

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniero en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *COFFEA*
ARABICA”**

AUTOR:

DAVID ALEJANDRO ARMIJOS MONCADA

TUTORA:

BFQ. SILVIA TORRES SEGARRA, MGS.

CUENCA - ECUADOR

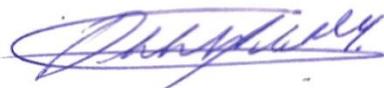
2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, David Alejandro Armijos Moncada con documento de identificación N° 1104080609, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **“COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *COFFEA ARABICA*”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, diciembre del 2020.



David Alejandro Armijos Moncada

C.I. 1104080609

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *COFFEA ARABICA*”**, realizado por David Alejandro Armijos Moncada, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, diciembre del 2020.



Bfq. Silvia Torres Segarra, Mgs

C.I. 0103597225

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, David Alejandro Armijos Moncada con documento de identificación N° 1104080609, autor del trabajo de titulación: **“COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *COFFEA ARABICA*”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, diciembre del 2020.



David Alejandro Armijos Moncada

C.I. 1104080609

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación es dedicado primeramente a Dios que como la fuerza que une y equilibra el universo siempre me hizo estar en el momento y lugar adecuados, además de aprender de mis errores y desde el primer día de mi vida poner personas grandes de corazón en mi camino.

A mis padres Fanny y Rodrigo que siempre me han apoyado y enseñado los valores que han marcado mi vida como estudiante y como persona, que durante mi vida siempre me brindaron su cariño y todo su conocimiento.

A mi abuela Rosa Montoya Paredes que en mi primera semana de estudiante me deseo suerte y me dijo que sería un gran estudiante y un excepcional profesional en mi campo, aunque no pudo ver mi desarrollo como estudiante y la culminación de mis estudios, puedo estar más que seguro que está orgullosa de la culminación de esta etapa de mi vida.

A mis sobrinos que en un futuro empezaran su vida universitaria tengan presente que sus metas pueden cumplirse.

A mi familia y amigos que siempre creyeron en mí y me brindaron su mano y su apoyo incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida que me dio y por las personas y sucesos que puso en mi camino.

A mis padres por brindarme su apoyo y cariño incondicional durante mi vida con estudiante, siempre aconsejándome y guiándome para así poder llegar a ser un excelente profesional.

A mi familia por su apoyo y consejo en los momentos requeridos.

A mis profesores por compartir su conocimiento en las aulas para así un día poder ser un gran profesional.

A mi tutora Bfq. Silvia Torres, por su guía, dedicación y responsabilidad hacia con mi persona y mi trabajo de titulación, siempre compartiendo sus conocimientos y experiencia para así realizar un excelente trabajo.

A mis compañeros de carrera con quienes compartí grandes momentos en los cuales forjamos una gran amistad y crecimos como personas.

A mis amigos quienes siempre creyeron en mí y me brindaron una amistad incondicional.

INDICE

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR	i
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES	x
Resumen	xi
Abstract	xii
CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.3 FORMULACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	3
1.4 JUSTIFICACIÓN	3
1.5 LIMITACIONES	3
1.6 OBJETIVOS	4
1.6.1 OBJETIVO GENERAL	4
1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.7 HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO II	5
2.1 MARCO REFERENCIAL	5
2.2 MARCO CONCEPTUAL	7
2.2.1 Coffea arabica	7
2.2.2 Componentes de las hojas	8
2.2.3 Maceración	12
2.2.4 Método DPPH	15
2.3 DEFINICIONES DE TÉRMINOS BÁSICOS	15
CAPÍTULO III	19
MARCO METODOLÓGICO	19
3.1 Enfoque de investigación	19
3.2 Nivel de investigación	19
3.3 Diseño de investigación	19
3.4 Población y muestra	19
3.5 Variables	19

3.6	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	20
3.7	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	20
3.8	Procesos	21
CAPÍTULO IV		31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		31
4.1	Recolección de muestra vegetal	31
4.1.1	Obtención del extracto alcohólico total.....	31
4.1.2	Obtención del extracto acuoso total	31
4.3	Determinación de la capacidad antioxidante	31
4.3.1	Determinación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso.....	31
4.3.2	Determinación de la capacidad antioxidante del extracto alcohólico	32
4.4	Comparación de la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de <i>Coffea arabica</i>	33
4.4.1	Comparación de la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de <i>Coffea arabica</i>	33
CAPÍTULO V		37
5.1 CONCLUSIONES		37
5.2 RECOMENDACIONES		38
BIBLIOGRAFIA		39
ANEXOS		43
Lista de abreviaturas		43
Ejemplar para recolección de muestra		44
Muestra seleccionada y desecada		45
Muestra pesada y separada		45
Pesado de muestra		46
Extracto post 14 días de maceración		46
Preparación de extracto alcohólico para filtrado		47
Preparación de extracto acuoso para filtrado.....		47
Preparación de equipo para filtrado.....		48
Filtración de extracto		48
Proceso de filtrado al vacío.....		49
Extracto alcohólico filtrado		50
Extracto acuoso filtrado.....		51
Extractos filtrados.....		51
Extracto diluido para análisis.....		52
Reactivo DPPH.....		52
Reactivo DPPH diluido		53

Almacenamiento de dilución DPPH.....	54
Espectrofotómetro	55
Fracciones de análisis	55
Análisis de extractos.....	56
Celdas post análisis.....	56
Software de análisis	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación científica del Coffea arabica.	7
Tabla 2. Tabla comparativa entre los componentes de las hojas y los rangos normales.	8
Tabla 3. Fracciones estándar para análisis.	28
Tabla 4. Resultados de análisis extracto acuoso.	31
Tabla 5. Resultados de análisis extracto alcohólico.	32
Tabla 6. Comparación entre porcentajes de inhibición.	33
Tabla 7. Comparación entre valores de IC ₅₀	34
Tabla 8. Tendencia de los porcentajes de inhibición de los extractos Alcohólico y Acuoso.	35
Tabla 9. Validación de hipótesis.	35

INDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES

Figura 1. Comparación entre molécula de Agua y Ácido Clorogénico.....	13
Figura 2. Comparación entre molécula de Etanol y Ácido Clorogénico.....	14
Ilustración 3. Ejemplar de planta de café para toma de muestra.....	21
Ilustración 4. Muestra seleccionada y desecada.....	22
Ilustración 5. Muestra molida.....	22
Ilustración 6. Muestra pesada.....	23
Ilustración 7. Extractos en maceración.....	24
Ilustración 8. Filtración de extracto alcohólico.....	24
Ilustración 9. Filtración de extracto acuoso.....	25
Ilustración 10. Reactivo DPPH pesad.....	26
Ilustración 11. Ácido ascórbico pesado.....	27
Ilustración 12. Extracto diluido.....	27
Ilustración 13. Espectrofotómetro.....	28
Ilustración 14. Fracciones almacenadas en frascos ámbar.....	29
Ilustración 15. Lectura de actividad antioxidante.....	29
Ilustración 16. Celdas post lectura.....	30

