aproximado de 20 min, usando un espectrofotómetro. Los resultados se expresan generalmente en relación con un estándar, comúnmente Trolox (ácido-6-hidroxi- 2,5,7,8 tetrametilcromano-2- carboxílico) (Re et al., 1999; Yu, 2008).

El Método FRAP, evalúa la capacidad antioxidante de la muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico ( $Fe^{+3}$ ) presente en un complejo con la 2,4,6-(tri-(2-piridil)-s-triazina) (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ). De este modo se

genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra, que puede cuantificarse por colorimetría en base a un patrón Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico). La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra (Benzie & Strain, 1996).

Adicionalmente, para cuantificar los polifenoles totales de los extractos de melanoidinas - polifenoles, el método más empleado es el espectofotométrico desarrollado por Folin Ciocalteu, basado en el carácter reductor. Utiliza como reactivo una mezcla de ácidos: fosfo wolfrámico y fosfo molibdíco 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 formado se mide a 760nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de muestra (Singleton & Rossi, 1965).



## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante de extractos de melanoidinas - polifenoles de dos variedades de café (*C. canephora* - Robusta y *C. arabica* - Arabica), mediante el análisis de los métodos complementarios ABTS y FRAP.

### Objetivos Específicos

- Implementar el método FRAP, como un método de evaluación antioxidante.
- Estudiar la influencia del proceso de tostado en la actividad antioxidante de los extractos de melanoidinas – polifenoles y en el porcentaje de pérdida de peso de los granos de café durante el tostado.
- Establecer una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante determinada el método ABTS, en los extractos de melanoidinas-polifenoles.
- Establecer una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante determinada el método FRAP, en los extractos de melanoidinas-polifenoles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos.** Persulfato de potasio, ácido-6-hidroxi- 2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) y ácido gálico, Sigma (St.Louis,MO); 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y 2,4,6-(tri-(2-piridil)-s-triazina) (TPTZ), Fluka Chemicals (Madrid, Spain);  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Panreac y Reactivo Folin-Ciocalteu (Grado analítico, Merck)

**Muestras.** Las muestras de café verde en grano de dos especies (*C. canephora* y *C. arabica*) fueron facilitadas por El Consejo Cafetalero Nacional (COFENAC). El lugar de muestreo y las características de las muestras se encuentran descritos en la Tabla 1, Anexos.

**Tostado.** El proceso de tostado se realizó usando el equipo Quantik Lab Sample Roaster TC-150R, durante un tiempo promedio de 9 min. Las temperaturas aplicadas para obtener los diferentes grados de tostado se muestran en la Tabla 2, Anexos. Los grados de tostado fueron determinados según una escala colorimétrica establecida por expertos de COFENAC, que se basa en las exigencias de la industria ecuatoriana. Las muestras fueron tostadas por triplicado.

**Molienda.** Las muestras tostadas se molieron usando un molino Retsch-ZM200, obteniendo un tamaño de partícula de 2mm.

**Preparación de la bebida de café.** Se colocó en una cafetera, 50 gramos de café molido y 1L de agua desmineralizada. La bebida obtenida se almacenó en envases plásticos a 4°C.

**Extracción de melanoidinas-polifenoles a partir de bebidas de café.** Se siguió el procedimiento descrito por Delgado (2005). La bebida de café obtenida (6L) fue sometida a un proceso de ultrafiltración, basado en un sistema de cerámica (membrana de 5kDa, de 19 canales con un diámetro interno de canal de 4mm y cuyo módulo es tubular, su longitud es de 102mm, con un área de filtración de  $0.22\text{m}^2$  y un diámetro interno de 45mm). Posteriormente, se realizó la diafiltración, inyectando aproximadamente 9L de agua desionizada a temperatura ambiente con el propósito de concentrar las melanoidinas hasta que el filtrado aparezca sin el color marrón característico del café. Se recogió aproximadamente 1L del retenido (fracción correspondiente a los compuestos de alto peso molecular conocidos como melanoidinas), el cual se llevó a congelación ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 h. Finalmente el retenido fue liofilizado y almacenado en un desecador hasta realizar el análisis de actividad antioxidante.

### **Método Antioxidante.**

(1) Método ABTS. Se realizó en base a los estudios de Re et al. (1999) y de Rufián y Delgado (2009), con ligeras modificaciones. El radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  se generó mediante la reacción de la solución stock ABTS (7mM) con la solución de persulfato de potasio (2.45mM), dejando la mezcla en la obscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes de usarla. La solución diaria de trabajo de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  fue diluida con una mezcla de etanol: agua (50:50) hasta llegar a una absorbancia de  $1.0 \pm 0.02$  a 680nm; esto es 2400 $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  concentrado con 20mL de etanol: agua.

Se usaron microplacas de 96 pocillos, en los cuales se colocó 50 $\mu\text{L}$  de muestra o del estándar Trolox con 200 $\mu\text{L}$  de la solución diluida de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Se leyó la absorbancia

de las muestras después de 20 min, a través de un lector de microplacas Elisa (MRX Revelation), a una longitud de onda de 680nm. Se prepararon soluciones acuosas de Trolox (0–0.35mM) para realizar la curva de calibración (Pastoriza et al., 2011). Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por g de muestra, siendo la media de tres repeticiones.

(2) Método FRAP. La evaluación del poder reductor de las muestras se realizó según Benzie (1996), con las siguientes modificaciones. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos, mezclándose 200 $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP con 50 $\mu\text{L}$  de muestra. El reactivo FRAP contiene 2.5mL de una solución TPTZ (10mM), más 2.5mL de la solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20mM) y 25mL de buffer acetato, pH 3.6 (0.3M). Las absorbancias de las muestras se leyeron después de 20 min a través de un lector de microplacas Elisa, a una longitud de onda de 570nm. Se prepararon diferentes concentraciones de soluciones Trolox (0–0.35mM) para realizar la curva de calibración. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por g de muestra, siendo la media de tres repeticiones.

