

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CAPTACIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILLO (DPPH) PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN BEBIDA DE CAFÉ

Optimization of the DPPH method to evaluate antioxidant activity of coffee brew

Jiménez Monreal A.M.*, Sánchez Manzanera M., Martínez Tomé, M.

Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus Internacional de Excelencia Regional “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, España y CIBER (CB12/03/30038) Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn-ISCIII, España.

* **Autor para correspondencia y dirección actual:** Antonia Mª Jiménez Monreal. Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Campus de Espinardo, Murcia, España. Tel: 00 34 868 88 4797, Fax: 868 88 4147, Email: antoniamjimenez@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 14 septiembre 2012

Aceptado: 28 noviembre 2012

RESUMEN

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo siendo apreciado por sus características organolépticas y más recientemente por su potencial efecto beneficioso en la salud humana. Se han descrito compuestos en el café que le confieren propiedades antioxidantes. La actividad antioxidante puede ser medida con diferentes test y el método de captura del radical DPPH es un método utilizado por numerosos autores que han ido realizando adaptaciones del mismo para evaluar diversos alimentos (frutas, zumos, café, verduras).

El objetivo de este estudio es evaluar la capacidad antioxidante del café mediante una optimización del ensayo DPPH en condiciones normales de consumo, empleando tres tipos de cafetera (filtro, expreso e italiana), comparado con cafés de distintos orígenes (Colombia, Kenia y Etiopía) y café descafeinado.

Los resultados de la optimización del ensayo muestran valores de absorbancias inferiores (0,709) cuando la muestra es sometida a la etapa de centrifugación (modificación de Delgado-Andrade, 2005) respecto a aquellas que son sometidas solo a agitación (1,609). Los datos de actividad antioxidante obtenidos muestran una elevada capacidad antioxidante con porcentajes de inhibición superior a 50 % destacando el café Colombia, Etiopía y Kenia elaborados con cafetera de filtro con valores de 70,56%, 73,52% y 73,65% respectivamente.

En conclusión, según los resultados obtenidos, vemos la necesidad de adaptar los métodos establecidos de captura de radicales a las características del alimento o producto evaluado para asegurar al 100% la actividad antioxidante del alimento. La actividad antioxidante de la bebida de café no varía en función de la procedencia del café ni del contenido de cafeína que presenta. Por otro lado, en nuestro estudio, sólo observamos diferencias de actividad antioxidante del café referidas al tipo de cafetera, donde el café elaborado mediante la cafetera tipo expreso presenta menor actividad antioxidante ($p < 0,05$) que los otros dos procedimientos. Sería por ello interesante recomendar el uso de cafeteras (filtro e italiana) para la obtención de café y conseguir un buen aporte de antioxidantes dietéticos.

Palabras clave: bebida de café, actividad antioxidante, DPPPH.

ABSTRACT

Coffee is one of the most consumed beverages in the world, being appreciated for its organoleptic characteristics and more recently for its potential beneficial effects on human health. Coffee is also known to be a rich source of compounds with potent antioxidant activity. The antioxidant activity can be measured with different test and method of capture radical DPPH, is a method used by many authors that have been carried out to assess adaptation in various foods (fruits, juices, coffee, vegetables).

This study aim to evaluate the antioxidant capacity, by the DPPH assay, of coffee brew prepared in three commonly used ways (filter, espresso, italian) from different countries of origin (Colombia, Kenya and Ethiopia) and decaffeinated coffee.

The optimization results of the test show lower values of absorbance (0.709) when the sample is subjected to centrifugation step (modification to Delgado-Andrade, 2005) with respect to only those that are subjected to agitation (1.609). The antioxidant activity data obtained show a high antioxidant capacity with inhibition percentages above 50%, with the coffee Colombia, Ethiopia and Kenya coffee filter made with values 70.56%, 73.52% and 73.65% respectively.

In conclusion, according to the results, we see the need to adapt the methods set out radical capture the characteristics of the food or product evaluated to ensure 100% food antioxidant activity.

The antioxidant activity of coffee drinking from different origins is similar and does not vary depending on the presence or absence of caffeine. Moreover, we observed only differences antioxidant activity relating to the type procedure, where coffee type “espresso” has less antioxidant activity ($p < 0,05$) than the other two procedures. It would be interesting therefore recommend the use of the procedures (filter and Italian) for the obtaining of coffee and get a good intake of dietary antioxidants.

Key words: coffee brews, antioxidant activity, DPPH.

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos de exportación más valiosos del mundo (Gielissen y Graafland, 2009). Se produjeron un total de 7,2 millones de toneladas de café anualmente entre los años 2009 y 2010, y se espera que se eleve la cifra a 8 millones de toneladas anualmente en el año 2011 (ICO, 2012).