Resumen

La presente tesis realiza una comparación de la actividad antioxidante entre los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de café arábigo -*Coffea arabica*-, mediante un análisis por el método DPPH. Este proyecto de tesis se realizó debido al desecho anual que se genera debido a la poda de hojas que se realiza del 25% del total del follaje de cada planta, esto genera una pérdida económica debido al gasto que se produce por desechar los residuos y una pérdida de biomasa ya que se está desechar hojas con biocomponentes de importancia farmacológica, en la actualidad se han realizado estudios enfocados únicamente en los beneficios farmacológicos del grano café arábigo dejando de lado el potencial que presentan las hojas de esta planta. Para el desarrollo experimental de esta tesis se utilizó para cada extracto 30g de materia vegetal previamente seleccionada y desecada la cual fue sometida a maceración con 900 mL de alcohol de 96° y 500 mL de agua destilada respectivamente, generando como resultado 400 mL de extracto alcohólico y 400 mL de extracto acuoso purificado y filtrado, mediante análisis por el método DPPH el extracto acuoso en el punto de concentración máxima 33.333 ug/mL posee un porcentaje de inhibición de 14.8282% y un IC₅₀ de 117.56, a su vez el extracto alcohólico en el punto de concentración máxima 33.333 ug/mL el porcentaje de inhibición de 23.0608% y un IC₅₀ de 104.21, todos los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el método análisis de dos muestras mediante el cual se acepta la hipótesis alternativa la cual expresa que la diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso no representa un margen de diferencia significativo.

Palabras clave: *Coffea arabica*, porcentaje de inhibición, IC₅₀, actividad antioxidante.

Abstract

This thesis makes a comparison of the antioxidant activity between the alcoholic and aqueous extracts of Arabic coffee leaves -*Coffea arabica*-, by means of an analysis by the DPPH method. This thesis project was carried out due to the annual waste that is generated due to the pruning of leaves that is carried out of 25% of the total foliage of each plant, this results in an economic loss due to the expense of discarding waste and a loss of biomass since leaves with biocomponents of pharmacological importance are being discarded, currently studies have been conducted focused solely on the pharmacological benefits of Arabic brown bean leaving aside the potential presented by the leaves of this plant. For the experimental development of this thesis I use for each extract 30g of plant matter previously selected and dried which was macerated with 900 mL of alcohol of 96o and 500 mL of distilled water respectively, resulting in 400 mL of alcoholic extract and 400 mL of purified and filtered aqueous extract, by analysis by the DPPH method the aqueous extract at the maximum concentration point 33,333 ug/mL has an inhibition rate of 14.8282% and an IC₅₀ of 117.56, in turn the alcoholic extract at the maximum concentration point 33,333 ug/mL the inhibition rate of 23.0608% and an IC₅₀ of 104.21 all the values obtained were statistically analyzed using the two-sample analysis method by which alternative hypotheses is accepted which states that the difference between the antioxidant capacity of alcoholic and aqueous extracts does not represent a significant margin of difference.

Keywords: *Coffea arabica*, inhibition percentage, IC₅₀, antioxidant activity.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la medicina hasta la actualidad las plantas han sido de vital importancia debido a sus características medicinales, gran parte de la población utiliza medicina tradicional para tratar afecciones que disminuyen su calidad de vida, en la actualidad la industria farmacológica utiliza antioxidantes sintéticos en mayor proporción a los antioxidantes naturales, existen estudios que aseveran que la utilización de antioxidantes sintéticos conlleva a un efecto tóxico en el organismo del ser humano, la industria farmacológica puede emplear extractos de plantas y sus principios activos para generar fármacos de origen biológico o semisintéticos los cuales serán más seguros y efectivos que generen una mejora en la calidad de vida de la población afectada.

Los extractos de plantas para uso farmacológico son preparados farmacéuticos elaborados en laboratorios especializados bajo condiciones ideales de higiene, la preparación se realiza mediante la adición de agua destilada u otro medio y la planta medicinal de interés, existen tres tipos de extractos; fluidos, blandos y secos (Olaya, 2003). En la industria farmacológica los extractos de plantas pueden ser utilizados por su potencial efecto antioxidante la cual se mide por distintos métodos siendo uno de los más prácticos el método DPPH en el cual se utilizan extractos fluidos.

Existe una gran variedad de plantas con conocidos efectos antioxidantes sin embargo el desconocimiento del potencial poder antioxidante de otras plantas genera un desperdicio de estas ya que no son aprovechadas, como es el caso del café arábigo -*Coffea arabica*- procedente de etiofia, en la actualidad se puede encontrar esta especie cultivada en regiones tropicales y subtropicales, por tanto es cultivable en la mayor parte del territorio de Ecuador, el cual solo es cultivado para la producción del fruto y el resto de la planta no presenta un interés para los productores generando desechos por la poda de hojas realizada para mantener un equilibrio del follaje en los cultivos. El presente proyecto de titulación pretende cimentar una base de conocimiento del poder antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la hoja de café la cual

posee compuestos como clorofila y ácidos clorogénicos, los cuales poseen actividad antioxidante y pueden utilizarse en la elaboración de fármacos para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por la presencia de radicales libres, generando precedente para dar uso a la hoja de café.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El café arábigo es una planta de ciclo anual, se la puede encontrar prácticamente en todos los continentes, esta planta es catalogada como de importancia económica debido a la exportación y venta nacional del café procesado. En el Ecuador según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP) actualmente están sembradas 43373 hectáreas de café arábigo con un rendimiento de 0.22 t/ha, anualmente se generan desechos de cada planta debido a la poda de hojas que se realiza del 25% del total del follaje de cada planta, tomando en consideración que por hectárea se encuentra un promedio de 3200 plantas, el 25% de residuo generado por planta en una hectárea genera una pérdida económica debido al gasto que se produce por desechar los residuos y una pérdida de biomasa ya que se está desechando hojas con biocomponentes de importancia farmacológica, a nivel nacional no genera un uso de la hoja de café debido al desconocimiento de los beneficios para la salud que poseen los principios activos de las hojas, la falta de proyectos investigativos y la pérdida de conocimientos ancestrales, esto genera una pérdida económica a causa del costo de manejo de desperdicios y al contrario al no generarse un correcto manejo se puede generar un posible foco de contaminación.

En la actualidad se han realizado estudios enfocados únicamente en los beneficios farmacológicos del grano café arábigo dejando de lado el potencial que presentan las hojas de esta planta; en el Ecuador existe una falta de proyectos que aprovechen los residuos de hoja que se generan en los cultivos del café arábigo como una potencial fuente de ingresos económicos por el aprovechamiento de esta planta y sus beneficios a nivel farmacológico.