**Contenido de polifenoles totales.** Según Singleton & Rossi (1965), el contenido de polifenoles se determinó por medio del método colorimétrico Folin Ciocalteu, con ciertas modificaciones.

Solución de melanoidinas-polifenoles: Se pesó 1g del extracto liofilizado y se diluyó en 75mL de metanol al 70% y se agitó.

En un tubo de reacción se agregaron: 1mL de solución metanólica de melanoidinas, 6mL de agua y 1mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Se calentó a 40°C por 2 min y luego se dejó en reposo durante 8 minutos. Posteriormente se adicionaron 2mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

al 20% y se calentó a 40°C por 2 min. Después de una hora en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760nm. Se usaron soluciones de ácido gálico entre 0-400ppm, para construir la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra, siendo la media de dos repeticiones. Este análisis fue realizado con la colaboración del INIAP.

**Diseño Experimental.** Se aplicó un Diseño Completamente al azar con arreglo factorial  $2^2$  correspondiente a la combinación de dos factores (Especie de café y Grado de tostado), con dos niveles cada uno (Tabla 3, Anexos).

Las variables de respuesta evaluadas fueron: Capacidad antioxidante determinada por los métodos ABTS y FRAP; cuantificación de polifenoles totales y determinación del porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse. Los datos fueron analizados en el programa SPSS.17.0 mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y las medias fueron evaluadas por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Porcentaje de pérdida de peso de los granos de café.

El resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse para los tratamientos, se muestra en la Tabla 4.

*Tabla 4. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de pérdida de peso de los granos de café.*

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada (5%)
<b>Total</b>	11	19,64			
<b>Tratamientos</b>	3	16,74	5,579	15,392*	4,07
<b>Especie (A)</b>	1	4,51	4,508	12,435*	5,32
<b>Grado de tostado (B)</b>	1	10,26	10,261	28,307*	5,32
<b>Interacción A x B</b>	1	1,97	1,970	5,434*	5,32
<b>Error Experimental</b>	8	2,90	0,362		
*Significativo al 5% de error para la prueba F; <sup>ns</sup> No significativo al 5% de error para la prueba F; CV = 3.79%					

En la Tabla 4, se observa que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos al analizar el porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse, aplicando un  $\alpha = 0.05$ . Se observó también, que el porcentaje de pérdida de peso de los granos de café varió por efecto de la especie de café y por efecto del grado de tostado. Hubo interacción entre el grado de tostado y la especie, lo que quiere decir que la interacción entre los dos factores influyó en la variación del porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse. Por otro lado, el coeficiente de variación (3.79%), indica que hubo poca dispersión de los datos obtenidos con respecto a la media, es decir hubo una alta precisión al analizar la actividad antioxidante. Este porcentaje se encuentra dentro de los rangos permitidos para análisis de laboratorio (5%).

En la Tabla 5, se muestran los valores obtenidos al analizar el porcentaje de pérdida de peso de los granos de café durante el tostado.

**Tabla 5. Porcentaje de pérdida de peso de los granos de café.**

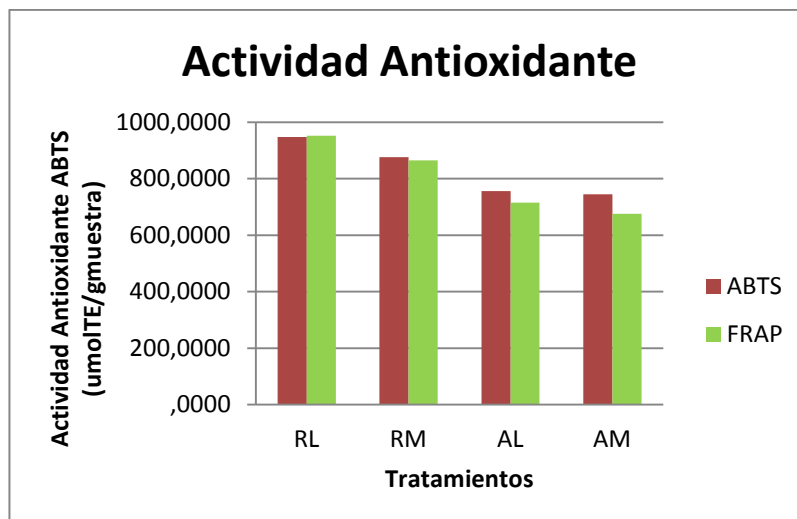
<b>Tratamiento</b>	<b>% pérdida de peso</b> <sup>1)</sup>
Robusta Ligero (RL)	15.86 b
Robusta Medio (RM)	16.90 b
Arabica Ligero (AL)	13.83 a
Arabica Medio (AM)	16.49 b
<sup>1)</sup> Rangos de significancia Medidas seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey	

La Tabla 5, indica que los porcentajes de pérdida de peso para los tratamientos RL (15.86%), RM (16.90%) y AM (16.49%) fueron estadísticamente iguales.

Según Delgado (2005), los valores establecidos en su investigación fueron: Para Ligero, 14.5%, para Medio, 16.2% y para Fuerte, 18.9%. Por tanto, al comparar los valores obtenidos en esta investigación con los de Delgado (2005), se observó que los valores calculados para los tratamientos RL, RM y AM corresponden únicamente al grado de tostado medio. Esto se debió probablemente al diferente tamaño de los granos de café de cada especie, pues *C. canephora* generalmente presenta granos de menor tamaño (5 - 6mm) que los granos correspondientes a la especie *C. arabica* (6 - 8mm) (COFENAC, 2009).