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo siendo apreciado por sus características organolépticas y más reciente-

mente por su potencial efecto beneficioso en la salud humana (Bisth y Sisodia, 2010).

Se han descrito varios componentes en el café que son relevantes para sus propiedades organolépticas y /o bioactivas como son la cafeína, trigonelina, ácido nicotínico y azúcares entre otros. El contenido de estos compuestos varía y puede estar influenciado por las distintas variedades de café, condiciones geográficas de cultivo y condiciones de tostado (Perrone y col., 2008). Otros compuestos (compuestos fenólicos) confieren al café propiedades antioxidantes

(Esquivel y Jiménez, 2012). De hecho el café se considera una fuente importante de antioxidantes como lo muestran Svilaas y col. (2004) y Fukushima y col. (2009) en estudios realizados en población noruega y japonesa, respectivamente, donde el café aporta más del 50% del total de consumo diario de antioxidantes.

Sin embargo, debido al proceso de tostado, los componentes fenólicos naturales pueden perder actividad, mientras que otros compuestos antioxidantes tales como los productos de reacción de Maillard (PRM), son los responsables del aumento de la capacidad antioxidante tras el tostado (Sacchetti y col., 2009). Múltiples estudios sugieren que son las melanoidinas (generadas durante el tostado) los compuestos que confieren a la bebida de café esta elevada capacidad antioxidante. De hecho algunos componentes volátiles heterocíclicos generados durante el proceso de tueste, son considerados como componentes antioxidantes (Votavová y col., 2009).

Para evaluar actividad antioxidante se recurre a diferentes métodos, siendo uno de ellos el método DPPH, el cual determina actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Hseu y col., 2008).

El método de captura del radical DPPH es utilizado desde hace muchos años, por numerosos autores que han ido realizando adaptaciones del mismo a la matriz alimentaria de la que quieren obtener información, como modificar la concentración de DPPH (0,1 mM, 0,2 mM, 600 mM), tiempo de incubación o ataque (30 min, 60 min, 500 min o incluso sin tiempo definido, hasta llegar a saturación), relación DPPH/muestra (8/1, 5/1, 39/1), etc (Delgado-Andrade y col., 2005; Dupas y col., 2006; Ferreres y col., 2006; Siddhuraju y Becker 2007; Seeram y col., 2008; Yang y col., 2008; Sekeroglu y col., 2012).

En la literatura, la actividad antioxidante puede, entre otros factores, depender del tipo (posición y número de hidroxilos en la molé-

cula) y concentración de compuestos fenólicos, y de la presencia de metales de transición (Jayaprakasha y Bhimanagouda, 2007; Sendra y col., 2006). Dada la complejidad de la matriz alimentaria, en algunas ocasiones los investigadores deben de realizar adaptaciones asegurándose que valoran al 100% la capacidad antioxidante del alimento, con lo cual se introducen variables como la utilización de ultrasonidos para homogeneizar mejor la muestra y que las estructuras activas puedan estar accesibles al radical (Yang y col., 2008).

El objetivo de este estudio es evaluar la capacidad antioxidante del café mediante una optimización del ensayo DPPH, en condiciones normales de consumo, empleando tres tipos de cafetera (filtro, expreso e italiana), comparado con cafés de distintos orígenes (Colombia, Kenia y Etiopía) y café descafeinado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

La empresa, Productos Continental Cafés Salzillo, S.L., Murcia, suministró los cafés comerciales, variedad *arábica*, provenientes de diferentes orígenes (café Colombia y Colombia descafeinado, Kenia y Etiopía). Los granos de café se tostaron en un tostador modelo "ROURE K60", durante 18-20 min a la temperatura indicada en la tabla 1, en las instalaciones de la empresa Productos Continental Cafés Salzillo, S.L. Una vez tostado el café, fue envasado en paquetes de 250 g.

En la tabla 1 está recogido el origen geográfico y las condiciones de tostado.

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad cromatográfica y proporcionados por Sigma Chemical Co. (Poole, Dorset, UK).