En este proyecto de investigación se pretende utilizar la hoja café arábigo obtenido en el cantón Puyango de la provincia de Loja, para comparar la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la hoja del café arábigo, por medio del método de DPPH; de tal manera que

se genere una base de conocimiento, para posibles usos de esta planta por parte de la industria farmacológica.

1.3 FORMULACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué extracto de las hojas de *Coffea arabica* posee mayor actividad antioxidante?

1.4 JUSTIFICACIÓN

El café arábigo es cultivado en el Ecuador según el MAGAP en un total de 43373 hectáreas, en los cultivos cada planta ocupa un área promedio de 3.13m², (Arcila, 2007) determino que en buenas condiciones de cultivo la cantidad de hojas promedio de una planta de café arábigo a la edad de cinco años es de un numero de 3920 hojas/planta, está cantidad es controlada en dos ocasiones anualmente mediante la poda de hojas, en las cuales el total de follaje se reduce hasta el 75% generando un desperdicio ya que las hojas podadas son desechadas. La industria farmacológica puede aprovechar el 25% de hojas podadas previa una selección para extraer principios activos con potencial medicinal como lo son los compuestos con actividad antioxidante presentes en la hoja de café ya que existen estudios sobre la composición bioactiva de las hojas de café arábigo sin embargo sus beneficios son desconocidos por la mayor parte de la población, siendo el único enfoque del cultivo nacional el procesamiento del grano, generando una base de conocimiento de interés farmacológico de la actividad antioxidante de compuestos presentes en la hoja del café arábigo los residuos de la poda generada dos veces al año pueden ser aprovechados para la producción de fármacos evitando la pérdida del material vegetal al ser desechado desperdiciándose así sus beneficios medicinales y potencialmente económicos. Aplicando un método de extracción adecuado centrado en la cantidad, calidad y origen, se pueden extraer los componentes bioquímicos principales de la hoja del café arábigo y realizar un análisis cuyos resultados pueden catalogar a esta planta como medicinal con un potencial económico por desarrollar.

1.5 LIMITACIONES

Este trabajo de investigación se realizará en el laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, durante un periodo de 6 meses, donde las

limitaciones podrían ser las siguientes: horarios de uso de laboratorios, económicas, disponibilidad de equipos y reactivos.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar los extractos acuoso y alcohólico de las hojas de café arábigo -*Coffea arabica*- a fin de evaluar la capacidad antioxidante.

1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de café arábigo -*Coffea arabica*- mediante maceración para la extracción de los componentes bioactivos a un medio líquido.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Coffea arabica* mediante el método DPPH a fin de cuantificar la actividad antioxidante de cada extracto.
- Comparar los valores obtenidos de actividad antioxidante mediante método estadístico análisis de dos muestras para demostrar que extracto tiene mayor capacidad antioxidante.

1.7 HIPÓTESIS

Hipótesis nula

El extracto alcohólico de las hojas de café arábigo -*Coffea arabica*- posee mayor actividad antioxidante debido al tipo de solvente empleado.

Hipótesis alternativa

La diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso no representa un margen de diferencia significativo.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO REFERENCIAL

En Julio del 2008 en Piracicaba, Brasil se publicó en la revista *Scientia Agrícola*; un artículo con el siguiente tema “Concentraciones totales de fenol en las hojas del cafeto durante el desarrollo del fruto.” De los autores Salgado, P. R., Favarin, J. L., Leandro, R. A., & Lima Filho, O. F. D. (2008). Total, phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agrícola*, 65(4), 354-359. El objetivo del presente estudio fue evaluar la cantidad de fenoles totales en las hojas de café de las plantas en crecimiento durante la etapa de fructificación en función de las condiciones climáticas. Los resultados de este experimento fueron los siguientes en relación con la síntesis de metabolitos secundarios, no hubo diferencias entre las plantas productoras y no productoras, para los valores promedio de fenoles totales $-p > 0.05-$, no solo para las hojas jóvenes, sino también para las hojas maduras.

En el año 2011 la Revista Cubana de Plantas Medicinales publica el artículo “Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades” dirigido por los investigadores Naranjo, M., Vélez, L. T., & Rojano, B. A. (2011). El objetivo de este estudio fue 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 obtenidos para el método de Almela y col. (2006), 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. 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. Todos los tipos de café 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 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.

En enero del 2013 la revista Scielo Perú publica “Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus L.*) Dirigido por los investigadores Martín Cruzado, Ana Pastor, Nino Castro y Juan Carlos Cedrón. El objetivo era determinar la actividad antioxidante en el extracto liofilizado de alcachofa con mayor contenido de compuestos fenólicos, mediante el empleo del reactivo DPPH. En el presente trabajo, además de evaluar la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles, flavonoides, antocianinas, se puso énfasis en determinar el contenido de resveratrol y la composición química, con el objetivo de contribuir al desarrollo futuro de protocolos de control de calidad.

En octubre del año 2018 en México se publicó por primera vez en la revista Fitotecnica mexicana la investigación con el tema “COMPOSICIÓN BIOACTIVA DE HOJAS DE CAFÉ DURANTE UN CICLO ANUAL” realizada por ANUAL, D. U. C., & LEAVES, B. C. O. C. COMPOSICIÓN BIOACTIVA DE HOJAS DE CAFÉ. Donde el objetivo fue medir el área foliar, concentraciones de clorofilas, cafeína, ácido clorogénico -5-CQA-, azúcares reductores, así como macro y micronutrientes en la variedad antes mencionada. Los resultados de este artículo fueron los siguientes: Las plantas de café presentaron la mayor área foliar -64.25 cm²- en la etapa de floración. Durante la etapa de floración de la planta de café se encontró la mayor concentración en clorofila a -2.11 mg g⁻¹ PMF-, b -0.79 mg g⁻¹ PMF- y total -2.93 mg g⁻¹ PMF-. La cafeína de las hojas de café durante las diferentes etapas del ciclo anual no presentó diferencias estadísticas significativas.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 *Coffea arabica*

2.2.1.1 Generalidades, taxonomía y morfología

Coffea arabica es una planta arbusto que puede llegar a crecer hasta 12m y tener una vida productiva de 15-20 años, debido a los ciclos productivos y funciones biológicas y metabólicas las plantas de café se las mantienen hasta que lleguen a una altura promedio de tres metros lo cual tomó un tiempo de alrededor de seis años de esta manera se facilita la recolección (Fonnegra, 2007). Las hojas del café arábigo tienen forma oval de aproximadamente 15cm de largo, las flores son de color blanco y se forman en grupos en las axilas de las hojas, a partir de estas se forman los frutos los cuales son drupas de color rojizo que miden un promedio de 1-2cm de diámetro, la parte exterior del fruto es carnosa y en el interior se encuentran 2-3 semillas o granos de café rodeados de una capa membranosa, las semillas de café son la parte que más cafeína contiene de toda la planta. La planta de café produce frutos de interés comercial a partir de una edad de edad de 3-5 años, posterior a esto la planta se puede mantener productiva durante 15-20 años, la producción media de una planta es de 450g anuales en condiciones adecuadas, el área foliar promedio de la planta es de 64.25cm² (Pozo, 2014).