### **Capacidad Antioxidante.**

La Figura 2, presenta la actividad antioxidante de las melanoidinas - polifenoles determinada a través de los Métodos ABTS y FRAP.



**Figura 2: Actividad Antioxidante de los tratamientos determinada por los métodos ABTS y FRAP**

Se observan valores más altos para la actividad antioxidante analizada por el Método ABTS que para el Método FRAP en la mayoría de los tratamientos (RM, AL Y AM), lo que probablemente indica que los extractos de melanoidinas - polifenoles presentan mayor capacidad para captar radicales libres, que capacidad para reducir al hierro. Sin embargo, los medios de reacción de los dos métodos son tan distintos (especialmente, el pH del FRAP, que es muy ácido), que pueden hacer que la reactividad no sea similar y los métodos no sean 100% comparables.

Además, se pudo observar que la actividad antioxidante analizada por los dos métodos, ABTS y FRAP, mostró valores mayores para la especie *C. canephora* que para *C. arabica*, lo cual concuerda con muchos estudios realizados (Pellegrini et al., 2003; Daglia et al., 2004; Moreira et al., 2005). Esto se debe principalmente a la diferente composición química de las especies en cuanto, a la cantidad de ácidos fenólicos presentes en los granos tostados de café. De igual manera, se observó que la actividad antioxidante disminuyó al aumentar el grado de tostado de ligero a



medio en las dos especies. Este resultado guarda relación con la descomposición de los compuestos fenólicos presentes en las estructuras de la melanoidinas, confirmándose por varias investigaciones realizadas (Daglia et al., 2000; Chaurin et al., 2002; Del Castillo et al., 2002; Daglia et al., 2004; Delgado, Rufián y Morales, 2005).

### Método ABTS:

El resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante determinada por el método ABTS para los tratamientos, se muestra en la Tabla 6.

*Tabla 6. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante por ABTS de los tratamientos.*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabular (5%)
<b>Total</b>	11	90147.219			
<b>Tratamientos</b>	3	85759.504	28586.501	52.121 *	4.07
<b>Especie (A)</b>	1	78060.180	78060.180	142.325 *	5.32
<b>Grado de tostado (B)</b>	1	2693.672	2693.672	4.911 <sup>ns</sup>	5.32
<b>Interacción A x B</b>	1	5005.652	5005.652	9.127 *	5.32
<b>Error Experimental</b>	8	4387.714	548.464		
*Significativo al 5% de error para la prueba F; <sup>ns</sup> No significativo al 5% de error para la prueba F; CV = 2.82%					

En la Tabla 6, se observa que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos al analizar la actividad antioxidante de las melanoidinas - polifenoles por el Método ABTS. Se observó también, que la actividad antioxidante evaluada por este método varió por efecto de la especie de café y no varió por efecto del grado de tostado. Estos resultados también se presentaron en varios estudios (Morales & Jiménez, 2004; Delgado, Rufián y Morales, 2005; Delgado y Morales, 2005). Sin embargo, hubo interacción entre el grado de tostado y la especie, lo que quiere decir

que la interacción entre los dos factores influyó en la variación de la actividad antioxidante evaluada por el Método ABTS. No se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante por efecto del grado de tostado, debido en primer lugar, a la poca variabilidad de tiempo y temperatura empleados para designar el grado de tostado (Ligero y Medio). En segundo lugar, a la falta de equipos (tostadores con colorímetros incorporados) que permitan establecer grados de tostado estandarizados. En tercer lugar, a la sensibilidad de las escalas colorimétricas establecidas por las industrias ecuatorianas cafetaleras para designar los diferentes grados de tostado, pues generalmente se ven afectadas por la subjetividad del experto para establecer visualmente el grado de tostado deseado. Por otro lado, el coeficiente de variación (2.82%), indica que hubo poca dispersión de los datos obtenidos con respecto a la media, es decir hubo una alta precisión al analizar la actividad antioxidante. Este porcentaje se encuentra dentro de los rangos permitidos para análisis de laboratorio (5%).

En la Tabla 7, se muestran los valores obtenidos al analizar la actividad antioxidante por el Método ABTS de los tratamientos.

**Tabla 7. Actividad antioxidante determinada por el Método ABTS.**

Tratamiento	Actividad antioxidante* 1)
RL	947.39 a
RM	876.58 b
AL	756.12 c
AM	745.24 c
1) Medidas seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey *unidades: $\mu\text{moles TE/g muestra}$	

Se observó que los tratamientos AL y AM presentaron los menores valores de actividad antioxidante y fueron estadísticamente iguales y diferentes al resto de tratamientos. El mejor tratamiento fue RL, por su alto valor de actividad antioxidante (947.39  $\mu$ molesTE/g muestra) y fue diferente estadísticamente al resto de tratamientos.

### Método FRAP:

El Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante determinada por el método FRAP para los tratamientos, se muestra en la Tabla 8.