Preparación de las muestras

Las muestras de café se molieron en el laboratorio en un molinillo modelo Molino

Tabla 1. **Relación de cafés indicando origen geográfico y condiciones (temperatura y tiempo) del proceso de tostado**

Procedencia	Localización geográfica y altitud (m)	Temperatura ^a (°C)	Temperatura ^b (°C)	Tiempo ^c (min)
Colombia	Medellín 1000/1100	169,3	216,2	20,0
Colombia descafeinado	Medellín 1000/1100	167,1	210,1	19,3
Etiopía	Sidamo 1500/2000	157,2	215,2	20,0
Kenia	Bungoma 1500/2100	169,3	216,2	20,1

^a Temperatura del café antes del proceso de tostado
^b Temperatura del café después del proceso de tostado
^c Duración del proceso de tostado

Tabla 2. **Preparación de café según los tres procedimientos de elaboración (filtro, italiano y expreso)**

Tipo de cafetera	Café molido (g)	Agua (ml)	Bebida de café (ml)	Temperatura Agua (°C)	Temperatura bebida café (°C)
Filtro	7,0	70,0 ± 5,2	40,2 ± 5,0	90,2 ± 2,2	65,0 ± 5,2
Italiano	7,0	55,1 ± 5,1	40,1 ± 5,0	100,1 ± 3,0	90,1 ± 5,1
Expreso	7,0 ^a	45,1 ± 5,1 ^a	40,1 ± 5,1	90,0 ± 2,1	80,0 ± 5,2

^a Las cantidades de café molido y volumen de agua se establecieron en función de las condiciones de uso de la cafetera expreso. El volumen de agua utilizado en las otras dos cafeteras (filtro e italiano) se ajustó para obtener el mismo volumen de bebida de café, a partir de la misma cantidad de café molido.

Negro 1CV Ref. 71.704^R (Italia). A partir de estas muestras de café preparamos las bebidas de café con tres tipos de cafeteras distintas (tabla 2).

Según el tipo de cafetera utilizada obtenemos:

- Bebida de café que identificamos como café “filtro” se obtuvo utilizando una cafetera eléctrica por goteo equipada con un filtro de papel Melitta (Melitta^R, Lisboa, Portugal). Esta cafetera consiste en un depósito de agua que se calienta y pasa a través del café molido que está depositado sobre un filtro de papel o de malla de aluminio o acero. El café obtenido se recoge en una jarra.
- Bebida de café que identificamos como café “italiano” se preparó con una cafetera Mod. Mia Express[®] (Pezzeti, Italia). La cafetera

- italiana o de presión consta de dos cuerpos enroscados en su parte central y entre ellos se sitúa el depósito para el café molido. En la parte inferior se coloca el agua, que llega a ebullición cuando se aplica una fuente de calor y por efecto de la presión, el agua pasa a través del depósito de café y llega a la parte superior donde se depositará el café una vez hecho.
- Bebida de café que identificamos como café “expreso” usando cafetera expreso (8-9 bar de presión) Mod. Seletron Plus[®] (La Spaziale) (Bolonia, Italia). Este tipo de cafetera es la que se utiliza principalmente en el sector hostelero, aunque se pueden encontrar cada vez más cafeteras de este tipo de uso doméstico, de tamaño más reducido. El elemento clave de este tipo de máquinas es la presión

donde el café se prepara por extracción rápida con agua hirviendo bajo presión.

Posteriormente alícuotas de cada tipo de café y cafetera utilizada, se congelaron en epENDORF a -80°C en un congelador modelo ULT-790 (Thermo Electron Corporation) (Asheville, USA) donde se almacenaron hasta el día del ensayo.

Metodología

Optimizamos el ensayo DPPH utilizando los métodos de Delgado-Andrade y col. (2005) (Método 1) y Almela y col. (2006) (Método 2) para evaluar actividad antioxidante del café.

El método Delgado-Andrade y col. (2005), consiste en medir a tiempo cero la absorbancia (520 nm) de la disolución DPPH control (74 mg/l metanol) y la mezcla de café y DPPH (400 µl de café en 2 ml de DPPH). Todas las muestras fueron mantenidas en condiciones de oscuridad y agitación, midiéndose de nuevo la absorbancia a los 60 min.

El método Almela y col. (2006), consiste en medir a tiempo cero las absorbancias (517 nm) de la disolución DPPH control (100 mg/l metanol), mezcla café y DPPH (400 µl de café en 2 ml de DPPH), disolución café y metanol (400 µl de café en 2 ml de metanol) y disolución DPPH con metanol (400 µl de metanol en 2 ml de DPPH). Todas las muestras fueron mantenidas en oscuridad y en agitación durante el ensayo, midiéndose de nuevo la absorbancia a los 30 min.