El café arábigo -*Coffea arabica*- procede de Etiopía, en la actualidad se puede encontrar esta especie cultivada en regiones tropicales y subtropicales entre los 1300-2800m sobre el nivel del mar, la temperatura idónea para el crecimiento de esta planta es 15-24°C (Fonnegra, 2007).

El nombre científico del café arábigo es *Coffea arabica* cuya respectiva clasificación científica se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación científica del *Coffea arabica*.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
REINO:	Plantae
DIVISIÓN:	Magnoliophyta
CLASE:	Magnoliopsida

ORDEN:	Gentianales
FAMILIA:	Rubiaceae
SUBFAMILIA	Ixoroidae
GÉNERO:	<i>Coffea</i>
ESPECIE:	<i>Coffea arabica</i>

Fuente: (Fonnegra, 2007)

2.2.2 Componentes de las hojas

Las hojas del café arábigo contienen cafeína en concentración más alta durante las etapas tempranas de desarrollo (102 μmol/mg PS) y disminuye a medida que avanza la maduración y senescencia de la hoja, ácidos clorogénicos presentan una concentración de (1.02%), clorofila a (2.11 mg/g PMF), b (0.79 mg/g PMF) y total (2.93 mg/g PMF), glucosa (9.65%) y fructuosa (1.74 %), hierro (144.70 mg/kg), cobre (6.56 mg/kg), zinc (11.04 mg/kg) y boro (35.02 mg/kg) (ANUAL, 2018).

Tomando en consideración los componentes de la hoja de café arábigo determinados por (ANUAL, 2018) se puede realizar una comparación de los valores encontrados de cada uno de los componentes ante los rangos determinados como normales para cada uno de estos (Ver tabla 2)

Tabla 2. Tabla comparativa entre los componentes de las hojas y los rangos normales.

Compuestos	Componentes de las hojas	Rangos normales
Cafeína	102 μmol/mg PS	73.6 - 130 μmol/mg PS
Clorofila α	2.11 mg/g PMF	0.47 – 3.23 mg/g
Clorofila β	0.79 mg/g PMF	0.26 – 0.66 mg/g
Ácidos clorogénicos	1.02%	0.04 – 1.05%
Glucosa	9.65%	2 – 10%
Fructuosa	1.74 %	0.36 – 2%
Hierro	144.70 mg/kg	25-500 mg/kg
Cobre	6.56 mg/kg	5-20 mg/kg
Zinc	11.04 mg/kg	20-100 mg/kg
Boro	35.02 mg/kg	20-100 mg/kg

Fuente: (ANUAL, 2018)

Los componentes bioactivos de las hojas de café mantienen un equilibrio por medio de la fotosíntesis proceso mediante el cual la planta genera su propia energía y regula los niveles de azúcares –glucosa y fructosa-, ácidos clorogénicos y clorofila estas dos últimas presentan actividad antioxidante y antipirética, la fotosíntesis es un proceso complejo que no consiste en una única reacción sino más bien en numerosas reacciones que se dividen en dos vías principales (Sadava, 2009):

Fase luminosa: Las reacciones en esa fase son impulsadas por energía luminosa, en esta vía metabólica la energía luminosa se convierte en energía química en forma de ATP y un transportador de electrones reducido denominado NADPH + H⁺ (Sadava, 2009).

Fase oscura: La fase oscura puede darse en presencia o ausencia de luz siempre y cuando sea consecutiva de la fase lumínica, durante la fase oscura un átomo de hidrógeno reacciona con el dióxido de carbono absorbido de la atmosfera generando carbohidratos con la ayuda de energía generada por el ATP como fuente de energía, la reducción de CO₂ puede efectuarse mediante tres vías independientes: el ciclo de Calvin, la vía de la fotosíntesis C₄ y el metabolismo ácido de las crasuláceas (Sadava, 2009).

El carbohidrato producido por la planta durante la fase oscura de la fotosíntesis es el azúcar del tipo reductores –glucosa- el cual cumple funciones vitales para el metabolismo y auto preservación de la planta.

Glucosa: La glucosa en las plantas se forma a través de la fotosíntesis mediante la siguiente ecuación estequiométrica (ver ecuación 1) (Cebrián, 2016).



Ecuación 1: Reacción de fotosíntesis

La glucosa producida a través de la fotosíntesis se consume en dos partes: la glucosa se consume parcialmente y así produce la energía necesaria para el metabolismo natural de la planta, el resto de la glucosa se transforma en celulosa la cual es el material estructural de la planta y en almidón el cual cumple la función de reserva alimentaria (Cebrián, 2016) .

Fructosa: Uno de los componentes que se encuentran en la hoja de café arábigo es la fructosa un azúcar del tipo reductor la cual se encuentra en un 1.74% (Taiz, 2006). La fructosa se produce por la glucólisis a la cual es sometida la glucosa producida durante la fase oscura, la reacción que produce la fructosa es la siguiente: la glucosa con inversión de 2ATP produce Fructosa-1-6-di-P la cual continuando el proceso es divide en Dioxetona-3-P y Gliceraldehído-3-P, la reacción continua con la inversión de 4 ADP+P generando 4ATP, consecutivamente se generan 2NADH₂ por la inversión de 2NAD la reacción finaliza con 2Piruvato como producto final. (Taiz, 2006).

La composición bioactiva de la hoja de café es compleja, cada componente se encuentra en una determinada concentración en la cual debe mantener un equilibrio para poder cumplir la función para la cual está diseñado, al disminuir o aumentar demasiado la concentración debido a alteraciones ambientales o condiciones que generen desequilibrios o estrés a la planta, los componentes no cumplirían su función específica generando alteraciones en las concentraciones de los componentes bioactivos, disminuyendo los niveles de clorofila y ácidos clorogénicos lo cual es proporcional a la disminución del efecto antioxidante de estos compuestos, el efecto domino de las alteraciones en los componentes bioactivos concluiría con la putrefacción o necrosamiento de la hoja (Taiz, 2006). Los componentes bioactivos de la hoja de café arábigo se disponen de la siguiente manera:

Cafeína: La concentración de cafeína en la hoja de café arábigo es de 102 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ PS la cual se encuentra dentro de un rango normal para la especie de 73.6 - 130 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ PS, si bien el contenido de cafeína de esta especie es bajo en comparación a otras especies esto no debe presentar peligro alguno siempre y cuando se realicen labores de control de plagas mediante prácticas ancestrales y se realice el cultivo de la planta a una altura de entre los 600 – 800 msnm (Alvarado, 1994).