*Tabla 8. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante evaluada por FRAP de los tratamientos.*

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada (5%)
<b>Total</b>	11	151005.795			
<b>Tratamientos</b>	3	150278.563	50092.8543	551.052*	4.07
<b>Especie (A)</b>	1	136571.13	136571.13	1502.365*	5.32
<b>Grado de tostado (B)</b>	1	1725.4534	1725.4534	18.981*	5.32
<b>Interacción A x B</b>	1	11981.98	11981.98	131.809*	5.32
<b>Error Experimental</b>	8	727.232546	90.9040683		
*Significativo al 5% de error para la prueba F; <sup>ns</sup> No significativo al 5% de error para la prueba F; CV = 1.16%					

En la Tabla 8, se observa que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos al analizar la actividad antioxidante de las melanoidinas - polifenoles por el Método FRAP. Se observó también, que la actividad antioxidante evaluada por este método varió por efecto de la especie de café y por efecto del grado de tostado. Hubo interacción entre el grado de tostado y la especie, es decir la interacción de estos factores influyó en la actividad antioxidante medida por el Método FRAP en los tratamientos. Por otro lado, el coeficiente de variación (1,16%), indica que hubo poca

dispersión de los datos obtenidos con respecto a la media, es decir hubo una alta precisión al analizar la actividad antioxidante. Este porcentaje se encuentra dentro de los rangos permitidos para análisis de laboratorio (5%).

Los valores de actividad antioxidante evaluada por el Método FRAP para los cuatro tratamientos se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Actividad antioxidante evaluada por el Método FRAP de los tratamientos.**

Tratamientos	Actividad antioxidante* 1)
RL	952.26 a
RM	865.08 b
AL	714.92 d
AM	675.70 c
1) Medidas seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey *unidades: umolesTE/g muestra	

En la Tabla 9, de acuerdo con la prueba de significación Tukey con un  $\alpha = 0.05$ , se observa que todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente y que el tratamiento RL, presentó mayor actividad antioxidante respecto de los demás tratamientos.

### **Contenido de Polifenoles Totales (Por el Método: Folin Ciocalteu)**

En la Figura 3, se muestra el contenido de Polifenoles Totales determinado por el Método Folin Ciocalteu de los extractos de melanoidinas – polifenoles.

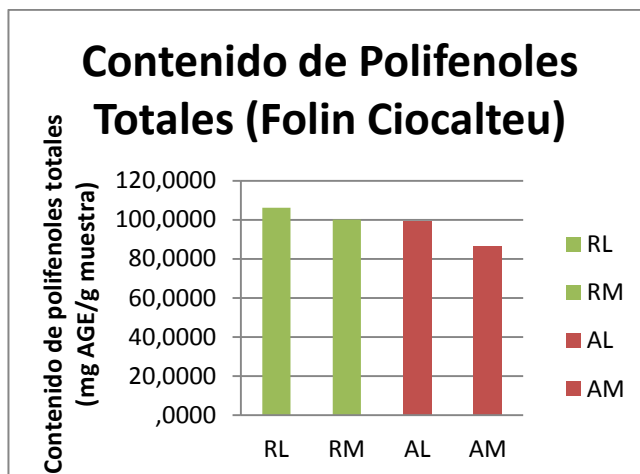


Figura 3: Contenido de Polifenoles Totales de los extractos de melanoidinas

Se observaron valores de polifenoles totales más altos para la especie *C. canephora* (100.17 - 106.24mg AGE/g muestra) con respecto a *C. arabica* (86.41-99.07mg AGE/g muestra). Estos resultados guardan la misma tendencia con el estudio reportado por Bradbury y Halliday (1990), en donde los granos tostados de café de la especie *C. canephora* contienen alrededor de 3.9 - 4.6% de ACG (Ácido Clorogénico, principal componente de los polifenoles totales) y los de la especie *C. arabica* poseen 1.2 - 2,3% de ACG, observándose mayor contenido de polifenoles para la especie *C. canephora*. El contenido de polifenoles depende de la composición química del grano de café de cada especie, la ubicación del cultivo, la altitud, la fertilidad del suelo, las condiciones atmosféricas, el grado de maduración, las condiciones de almacenamiento y el procesamiento del grano. En cuanto al grado de tostado, se observó que el grado de tostado ligero presentó mayor contenido de polifenoles, que el grado de tostado medio. Esto se debe a que los polifenoles son compuestos termolábiles que se descomponen a una temperatura de 80°C (Hecimovic et al., 2011).

El Resumen del Análisis de varianza del contenido polifenoles totales de los tratamientos, se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10. Resumen del Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de polifenoles totales en los tratamientos.**

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada (5%)
<b>Total</b>	7	421.716			
<b>Tratamientos</b>	3	411.474	137.158	53.571*	5.41
<b>Especie (A)</b>	1	218.436	218.436	85.317 *	6.61
<b>Grado de tostado (B)</b>	1	172.395	172.395	67.334 *	6.61
<b>Interacción A x B</b>	1	20.644	20.644	8.063 *	6.61
<b>Error Experimental</b>	4	10.241	2.560		
*Significativo al 5% de error para la prueba F; <sup>ns</sup> No significativo al 5% de error para la prueba F; CV = 1.63%					

En la Tabla 10, se observa que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos al analizar la cantidad de polifenoles totales de las melanoidinas - polifenoles. Se observa también, que la cantidad de polifenoles varió por efecto de la especie de café y por efecto del grado de tostado. Hubo interacción entre el grado de tostado y la especie, influyendo también la interacción entre estos dos factores en la actividad antioxidante. Por otro lado, el coeficiente de variación (1,63%), indica que hubo poca dispersión de los datos obtenidos con respecto a la media, es decir hubo una alta precisión al analizar la actividad antioxidante. Este porcentaje se encuentra dentro de los rangos permitidos para análisis de laboratorio (5%).

El contenido de los polifenoles totales en en los extractos de melanoidinas-polifenoles se presenta en la Tabla 11.

**Tabla 11. Contenido de Polifenoles Totales en los extractos de melanoidinas – polifenoles.**

Tratamientos	Polifenoles Totales (mg GAE/g muestra) <sup>1)</sup>
RL	106.24 a
RM	100.17 a,b
AL	99.07 b
AM	86.51 c
<sup>1)</sup> Rangos de significancia Medidas seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey	

La Tabla 11, indica que los tratamientos RL y RM presentaron un contenido de polifenoles mayor y estadísticamente diferente al resto de tratamientos según la prueba significación Tukey con un  $\alpha = 0.05$ .