Finalmente, el ensayo que se utiliza es una adaptación del método de Delgado-Andrade y col. (2005), donde se introduce una etapa de centrifugación. Para llevar a cabo el ensayo, partimos de una disolución de DPPH (74 mg/l metanol). La absorbancia (520 nm) final de esta disolución debe de estar comprendida en el rango de 1,600 a 1,900 UA. A 2 ml de disolución DPPH control se le adicionan 400 µl de bebida de café. La lectura se realiza después de una hora de incubación a tem-

peratura ambiente y posterior centrifugación (4000 rpm durante 10 min), utilizando para los análisis un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Los datos obtenidos mediante ensayo DPPH, se expresan en forma de “Porcentaje de inhibición” o de “Índice de estabilidad”. Las expresiones para calcular ambas relaciones son las siguientes:

$$\bullet \text{ Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Absmuestra} \times 100}{\text{AbsDPPH}}$$

$$\bullet \text{ Índice de estabilidad} = \frac{100 (\text{AbsDPPH} - \text{Absmuestra})}{\text{Peso}}$$

Donde:

- *Absmuestra* es la absorbancia de la muestra de café
- *AbsDPPH* es la absorbancia de la solución DPPH control
- *Peso*, se refiere al peso del café seco.

Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados por triplicado. Los valores obtenidos se expresaron como la media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) fueron calculadas mediante test de ANOVA, utilizando SPSS para Windows 15.0.

RESULTADOS

Optimización del método DPPH

Para optimizar el método de medición de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH seleccionamos dos adaptaciones diferentes del método DPPH (Método utilizado por Delgado-Andrade y col. (2005) y método Almela y col. (2006), que utilizan tiempos diferentes de ataque de las muestras por parte del radical, y filtraciones o agitaciones para limpiar la muestra a valorar en capacidad antioxidante. En nuestro

estudio introduciremos una etapa de centrifugación para tal fin. Controlamos además en esta etapa de optimización un control de absorbancias de los diferentes reactivos y aductos que podrían generarse ya que en la adaptación de Almela y col. (2006) se tiene en cuenta la contribución a la absorbancia de cada uno de los reactivos por separado (DPPH y café).

Ambos métodos están basados en medir la captación del radical libre DPPH por parte de una estructura antioxidante. Este radical estable presenta en disolución un color violeta oscuro. Una vez mezclado radical y sustancia antioxidante, a mayor captación del radical libre por parte del antioxidante, habrá una mayor disminución de la absorbancia inicial del radical DPPH, lo que conlleva una decoloración del color violeta inicial. Esta diferencia de absorbancia nos indicará la capacidad antioxidante del alimento o extracto en estudio.

Los resultados obtenidos para el método de Delgado-Andrade y col. (2005), expresados como absorbancias medidas a 520 nm en el espectrofotómetro, quedan recogidos en la tabla 3. En ella observamos cómo aumenta la absorbancia desde tiempo cero en la muestra agitada sin centrifugar, siendo la diferencia de ésta en la primera medida de 0,21 UA respecto a la muestra centrifugada. Esta diferencia es debida a la turbidez que provoca el residuo de café en suspensión en la muestra no centrifugada. Incluso, observamos transcurridos 60 min que la diferencia es de 0,900 UA. Podemos observar que, las muestras sometidas a centrifugación no presentan diferencias significativas a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos para el método de Almela y col. (2006), expresados como absorbancias medidas a 520 nm en el espectrofotómetro, quedan recogidos en la tabla 3. Observamos cómo la absorbancia de la muestra de café con metanol centrifugada, apenas varía a lo largo del ensayo, mientras que en la muestra (café y metanol) no centrifugada varía a lo largo del ensayo. De igual forma, la muestra (DPPH

y café) centrifugada mantiene los valores de absorbancia a lo largo del tiempo, mientras la muestra sin centrifugar (DPPH y café) presenta valores superiores de absorbancia que nos indica la interferencia por la turbidez propia de la muestra en esas condiciones.

En algunos casos puede observarse pequeñas variaciones en los valores de absorbancia a lo largo del ensayo de Almela y col. (2006), entre las muestras de metanol con DPPH y la de DPPH, a favor de esta última. Esto es debido a la dilución a la que sometemos al DPPH en el metanol. Esta mínima diferencia constante, nos permite prescindir de la muestra de metanol más DPPH y tener en cuenta para medir absorbancia solo la muestra que contiene DPPH.

También se comprobó en otro ensayo la posible influencia de la agitación sobre las muestras centrifugadas, para asegurar la homogeneidad de condiciones en todas las muestras, observándose valores de absorbancia similares cuando la muestra era centrifugada o bien era centrifugada y sometida a agitación (datos no mostrados).

Una vez descartadas las posibles interferencias en las variaciones de absorbancia debidas a los reactivos ensayados y en función de acortar tiempos de lectura a favor de procesar varias muestras en los mismos intervalos de tiempo, decidimos aplicar el método de Delgado-Andrade y col. (2005) con ligeras modificaciones (centrifugación durante 10 min a 4000 rpm).