Clorofila: La concentración de clorofila en la hoja de café arábigo se dispone de la siguiente manera Clorofila α 2.11 mg g^{-1} PMF, valor que se encuentra dentro del rango normal de 0.47 – 3.23 mg g^{-1} y Clorofila β 0.79 mg g^{-1} PMF valor que se encuentra del rango normal

de 0.26 – 0.66 mg g⁻¹, la concentración total de clorofila es de 2.9 mg g⁻¹ PMF, la clorofila es el pigmento verde de las plantas de vital importancia para el proceso de fotosíntesis, en cantidades deficiente de clorofila la fotosíntesis no se realiza de manera correcta lo cual de no corregirse concluiría con la muerte de la hoj (Cebrián, 2016).

Ácidos clorogénicos: La concentración de ácidos clorogénicos en la hoja de café arábigo es de 1.02%, valor que se encuentra dentro de un rango normal de 0.04 – 1.05%, los ácidos clorogénicos son intermediarios de la biosíntesis de lignina un componente de la pared celular, en caso de deficiencia de estos ácidos la biosíntesis de lignina se vería interrumpida generando un déficit de este compuesto para la formación de la pared celular y la planta quedaría afectada estructuralmente y susceptible a daños e ingreso de patógenos. Los ácidos clorogénicos poseen actividad antioxidante un déficit de estos provocaría la disminución del porcentaje de actividad antioxidante. (Fonnegra, 2007).

Hierro: La concentración de hierro en la hoja de café es de 144.70 mg kg⁻¹, valor que se encuentra dentro del rango normal de 25-500 mg kg⁻¹, el hierro interviene en la fotosíntesis y en la síntesis de clorofila, consecuentemente al existir un déficit de hierro se produce una clorosis la cual se manifiesta como un amarillamiento en los nervios de las hojas más jóvenes (Barreira, 2008).

Cobre: La concentración de cobre en la hoja de café es de 6.56 mg kg⁻¹ valor que se encuentra dentro del rango normal de 5-20 mg kg⁻¹, el cobre interviene en procesos de óxido-reducción además de formar parte de enzimas (Barreira, 2008).

Zinc: La concentración de zinc en la hoja de café es de 11.04 mg kg⁻¹, valor que se encuentra dentro del rango normal de 20-100 mg kg⁻¹, el zinc actúa en distintos sistemas enzimáticos, puede reducir la transferencia de cobre desde las raíces hasta los órganos aéreos de la planta, la deficiencia de zinc puede ocasionar retraso de crecimiento, clorosis, manchas marrones en hojas superiores y hojas distorsionadas (Barreira, 2008).

Boro: La concentración de boro en la hoja de café es de 35.02 mg kg⁻¹, valor que se encuentra dentro del rango normal de 20-100 mg kg⁻¹, el boro juega un papel de vital importancia para el correcto crecimiento de las plantas ya que promueve la correcta división de las células, elongación de las células, fuerza de la pared celular, polinización, floración, producción de semillas y translocación de azúcar además de esto el boro es de importancia en el sistema hormonal de las plantas (Vera, 2001).

2.2.3 Maceración

Es el tratamiento de drogas vegetales con líquidos ya sea agua destilada o etanol con el fin de provocar una separación de los compuestos solubles de los insolubles, la manera más sencilla de realizar este método es humedecer las drogas desmenuzadas con la suficiente cantidad de líquido, agitar fuertemente y dejar reposar durante un lapso de 14 días en un recipiente estéril y protegido de la luz solar. Los dos principales tipos de maceración son las que utilizan agua o alcohol respectivamente, los disolventes tienen como función extraer la molécula de interés e incorporarla en su espacio intermolecular para esto el disolvente debe cumplir las características adecuadas para su uso en laboratorio, el disolvente debe romper los puentes de hidrógeno y no reaccionar con la molécula de interés (Dobislaw, 2004):

Extracto acuoso: En el caso de utilizar agua esta debe ser agua destilada, esto garantizará que durante la maceración los componentes que se extraigan sean los requeridos sin la posibilidad de otros compuestos o impurezas que llegarían a afectar al extracto final, son menos concentrados que los extractos hidro-alcohólicos, con la ventaja de no presentar sedimento y su color y aroma son más suaves, por sus características organolépticas, son utilizados principalmente para cosméticos y productos alimenticios (Leitao, 2011).

Al utilizar agua como disolvente para el proceso de maceración se debe tener en cuenta (Núñez, 2008):

- Semejanza de funciones químicas: La molécula del soluto será más o menos soluble en agua dependiendo del grado de similitud con la molécula del disolvente.

- Semejanzas de polaridades: El agua es muy polar por lo tanto el soluto que se pretende extraer también deberá ser de naturaleza polar, es decir tendrán polaridades semejantes.
- Tamaño de soluto: Una molécula es más soluble mientras más pequeña sea.

Ejemplo: Agua – Ácido Clorogénico (Ver figura 1)

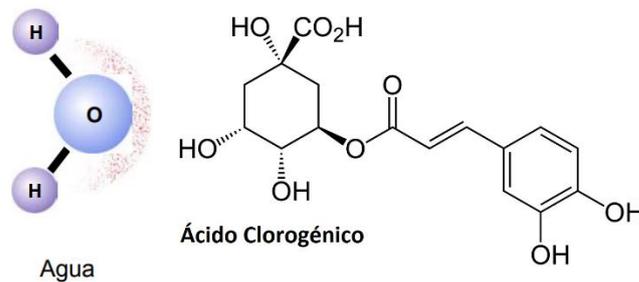


Figura 1. Comparación entre molécula de Agua y Ácido Clorogénico.

Semejanza de funciones químicas: Menor semejanza

Semejanzas de polaridades: Compuestos polares

Tamaño de soluto: Estructura significativamente mayor

Extracto alcohólico: En el caso de utilizar etanol la concentración debe ser de entre 40 hasta 60% ya que una concentración demasiado alta produce que se disuelvan sustancias que no son requeridas y posteriormente sería complicado de retirar, mientras que una concentración demasiado baja puede llegar a producir enturbiamiento en el extracto final, este tipo de extractos son más concentrados que los extractos acuosos (Dobislaw, 2004).

El etanol es considerado por excelencia como un solvente de uso en laboratorio tomando en consideración que al momento de adquisición se debe constatar el porcentaje de concentración, presencia de agua y realizar una prueba para verificar la presencia de aceite de fúsel, el etanol es principalmente utilizado como disolvente de los colorantes entre otros

compuestos, esto se debe a sus características estructurales y de polaridad como ya se mencionó en el caso de emplear agua como disolvente las mismas tres características se deben tomar en cuenta en el caso del etanol (Núñez, 2008).

Al utilizar etanol como disolvente para el proceso de maceración se debe tener en cuenta (Núñez, 2008):

- Semejanza de funciones químicas: La molécula del soluto será más o menos soluble en agua dependiendo del grado de similitud con la molécula del disolvente.
- Semejanzas de polaridades: El etanol es menos polar que el agua sin embargo la semejanza de polaridad con la molécula de interés es el factor clave.
- Tamaño de soluto: Una molécula es más soluble mientras más pequeña sea.