#### **Correlación entre las variables: contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.**

Al correlacionar las variables: Actividad antioxidante determinada por el Método ABTS vs la Cantidad de Polifenoles presentes en los extractos de melanoidinas – polifenoles, se obtuvo un coeficiente de correlación de  $r = 0.717^*$ , significativo estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, a pesar de tener un  $r$  significativo, al expresar el grado de asociación entre las variables en porcentaje (51.4%), se observa que tienen una correlación baja.

Al correlacionar la Actividad antioxidante determinada por el Método FRAP vs la Cantidad de Polifenoles, se obtuvo un coeficiente de correlación de  $r = 0.812^*$ , significativo estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). A pesar de tener un  $r$  significativo, al expresar el grado de asociación entre las variables en porcentaje (66.0%), se observa que presentan una correlación baja.

Hubo una alta dispersión de los datos, lo que indica efectivamente que las melanoidinas tienen unidas distintas proporciones de compuestos fenólicos a sus estructuras, que varían en función de la naturaleza del café (tipo, grado de tostado, etc).

En las figuras 4 y 5 se puede observar una tendencia de la actividad antioxidante a crecer mientras aumenta la cantidad de polifenoles totales.

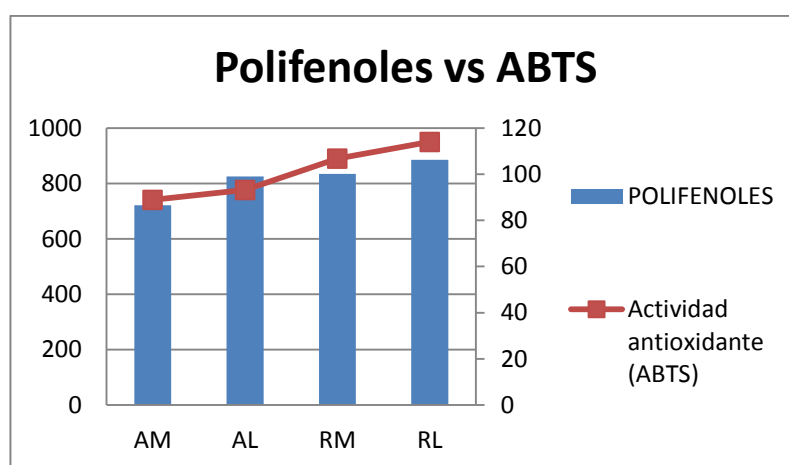


Figura 4: Polifenoles Totales vs Actividad Antioxidante por ABTS

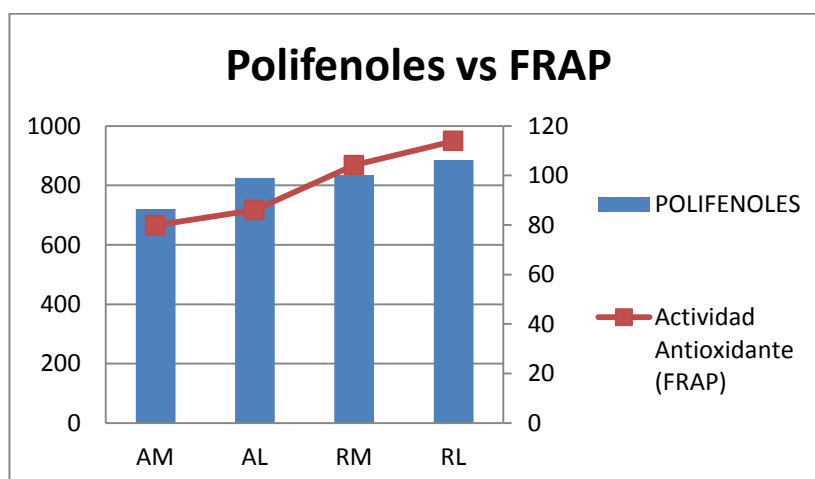


Figura 5: Polifenoles Totales vs Actividad Antioxidante por FRAP



## CONCLUSIONES

El porcentaje de pérdida de peso de los granos de café al tostarse, para los tratamientos RL, RM y AM correspondieron únicamente el grado de tostado medio. Es decir, en la especie Robusta no hubo diferencia entre los grados de tostado ligero y medio. Por el contrario, en la especie Arabica si hubo diferencia.

Los valores de actividad antioxidante determinados mediante el Método ABTS son superiores, con respecto al Método FRAP en los tratamientos RM, AL y AM.

A través de los métodos de análisis (ABTS, FRAP y Folin Ciocalteu), se determinó que el tratamiento RL presenta una actividad antioxidante y un contenido de polifenoles superior con respecto a los otros tratamientos evaluados.

La actividad antioxidante determinada por los Métodos ABTS y FRAP de los extractos de las melanoidinas – polifenoles, disminuye al aumentar el grado de tostado de Ligero a Medio.

La actividad antioxidante de los extractos de melanoidinas – polifenoles, no se debe sólo a las melanoidinas sino también a la presencia de compuestos fenólicos que se adhieren durante el tostado a sus estructuras.

El consumo de las melanoidinas del café ecuatoriano es una fuente de antioxidantes que podría combatir el estrés oxidativo y las enfermedades degenerativas relacionadas con la edad.

## RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad citotóxica y toxicológica de las melanoidinas.

Realizar una purificación de los extractos de melanoidinas.

Analizar la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS y FRAP, de grados de tostado superiores (Fuerte y Extra Fuerte) de café ecuatoriano.