Capacidad antioxidante con el método DPPH optimizado

Los resultados obtenidos para los tipos de café, según el origen (Colombia, Etiopía y Kenia) y tipo de cafetera, se muestran en la tabla 4, expresados como porcentaje de inhibición e índice de estabilidad. Todos los cafés presentan una elevada capacidad antioxidante, con un porcentaje de inhibición superior a 50%, destacando el café Colombia, Etiopía y Kenia elaborado con cafetera de filtro con valores al-

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos con los métodos modificados (incluye centrifugación) y originales de Delgado-Andrade y col. (2005) (Método 1) y método Almela y col. (2006) (Método 2)

Tiempo (min)															
0				30				60							
	Centrifugación		Sin Centrifugación		p	Centrifugación		Sin Centrifugación		p	Centrifugación		Sin Centrifugación		p
	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2		Método 1	Método 2	Método 1	Método 2		Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	
DPPH ^a	1,876 ± 0,01	-	1,879 ± 0,03	1,799 ± 0,03		1,865 ± 0,01	-	1,868 ± 0,02	1,79 ± 0,01		1,862 ± 0,01	-	1,864 ± 0,04	1,78 ± 0,02	
DPPH+café ^b	0,694 ± 0,02	0,483 ± 0,01	0,904 ± 0,01	0,662 ± 0,01	*	0,675 ± 0,04	0,504 ± 0,02	1,595 ± 0,01	0,690 ± 0,01	*	0,709 ± 0,03	0,534 ± 0,02	1,609 ± 0,01	0,676 ± 0,03	*
DPPH+MetOH ^c	-	1,530 ± 0,01	-	1,675 ± 0,04		-	1,505 ± 0,01	-	1,658 ± 0,02		-	1,487 ± 0,01	-	1,644 ± 0,04	
MetOH+café ^d	--	0,449 ± 0,02	-	0,867 ± 0,01		-	0,447 ± 0,03	-	0,320 ± 0,01		-	0,456 ± 0,02	-	0,325 ± 0,01	

Los valores representan la media aritmética ± la desviación estándar.
Diferencias significativas efecto centrifugación en las muestras (método 1 y método 2) (*p<0,05).
^a DPPH: Método 1: 100 mg DPPH/l metanol; Método 2: 74 mg DPPH/l metanol
^b DPPH + café: 400 µl de café en 2 ml de DPPH.
^c DPPH + MeOH: 400 µl de metanol en 2 ml de DPPH
^d MeOH +café: 400 µl de café en 2 ml de metanol.
- No medidas

Tabla 4. **Porcentaje de inhibición (% I) e índice de estabilidad (I.E.) en muestras de bebida de café (diferentes orígenes y procedimientos de elaboración)**

PROCEDENCIA		TIPO DE CAFETERA			
		Filtro	Italiano	Expreso	
Colombia	% I	70,56 ± 3,81	67,15 ± 3,09	49,40 ± 2,74	**
	I.E.	1206 ± 55	1185 ± 43	850 ± 40	
Colombia descafeinado	% I	67,50 ± 3,97	72,25 ± 2,63	51,38 ± 3,46	**
	I.E.	1190 ± 47	1223 ± 54	879 ± 51	
Etiopía	% I	73,52 ± 2,61	73,10 ± 3,27	52,23 ± 2,97	**
	I.E.	1262 ± 45	1258 ± 53	918 ± 50	
Kenia	% I	73,65 ± 3,51	70,75 ± 2,14	63,23 ± 3,07 #	*
	I.E.	1267 ± 51	1218 ± 47	1084 ± 49	

Los valores representan la media aritmética ± la desviación estándar.
Diferencias significativas efecto origen: las muestras analizadas respecto a la procedencia (p<0,05).
* Diferencias significativas efecto procedimiento elaboración: las muestras analizadas respecto a las muestras de café elaboradas con cafetera expreso y las otras muestras restantes (elaboradas con cafetera filtro y cafetera italiana) (*p<0,05; ** p<0,01).

rededor del 70%, de inhibición y con índices de estabilidad que oscilan entre 1267-1206. Estos datos nos indican que no hay diferencias significativas de actividad antioxidante respecto a los orígenes de los cafés analizados, excepto en el café expreso de Kenia que presenta valores significativamente superiores (p<0,05) a los otros dos cafés expreso (Etiopía y Colombia) mostrando mayor actividad antioxidante.

Por otro lado, cuando analizamos la influencia del tipo de cafetera, observamos diferencias significativas (p<0,05) respecto al café elaborado con la cafetera expreso, mostrando menores porcentajes de inhibición.