Ejemplo: Etanol – Ácido Clorogénico (Ver figura 2)

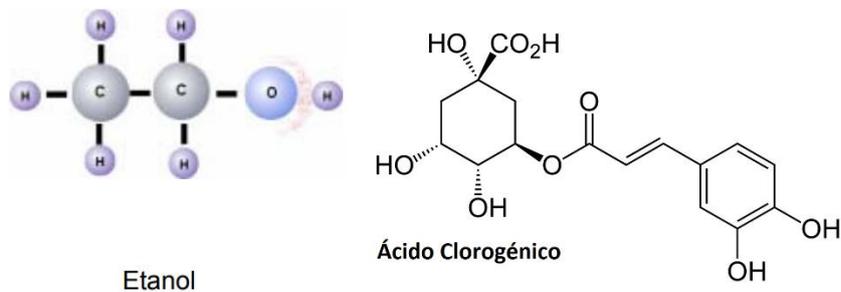


Figura 2. Comparación entre molécula de Etanol y Ácido Clorogénico.

Semejanza de funciones químicas: Mayor semejanza

Semejanzas de polaridades: Compuestos polares

Tamaño de soluto: Estructura más grande

2.2.4 Método DPPH

Existen varias técnicas para la detección de la actividad antioxidante, la técnica de Brand-Williams et al, (1995), utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. (Brand-Williams, 1995)

El proceso ocurre mediante una reacción del tipo pseudo primer orden el cual puede evaluarse mediante la medición de la disminución de la absorbancia en función del tiempo (Brand-Williams, 1995).

Primera fase muy rápida, segunda una reacción lenta debido a un proceso de dimerización entre los productos de la reacción o debido a reacciones de los productos de ésta. (Brand-Williams, 1995).

Reacción entre el DPPH y un antioxidante (ver ecuación 2) (Muñoz Juárez, 2009).



Ecuación 2: Reacción DPPH

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición el cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración (ver ecuación 3) (Muñoz Juárez, 2009).

$$\% \text{Inhibición} = \frac{A - A_1}{A} * 100$$

Ecuación 3

Donde:

A= Absorbancia del blanco

A1= Absorbancia de la muestra

2.3 DEFINICIONES DE TÉRMINOS BÁSICOS

Antioxidante: Es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre

e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. El radical libre del antioxidante no es tan reactivo para continuar las reacciones de propagación. Existe una considerable cantidad de estudios científicos a nivel químico, de cultivos celulares y en animales que indican que los antioxidantes pueden ralentizar o posiblemente prevenir el desarrollo de algunas enfermedades, como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares, y otras degenerativas, como el alzhéimer o el propio envejecimiento (Campo, 2017).

Cafeína: Compuesto químico que forma parte del fruto de la planta de café, bayas de guaraná, nuez de cola, chocolate siendo estas las principales fuentes, en un enfoque global se sabe que la cafeína es componente químico de alrededor de 60 plantas las cuales le dan uso como un pesticida natural, químicamente la cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, este grupo son de bases purinicas que incluyen sustancias endógenas como la guanina y adenina (Guarnizo Franco, 2009).

Clorofila: Es el pigmento verde de las plantas el cual es de vital importancia para el proceso de fotosíntesis, la clorofila es una mezcla de compuestos muy relacionados entre sí la estructura es la siguiente: un complejo de magnesio de una dihidroporfirina, una cadena de ácido propiónico modificada en forma de β -cetoester cíclico, una cadena de ácido propiónico esterificada con un alcohol diterpénico y fitol el cual le confiere la característica de ser liposoluble (VALLESPÍ, 2013).

Ácidos clorogénicos: Forman parte importante dentro de los ácidos fenólicos simples, comprenden varios esteres del ácido quínico (Hernandez, 2010). Poseen poder antioxidante y función colerética, expectorante, estimulante de motilidad gástrica, peristaltismo intestinal y lipolítico en aplicación tópica (Fonnegra, 2007).

Fenoles totales: Compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo como su grupo funcional. Están presentes en las aguas naturales, como resultado de la contaminación ambiental y de procesos naturales de descomposición de la materia orgánica. La débil acidez del grupo fenólico ha determinado que se los agrupe químicamente junto a

los ácidos carboxílicos y a los taninos, conformando así el grupo de los ácidos orgánicos (VALLESPÍ, 2013).

Metabolito Secundario: Conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa (Ruiz, Reyes y Suarez, 2015).

Azúcar reductor: Son azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto con un grupo aldehído o cetona libre de tal manera que pueden actuar como un agente reductor donando electrones a otra molécula (Monge-Nájera, 2002).

Glucosa: Es un monosacárido altamente soluble en agua muy poco soluble en alcohol, es el principal tipo de azúcar y fuente de energía de los seres vivos como plantas u animales, el poder energético de la glucosa es de 4 kcal/g (Taiz, 2006).

Fructosa: Es el azúcar presente en mayor concentración en frutas y miel, es un monosacárido cuyo poder energético es similar al de la glucosa 4 kcal/g (Taiz, 2006).

Hierro: Elemento químico de símbolo “Fe” y masa atómica 55.847 u, el número atómico del hierro es 26 y se encuentra en el grupo 8 y periodo 4 de la tabla periódica de elementos (Burns, 2004).

Cobre: Elemento químico de símbolo “Cu” y masa atómica 63.546 u, el número atómico del cobre es 29 y se encuentra en el grupo 11 y periodo 4 de la tabla periódica de elementos (Burns, 2004).

Zinc: Elemento químico de símbolo “Zn” y masa atómica 65.38 u, el número atómico del zinc es 30 y se encuentra en el grupo 12 y periodo 4 de la tabla periódica de elementos (Burns, 2004).

Boro: Elemento químico de símbolo “B” y masa atómica 10.8 u, el número atómico del boro es 5 y se encuentra en el grupo 13 y periodo 2 de la tabla periódica de elementos (Burns, 2004).

Actividad antioxidante: Capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres (Ruiz, et al, 2015).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de investigación

El presente trabajo de titulación es de un enfoque cuantitativo ya que utiliza recolección de datos para probar hipótesis con bases numéricas y análisis estadístico de resultados, este enfoque será utilizado en esta investigación a razón del trabajo con mediciones numéricas que se realizará.

3.2 Nivel de investigación

El nivel de investigación es explicativo puesto que se trabajará con dos extractos diferentes, empleando un mismo método de análisis. La investigación explicativa se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto.

3.3 Diseño de investigación

Se trabajará con un diseño de investigación mixto el cual consta de:

Diseño documental: Se realizará una investigación para poseer una base teórica para el desarrollo de la investigación.

Diseño preexperimental: La investigación consiste en someter un grupo que se repite dos veces de hojas de *Coffea arabica* a un tratamiento diferente de extracción y posterior análisis bajo un determinado protocolo, para observar el resultado que produce.