Desarrollar más investigaciones con el fin de conocer de una mejor manera la estructura de las melanoidinas, para así tener un mejor entendimiento sobre el mecanismo de su actividad antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA

Adams, A., Cinzia Borrelli, R., Fogliano, V., & De Kimpe, N. (2005). Thermal Degradation Studies of Food Melanoidins. *Journal of Agric. Food Chem.* , 53, 4136-4142.

Aeschbacher, H. U., Finot, P. A., Hurrel, R. F., & Liardon, R. (1990). *The Maillard reaction in food processing human nutrition and physiology*. Switzerland: Birkhäuser Verlag: Basel.

Bedinghaus, A. J., & Ockerman, H. W. (1995). Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugars and free amino acids in cooked ground pork patties. *J. Food Sci* , 60, 992-995.

Bekedam, E. K., Schols, H. A., van Boekel, M., & Smith, G. (2006). High Molecular weight melanoidins from coffee brew. *J Agric Food Chem* , 54: 7658-7666.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* , 239, 70-76.

Birt, D., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention. Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* , 90:157-77.

Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem*, 50, 6527-6533.

Bradbury, A. G., & Halliday, D. J. (1990). Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *J Agric Food Chem* , 38: 389-92.

Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2011). Coffee and its Consumption: Benefits and risks. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* , 51, 363–373.

Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2009). Green Tea: Nature's defense against malignancies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , 49, 463-473.

Cammerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews . *Eur. Food Res Technol* , 223, 469-474.

Cammerer, B., Jalyschko, W., & Kroh, L. (2002). Intact Carbohydrate Structures as Part of the Melanoidin Skeleton. *J. Agric. Food Chem* , 50, 2083-2087.

Chaurin, P., Ames, J. M., & Del Castillo, M. D. (2002). Antioxidant activity of coffee model systems. *J. Agric Food Chem* , 50, 3751-3756.

Ciori, M. (2002). Antioxidative effect of Maillard reaction products in coffee brew. In V. Fogliano, & T. Henle, *In Melanoidins in Food and Health* (pp. Vol. 3 159-162). Luxemburg: European Communities.

Consejo Cafetalero Nacional. (2009). *Informe Técnico Anual 2009*. Portoviejo: COFENAC.

COST. (1998). *Melanoidins in Food and Health*. Brussels, Belgium: Cost Action 919, European Union.

Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Bertè, F., & Gazzani, G. (2000). In vitro and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J Agric. Food Chem* , 48, 1449-1545.

Daglia, M., Racchi, M., Papetti, A., Lanni, C., Govoni, S., & Gazzani, G. (2004). In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric. Food Chem.* , 52, 1700-1704.

Del Castillo, M. D., Ames, J. M., & Gordon, M. H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews . *J Agric. Food Chem* , 50, 3698-3703.

Delgado - Andrade, C., Rufián Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005 ). Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by different Antioxidant Methods. *J. Agric. Food Chem* , 7832-7836.

Delgado- Andrade, C., & Morales, F. J. (2005). Unraveling the contribution of melanoidins to antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* , 53, 1403-1407.

Gniechwitz, D., Reichardt, N., Ralph, J., Blaut, M., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2008). Isolation and characterisation of a coffee melanoidin fraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 2153–2160.

Gu, F. L., Kim, J. M., Abbas, S., Zhang, X.-M., Xia, S.-Q., & Chen, Z.-X. (2010). Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose. *Food Chem.* , 505–511.

Gutierrez, A. (2002). Café, Antioxidantes y Protección a la salud. *Medisan* , 6, 72-81.

Hecimovic, I., Belcak- Cvitanovic, A., Horzic, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem* , 129/991-1000.

Homma, S., & Murata, M. (1995). Characterization of metal chelating compounds in instant coffee. *Association Scientifique Internationale du Café* , 183-191.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agric Food Chem* , 53, 1841-1856.

Illy, A., & Viani, R. (1995). *Espresso Coffee. The Chemistry of Quality*. London, UK: Academic Press.

Lakenbrink, C., Lapczynski, S., & Mainwald, B. (2000). Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem* , 48, 2448-2452.

Lindenmeier, M., Faist, V., & Hofmann, T. (2002). Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J Agric Food Chem* , 50: 6997-7006.

Miranda, G., Ventura, J., Suárez, S., & Fuertes, C. (2007). Actividad Citotóxica y antioxidante de los productos de la Reacción de Maillard de los Sistemas Modelo D-Glucosa - Glicina y D-Glucosa - L- Lisina. *Rev Soc Quím Perú* , 73, 215-225.

Morales F, J. (2005). Assessing the nonspecific hydroxyl radical scavenging properties of melanoidins in a Fenton type reaction system. *Anal. Chim Acta* , 534, 171-176.

Morales, F. J., & Babbel, M. B. (2002). Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. *J Agric Food Chem* , 50, 2788-2792.

Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2004). Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. *Eur Food Res Technol* , 218, 515-520.

Morales, F. J., Fernández-Fraguas, C., & Jiménez-Pérez, S. (2005). Ironbinding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chem* , 90: 821-827.

Moreira, D. P., Monteiro, M. C., Ribeiro-Alves, M., Donangelo, C. M., & Trugo, L. C. (2005). Contribution of Chlorogenic Acids to the Iron-Reducing Activity of Coffee Beverages. *J Agric Food Chem* , 53, 1399-1402.

Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem.* , 50, 5735-5741.

Natella, ,. F., Nardini, M., Giannetti, I., Dattilo, C., & Scaccini, C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* , 50, 6211-6216.

Oosterveld, A., Voragen, A. G., & Schols, ,. H. (2003). Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym* , 54, 183-192.

Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Rufián, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry Elsevier* , 1926–1932.

Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. Á., & Morales, F. J. (2012). Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. *Food Science and Tech* , 198-203.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., et al. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* , 133, 2812-2819.

Pérez, D. D., Strobel, P., Foneca, K., Diez, M. S., Vasquez, L., & Urquiaga, L. (2002). Wine, diet, antioxidant defenses, and oxidative damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* , 957, 136-145.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* , 26, 1231-1237.

Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem* , 49, 3438-3442.

Rufían-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2009). Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chem* , 114 (1) 93-99.

Santos, C. (2008). Implicaciones en la salud de los polifenoles en la dieta. *V Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética* (pp. 20-26). Salamanca: Universidad de Salamanca.

Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* , 16: 144-158.



Torres, M. C., Codoñer-Franch, P., Boix, L., Muñiz, P., González - Sanjose, M. L., & Valls- Bélles, V. (2000). Syntetic Melanoidins have protective effects on the toxicity of Adriamycin on Rat Hepatocytes. *ND* , 122.

Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Del Rio, D., Calani, L., & Conte, A. (2011). Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chem* , 124, 1430-1435.

Yen, G. C., & Hsieh, P. (1995). Antioxidant activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *J Agric Food Chem* , 67, 415-420.

Yen, G. C., & Tsai, L. C. (1993). Antimutagenecity of partially fractionated Maillard reaction product. *Food Chem* , 47, 11-15.

Yu, L. L. (2008). *Wheat Antioxidants*. Hoboken, NJ, USA: Wiley.

## ANEXOS

## Tablas:

*Tabla 1. Información general y descripción de las especies de café analizadas en este estudio.*

Muestras de café	Robusta	Arábigo
<b>Presentación</b>	Oro	Pergamino
<b>Humedad</b>	12%	12%
<b>Provincia</b>	Francisco de Orellana	Manabí
<b>Cantón</b>	Orellana	San Sebastián
<b>Recinto</b>	El Dorado	Solano
<b>Productor</b>	Luis Rosillo	Luis Alberto Duicela
<b>Beneficio</b>	Vía seca	Húmedo- enzimático
<b>Fecha cosecha</b>	Marzo 2012.	Marzo 2012
<b>Altitud óptima</b>	0-700m	1000-2000m
<b>Típicas características de la bebida</b>	Amargo	Acido
<b>Tamaño grano</b>	5,60 – 6 mm	6,70 – 8,00 mm

*Tabla 2. Temperaturas usadas para el tostado de los granos de café*

	T inicial °C	T media °C	T final °C	Tiempo (min)
<b>Robusta Ligero</b>	198.2	154.3	191.2	9.9
<b>Robusta Medio</b>	197.4	160.3	198.5	9.6
<b>Arabica Ligero</b>	199.0	155.3	191.2	9.7
<b>Arabica Medio</b>	196.7	159.7	198.4	9.5

**Tabla 3. Diseño experimental**

<b>Componentes del diseño experimental</b>	<b>Cantidad (unidades)</b>	<b>Descripción</b>
<b>Factores (F)</b>	2	Factor A: Especies de café <ul style="list-style-type: none"> <li>• Robusta</li> <li>• Arabica</li> </ul> Factor B: Grado de tostado <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ligero</li> <li>• Medio</li> </ul>
<b>Tratamientos (T)</b>	$T = n^F = 2^2 = 4$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RL = Robusta Ligero</li> <li>• RM= Robusta Medio</li> <li>• AL= Arabica Ligero</li> <li>• AM= Arabica Medio</li> </ul>
<b>Variabes (v)</b>	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje de pérdida de peso</li> <li>• Capacidad antioxidante (ABTS y FRAP)</li> <li>• Cuantificación de Polifenoles totales</li> </ul>
<b>Repeticiones (r)</b>	3 3 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje de pérdida de peso de los granos de café               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad antioxidante</li> </ul> </li> <li>• Cuantificación de Polifenoles totales</li> </ul>
<b>Unidades experimentales (U.E.)</b>	12 12 8	U.E Porcentaje de pérdida de peso U.E.Capacidad Antioxidante (ABTS/FRAP) U.E. Cuantificación de polifenoles