Cuando analizamos la actividad antioxidante del café normal con su correspondiente descafeinado (en este caso de Colombia), observamos que no hay diferencias significativas entre ellos teniendo en cuenta los tres tipos de cafeteras.

DISCUSIÓN

El café es conocido como una importante fuente rica en compuestos fenólicos y la ac-

tividad antioxidante descrita en el café está asociada a la presencia de estos compuestos (Esquivel y Jiménez, 2012). Por otro lado estos componentes fenólicos presentan generalmente una significativa actividad captadora frente al radical DPPH (Sekeroglu y col., 2012), de esta forma justificamos así la idoneidad de evaluar la actividad antioxidante del café mediante el método DPPH, siendo éste junto al ensayo ABTS dos de los ensayos más utilizados para evaluar dicha actividad antioxidante; así Floegel y col. (2011) compararon ambos métodos para evaluar actividad antioxidante en alimentos y observaron una elevada correlación de actividad antioxidante entre ambos, mostrando incluso, en la bebida de café, mayor actividad con el ensayo DPPH que con el ABTS (61,7 mg equivalente de vitamina C/100 g y 59,6 mg equivalente de vitamina C/100 g respectivamente).

Fukushima y col. (2009) estudiaron las posibles correlaciones entre parámetros de capacidad antioxidante (DPPH y potencial redox) y el contenido de polifenoles de muestras de café y observaron una elevada y significativa corre-

lación entre ambos parámetros y los compuestos del café tostado, sugiriendo la importante contribución del contenido de polifenoles a la capacidad antioxidante en café.

Es importante hacer una distinción en términos de protección antioxidante lenta y rápida. Esto está relacionado con cinéticas de reacción y la capacidad que tiene un antioxidante de reaccionar con un radical específico *versus* la termodinámica de la reacción; como en el caso de la desaparición del radical DPPH que presenta un ecuación doble exponencial que sugiere la presencia de grupos antioxidantes que actúan de forma rápida o lenta (Kelebek y col., 2008). En este sentido, el café se considera con un efecto protector antioxidante rápido y lo evidenciamos en la tabla 3 donde los valores obtenidos de absorbancia no varían a lo largo del ensayo, mostrando a tiempo cero un valor de absorbancia muy inferior al obtenido por el radical DPPH lo que se traduce en actividad antioxidante.

Como la inactivación del radical se inicia tan pronto se adiciona el café, no es factible la determinación directa de la absorbancia a tiempo cero, por lo que se evalúa la disminución de absorbancia a lo largo del tiempo (60 min según Delgado-Andrade y col., 2005, y 30 min según Almela y col., 2006). Además para solventar este problema se calcula previamente la contribución a la absorbancia de cada uno de los compuestos (DPPH y café) por separado y a igual concentración individual de la que presentarían en el medio de reacción; de tal forma que la absorbancia de la muestra sería el sumatorio de la absorbancia del aducto (DPPH y café) más el incremento de absorbancias de cada uno de ellos por separado (DPPH + metanol; café + metanol). Este procedimiento se realiza siguiendo la adaptación de Almela y col. (2006). En nuestro estudio, el incremento de los valores de absorbancia obtenidos en los reactivos por separado es próximo a cero y por ello consideramos oportuno realizar la evaluación antioxidante basándonos en la adaptación del método Delgado-Andrade y col. (2005) y no

tener en cuenta la contribución a la absorbancia de cada uno de los compuestos.

A la vista de los resultados obtenidos de absorbancia en muestras centrifugadas y agitadas, se deduce que la etapa de centrifugación consigue una mayor eficacia para valorar actividad antioxidante en café.

Es sabido que el grano verde de café es rico en compuestos fenólicos y polisacáridos y estos compuestos sufrirán profundas transformaciones durante el proceso de tueste; así las condiciones de tuestado, diferencias existentes entre la composición de las diferentes variedades de café, y los distintos procedimientos de preparación de la bebida de café, dan como resultado una gran variabilidad en la composición química del producto final (Alves y col., 2010a; Esquivel y Jiménez, 2012). Es bien conocido que los PRM influyen en la oxidación y el tiempo de vida útil de alimentos como los cereales, la leche, el café o la carne. Daglia y col. (2008) formulan la hipótesis de que los compuestos volátiles, generados a partir de la reacción de Maillard (RM) tienen un efecto antioxidante. Perrone y col. (2012) observaron que los ensayos TRAP y FRAP fueron más sensibles para medir actividad en los diferentes PRM, mientras que el ensayo TEAC era más apropiado para detectar simultáneamente actividad antioxidante en el conjunto de los PRM del café. Dos Santos y col. (2007), en su estudio sobre la actividad antioxidante de café (determinada mediante los ensayos inhibición de peroxidación lipídica, DPPH y reducción férrica), hallaron que el comportamiento antioxidante depende del grado de tuestado y puede ser influenciado por la pérdida de compuestos fenólicos y la sucesiva formación de otros compuestos antioxidantes como los PRM. Siendo evidenciadas también estas melanoidinas por su actividad anti-radicalaria en bebida de café (evaluada mediante ensayo DPPH, FRAP y TEAC) como consecuencia de su riqueza en grupos fenólicos, por lo que son capaces de ejercer una actividad antioxidante, al igual que la presencia de toco-