3.4 Población y muestra

Población: Población finita de café arábigo -*Coffea arabica*- en un terreno de 500 m² en el cantón Puyango en la Provincia de Loja.

Muestra: Se tomará 30 muestras podando el 25% del área foliar de plantas de café seleccionadas.

3.5 Variables

Variable independiente: Proceso de extracción con solventes alcohólico y acuoso

respectivamente.

Variable dependiente: Capacidad antioxidante.

Variable interviniente: Presencia de impurezas, concentración del extracto, exposición a luz solar.

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas a utilizar son:

Diseño documental:

- Análisis documental.
- Análisis de contenidos

Diseño preexperimental:

- Observación desarrollada en laboratorio contralando la variable de extracción

Los instrumentos utilizados en la investigación son:

- Bases de datos.
- Fotografías.
- Fichas.
- Bitácora.
- Observación de laboratorio.

3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Análisis de resultados de pruebas de laboratorio mediante:

- Método estadístico: Análisis de dos muestras
- Tablas comparativas.
- Gráficas de barras.

Los datos obtenidos se analizarán mediante el modelo estadístico de Análisis de dos Muestras

3.8 Procesos

Etapa 1: Recolección de muestras.

En esta etapa se realizará la recolección de la cantidad especificada de la planta café arábigo en la locación específica.



Ilustración 3. Ejemplar de planta de café para toma de muestra.

Descripción de técnica y método empleadas.

Recolección de la muestra vegetal.

Se tomará 30 muestras podando el 25% del área foliar de plantas de café seleccionadas.

Tratamiento

Se realiza un lavado del material vegetal con agua destilada, se clasifica de hojas según su estado descartando las que presenten características desfavorables.

El material vegetal se deja secar a exposición solar y temperatura ambiente durante un día.

El material vegetal se coloca en la estufa durante tres días a 36° C.



Ilustración 4. Muestra seleccionada y desecada.



Ilustración 5. Muestra molida.

Etapa 2: Elaboración de extractos alcohólico y acuoso.

Obtención del extracto alcohólico

El extracto alcohólico se prepara utilizando 30 g de las hojas de materia prima, esta cantidad se macera durante catorce días con 900 mL de etanol 96° rectificado extraneutro, la relación entre muestra y el etanol es de 9:0.3. Transcurrido los catorce días se coloca la maceración en reposo sin exposición a luz y a temperatura ambiente.

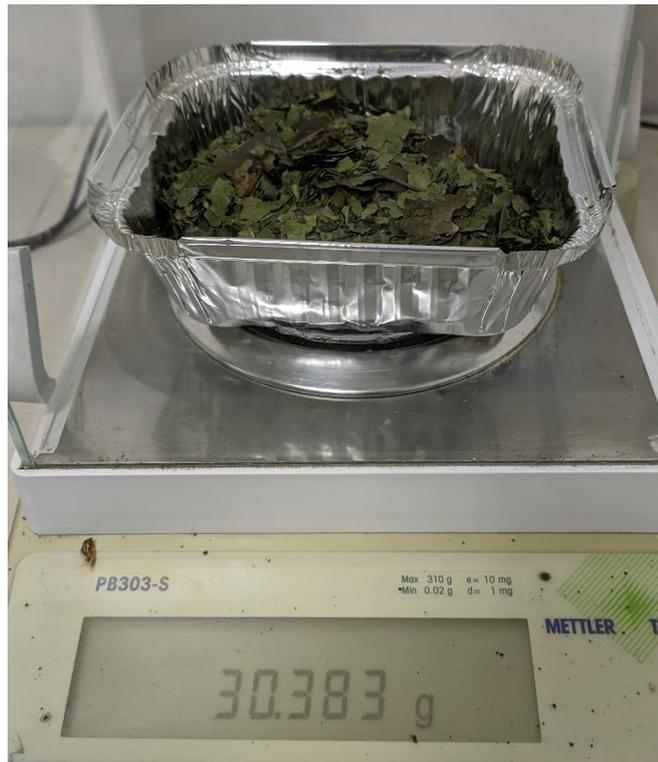


Ilustración 6. Muestra pesada.

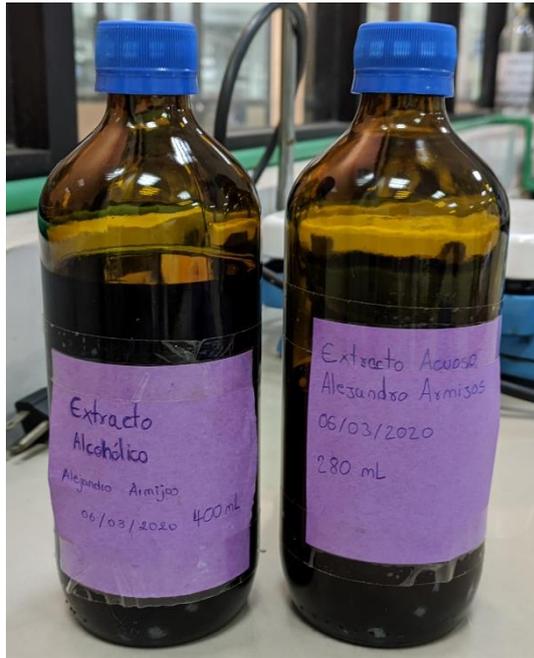


Ilustración 7. Extractos en maceración.

El extracto se filtra utilizando la bomba de vacío y papel filtro, de tal forma que se obtiene un extracto sin partículas suspendidas.



Ilustración 8. Filtración de extracto alcohólico.

El extracto alcohólico, se coloca en el rotavapor a 75°C para eliminar el etanol y obtener un extracto concentrado la reducción del volumen fue de 500 mL dejando un volumen residual final de 400 mL.

Obtención del extracto acuoso

El extracto acuoso se prepara utilizando 30 g de las hojas de materia prima, esta cantidad se macera durante catorce días con 500 mL de agua destilada, la relación entre muestra y el agua destilada es de 5:0.3. Transcurrido los catorce días se coloca la maceración en reposo sin exposición a luz y a temperatura ambiente.

El extracto se filtra utilizando la bomba de vacío y papel filtro, de tal forma que se obtiene un extracto sin partículas suspendidas.



Ilustración 9. Filtración de extracto acuoso.

Etapa 3: Medición de la capacidad antioxidante.

Se prepara una solución 0,5 mM de DPPH con etanol de 96° rectificado extraneutro, para esto se pesa 49 mg de DPPH y se afora con 250 mL de etanol de 96° rectificado extraneutro, la solución se coloca en frasco ámbar cubierto de papel aluminio y se mantiene en refrigeración.



Ilustración 10. Reactivo DPPH pesad.