## Figuras:

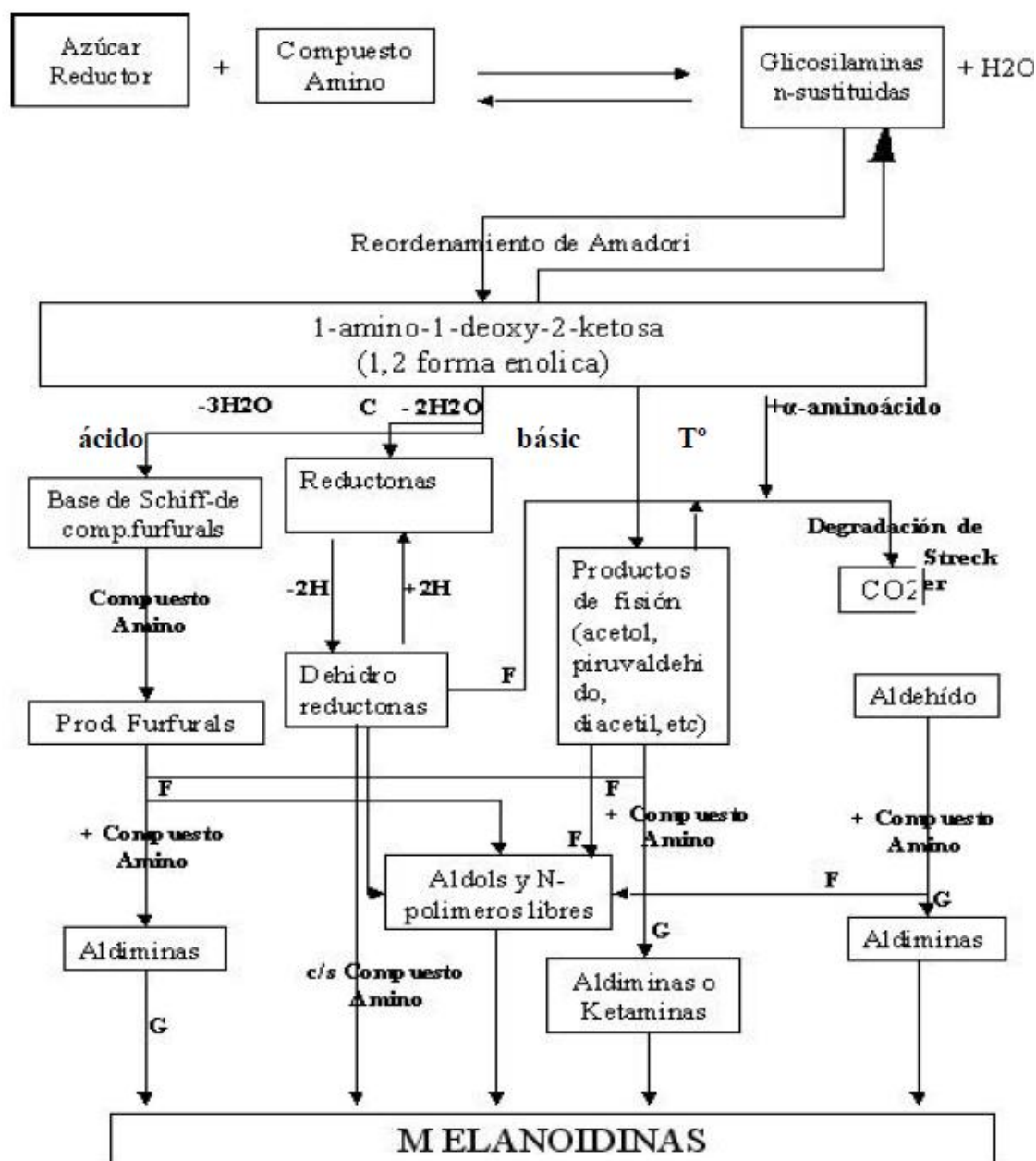


Figura 1: Formación de las melanoidinas

# Diana Lizeth Guevara Rosero

Email: [diana.guevara.rosero@estud.usfq.edu.ec](mailto:diana.guevara.rosero@estud.usfq.edu.ec) / [liz.lilo@hotmail.com](mailto:liz.lilo@hotmail.com) - Quito, Ecuador

## PERFIL

- Integridad y ética, comunicación, mejora continua, trabajo en equipo
- Cuatrilingüe: Inglés, Español, Portugués e Italiano
- Conocimientos en Microsoft Office, Análisis de datos y presentación de informes, Manejo de SPSS.
- Ahora estoy tratando de aplicar y desarrollar mis habilidades y conocimientos dentro de una investigación centrada en el análisis de la actividad antioxidante de diversos compuestos nutricionales.

## EDUCACIÓN

**Universidad San Francisco de Quito**                      Quito, Ecuador                      2006/2013

### INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Conocimientos en: Química, Ciencias de los Alimentos, Análisis de Control de Calidad, Procesamiento de Productos Lácteos, Gestión de Calidad, Biotecnología Alimentaria y Desarrollo de Nuevos Productos Alimenticios.

Conocimientos adicionales: Principios de Administración, Economía Industrial, Herramientas de oficina.

**Colegio Sagrados Corazones de Rumipamba**      Quito, Ecuador                      1994/2006

**ESPECIALIDAD: FÍSICO MATEMÁTICO.** Graduada con honores en 2006.

## EXPERIENCIA PROFESIONAL

### **Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP**

Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad. Quito-Ecuador

**PASANTE, TRABAJO DE COLABORACIÓN** 01/2012 a 04/2012

Extracción de compuestos bio-activos del café como las melanoidinas a través de ultrafiltración y liofilización.

### **Universidad San Francisco de Quito, USFQ- IAESTE**

Campus Cumbayá, Av. Diego de Robles y Vía Interoceánica

**ASISTENTE DE MARKETING**, 10/2011 a 12/2011

Organización del Programa de intercambios IAESTE.

### **High Sierra Pools, Inc.**

Virginia, USA. 2704 Columbia Pike Arlington, Virginia, 22204

**POOL MANAGER**, 05/2009 a 09/2009 - 05/2010 a 09/2010

Controlar la calidad del agua y el funcionamiento del sistema de filtración, mantener en orden el área y los usuarios.

---

## DESARROLLO PROFESIONAL

**Pool operator**, Swimming Pool and Spa Association, Inc, 8300 Boone Blvd. 5<sup>th</sup> Floor Vienna, VA 22182, 06/2010 – 06/2013 and Prince William Health District, 8470 Kao Circle Manassas, VA 20110-1702, 07/2009 – 12/2009.

**Simposio Nacional en Agronegocios y Seguridad Alimentaria**, Universidad San Francisco de Quito, CAAN, Quito-Ecuador, 04/2009 – 05/2009

---

## REFERENCES

**Francisco Carvajal Larenas**

593- 2- 297 868 (ext. 1200)

PhD. Researcher at Wageningen University, Holland

Professor at Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

**Javier Garrido**

Msc. Professor at Universidad San Francisco de Quito  
Coordinator of Food Engineering/ *jgarrido@usfq.edu.ec*

**Peter Augustovic** (703) 920-1750

Supervisor at High Sierra Pools Inc.  
*peter.augustovic@gmail.com*