feroles en la bebida de café (Alves y col., 2010 b; Vignoli y col., 2011).

En extractos de bebidas de café, Yoshida y col. (2008), examinaron la actividad antioxidante del café y de sus compuestos volátiles, observando una actividad antioxidante superior en la bebida de café que en los componentes individuales; incluso comparable a la actividad antioxidante de un aditivo sintético ampliamente utilizado en la industria alimentaria como el Butil Hidroxi Anisol (BHA) (Ramalakshmi y col., 2008).

Nuestros resultados muestran que no hay diferencias entre café normal y café descafeinado por lo que la cafeína no es un componente esencial que contribuya a la actividad antioxidante, hecho que también constatan otros estudios similares (Parras y col., 2007; Brezová y col., 2009).

La principal razón en la variación de actividad antioxidante para los cafés tratados es debida fundamentalmente a la pérdida de ácido clorogénico durante el proceso de obtención de la bebida de café, ya que Steinhart y col. (2001) observaron una disminución de este componente aproximadamente un 10-20% cuando el café fue sometido a un tratamiento de vapor; este hecho corrobora nuestros resultados donde se muestra que el café que presenta menor actividad antioxidante es aquél elaborado con la cafetera expreso, procedimiento en el cual el efecto del vapor junto con la presión es más intenso. Esta disminución de actividad observada en los cafés expreso también se observa en un estudio realizado por Parras y col. (2007) donde evaluaron mediante el ensayo TEAC la actividad antioxidante de cafés elaborados por tres procedimientos diferentes mostrando menor actividad el café expreso. Budryn y Nebesny (2008) determinaron la capacidad antioxidante de las diferentes variedades de café, *robusta* y *arabica*, preparados por tres métodos diferentes y el método más eficiente de extracción de antioxidantes fue aquél en el que se utilizó una cafetera tipo italiana.

En conclusión, según los resultados obtenidos, vemos la necesidad de adaptar los métodos establecidos de captura de radicales a las características del alimento o producto evaluado para determinar efizcamente la actividad antioxidante del alimento; siendo, en nuestro estudio, la incorporación de la etapa de centrifugación una adaptación para lograr el máximo rendimiento.

La actividad antioxidante de la bebida de café no varía en función de la procedencia del café ni del contenido de cafeína que presenta. Por otro lado, en nuestro estudio, sólo observamos diferencias de actividad antioxidante del café referidas al tipo de cafetera, donde el café elaborado mediante la cafetera tipo expreso presenta menor actividad antioxidante ($p < 0,05$) que los otros dos procedimientos, mostrando en todos los casos valores superiores a 50% de captación del radical.

Teniendo en cuenta que un consumidor ingiere de 4-5 tazas de café/día y este consumo se estima en un aporte de antioxidantes dietéticos de alrededor del 64% del total (Svilaas y col., 2004), sería interesante incluir el café como un alimento más a tener en cuenta en los estudios nutricionales y epidemiológicos que se realicen.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de la empresa Productos Continental Cafés Salzillo, S.L. que ha suministrado las muestras de café.

BIBLIOGRAFÍA

- ALMELA L., SÁNCHEZ-MUÑOZ B., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J.A., ROCA M.J., RABE V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. J. Chromatogr. A. 1120: 221-229.
- ALVES R., ALMEIDA I., CASAL S., OLIVEIRA M. 2010A. Isoflavones in coffee:

- influence of species, roast degree, and brewing method. *J. Agric. Food Chem.* 58: 3002-3007.
- ALVES R., CASAL S., OLIVEIRA M. 2010B. Tocopherols in coffee brews: influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. *J. Food Compos. Anal.* 23: 802-808.
- BIST S., SISODIA S. 2010. *Coffea arabica*: A wonder gift to medical science. *J. Natural Pharmaceuticals* 1: 58-65.
- BREZOVÁ V., SLEBODOVÁ A., STASKO A. 2009. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chem.* 114: 859-868.
- BUDRYN G., NEBESNY E. 2008. Antioxidant properties of Arabica and Robusta coffee extracts prepared under different conditions. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 104: 69-78.
- DAGLIA M., PAPETTI A., ACETI C., SORDELLI B., GREGOTTI C., GAZZANI G. 2008. Isolation of high molecular weight components and contribution to the protective activity of coffee against lipid peroxidation in a rat liver microsome system. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11653-11660.
- 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.* 53: 7832-7836.
- DOS SANTOS M., BATISTA B., DUARTE S., PATTO DE ABREU C., GOUVEA C. 2007. *Química Nova* 30: 604-610.
- DUPAS C.J., MARSET-BAGLIERI A.C., ORDONAUD C.S., DUCEPT F.M., MAILARD M.N. 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *J. Food Sci.* 71: S253-S258.
- ESQUIVEL P., JIMÉNEZ V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* 46: 488-495.
- FERRERES F., SOUSA C., VRCHOVSKA V., VALENTAO P., PEREIRA J.A., SEABRA R.M., ANDRADE, P. 2006. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 88-98.
- FLOEGEL A., KIM D-O., CHUNG S-J., KOO S., CHUN O. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Comp. An.* 24: 1043-1048.
- FUKUSHIMA Y., OHIE T., YONEKAWA Y., YONEMOTO K., AIZAWA H., MORI Y., WATANABE M., TAKEUCHI M., HASEGAWA M., TAGUCHI C., KONDO K. 2009. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1253-1259.
- GIELISSEN R., GRAAFLAND J. 2009. Concepts of price fairness: Empirical research into the Dutch coffee market. *Bussines Ethics: A European Review* 18: 165-178.
- HSEU Y., CHANG W., CHEN C., LIAO J., HUANG C., LU F., CHIA Y., HSU H., WU J., YANG H. 2008. Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem. Toxicol.* 46: 105-114.
- ICO (International Coffee Organization) www.ico.org/news/1011_asoexport-c.pdf consultado Julio 2012.
- JAYAPRAKASH G.K., BHIMANAGOUDA P. 2007. In vitro evaluation of the antioxidante activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem.* 101: 410-418.
- KELEBEK H., CANBAS A., SELLI S. 2008. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chem.* 107: 1710-1716.
- PARRAS P., MARTÍNEZ-TOMÉ M., JIMÉNEZ A.M., MURCIA M.A. 2007. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chem.* 102: 582-592.

- PERRONE D., DONANGELO C.M., FARAH A. 2008. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 110: 1030-1035.
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 60: 4265-4275.
- RAMALAKSHMI K., RANATH KUBRA I., MOHAN RAO L.J. 2008. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Res. Int.* 41: 96-103.
- SACCHETTI G., DI MATTIA C., PITTIA P., MASTROCOLA D. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* 90: 74-80.
- SEERAM N., AVIRAM M., ZHANG Y., HE-NING S., FENG L., DREHER M., HEBER D. 2008. Comparison of Antioxidant Potency of Commonly Consumed Polyphenol-Rich Beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1415-1422.
- SEKEROGLU N., SENOL F., ORHAN I., GULPINAR A., KARTAL M., SENER B. 2012. In vitro prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food Res. Int.* 45: 197-203.
- SENDRA J.M., SENTANDREU E., NAVARRO J.L. 2006. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) for determination of the antiradical of citrus juices. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 615-624.
- SIDDHURAJU P., BECKER K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem.* 101: 10-19.
- STEINHART H., LUGER A., PIOST J. 2001. Antioxidative effect of coffee melanoidins. *Colloque Scientifique International sur le Cafe*, 19th 67-74.
- SVILAAS A., SAKHI A.K., ANDERSEN L.F., SVILAAS T., STROM E.C., OSE L., BLOMHOFF R. 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J. Nutri.* 134: 562-567.
- VIGNOLI J.A., BASSOLI D., BENASSI M. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* 124: 863-868.
- VOTAVOVA L., VOLDFICH M., SEVCIK R., CIZKOVA H., MLEJNECKA J., STOLAR M., FLEISMAN T. 2009. Changes of antioxidant capacity of Robusta coffee during roasting. *Czech. J. Food Sci.* 27: S49-S52.
- YANG B., ZHAO M., SHI J., YANG N., JIANG Y. 2008. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from logan fruit pericarp. *Food Chem.* 106: 685-690.
- YOSHIDA Y., HAYAKAWA M., NIKI E. 2008. Evaluation of the antioxidant effects of coffee and its components using biomarkers hydroxyoctadecadienoic acid and isoprostane. *J. Oleo Sci.* 57: 691-697.