Curva de Calibración

La curva de calibración se realiza utilizando ácido ascórbico puro, realizando una dilución en la que se pesa 25 mg de ácido ascórbico puro y se afora en un balón de 25 mL con etanol de 96° rectificado extraneutro.



Ilustración 11. Ácido ascórbico pesado.

Preparación de muestras

Se realiza una dilución 1:10 para esto se extrae 1 mL de cada extracto y se afora en un balón de 10 mL con etanol de 96° rectificado extraneutro.

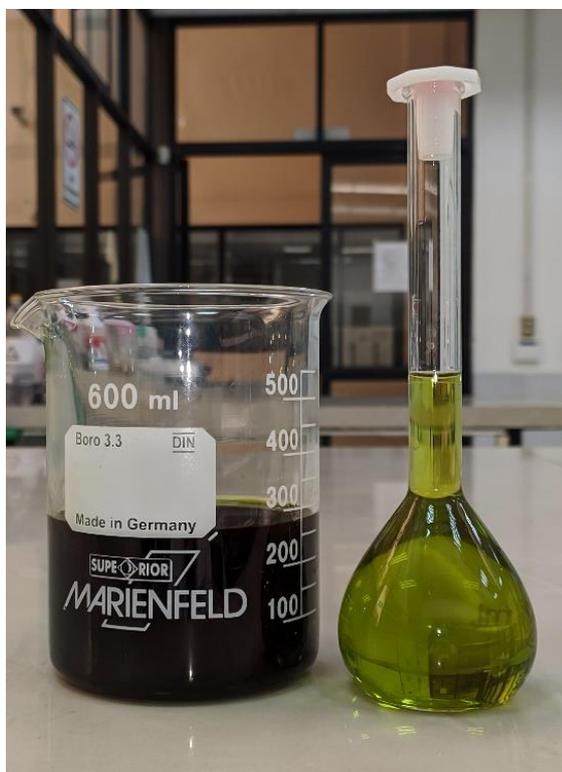


Ilustración 12. Extracto diluido.

Medición de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH.

El equipo que se utiliza para el análisis de la actividad antioxidante es el espectrofotómetro UV-VIS, la longitud de onda empleada es de 517 nm, el equipo se encera con etanol antes de la lectura de las muestras.



Ilustración 13. Espectrofotómetro.

Preparación de fracciones

Tabla 3. Fracciones estándar para análisis.

Frascos	Muestras uL	Concentración (ug/mL)	DPPH mL	Etanol 96°
Blanco	-	-	2.9	100
1	1	0,333	2.9	99
2	5	1.667	2.9	95
3	10	3.333	2.9	90
4	20	6.667	2.9	80
5	50	16.667	2.9	50
6	80	26.667	2.9	20
7	100	33.333	2.9	0

Fuente: Autor

Preparadas las fracciones se colocan en frascos ámbar, se cubren con papel aluminio y se mantienen a temperatura ambiente, de manera simultánea deben agitarse a 200 rpm durante una hora.



Ilustración 14. Fracciones almacenadas en frascos ámbar.

La absorbancia se mide en orden ascendente partiendo desde el blanco, la lectura se realiza a una longitud de onda de 517 nm.



Ilustración 15. Lectura de actividad antioxidante.



Ilustración 16. Celdas post lectura.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición el cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración (ver ecuación 3) (Muñoz Juárez, 2009).

$$\%Inhibición = \frac{A - A1}{A} * 100$$

Ecuación 3

Donde:

A= Absorbancia del blanco

A1= Absorbancia de la muestra

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recolección de muestra vegetal

4.1.1 Obtención del extracto alcohólico total

De las 30 muestras de podando del 25% del área foliar de plantas de café seleccionadas se obtuvo 100 g de materia vegetal seca y molida de la cual 30 g se utilizaron para obtener por método de maceración 400 mL de extracto alcohólico purificado y filtrado.

4.1.2 Obtención del extracto acuoso total

De las 30 muestras de podando del 25% del área foliar de plantas de café seleccionadas se obtuvo 100 g de materia vegetal seca y molida de la cual 30 g se utilizaron para obtener por método de maceración 400 mL de extracto acuoso purificado y filtrado.

4.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante se realizó de cada extracto respectivamente por triplicado para así obtener una mayor cantidad de resultados con la cual se pueda establecer que solvente es el apropiado para realizar extractos de hoja de *Coffea arabica*.

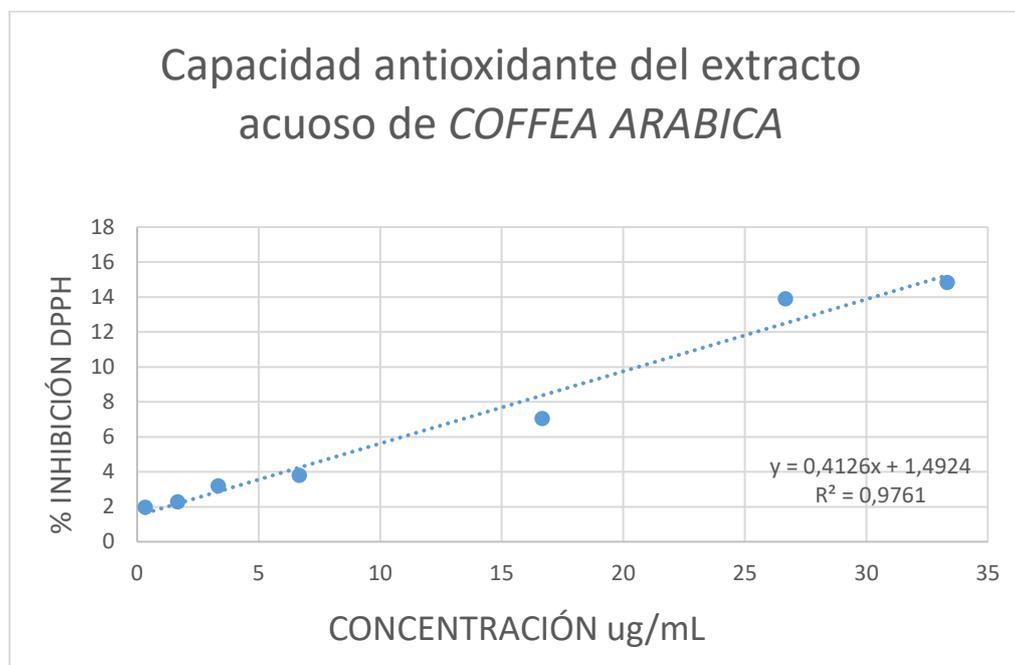
4.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso

Tabla 4. Resultados de análisis extracto acuoso.

uL de extracto	Concentración (ug/mL)	Absorbancia 517 nm			Promedio	Inhibición (%)
BLANCO		2.4874	2.513	2.5022	2.5009	
1	0.333	2.4763	2.4268	2.451	2.4514	1.9793
5	1.667	2.4688	2.419	2.4438	2.4439	2.2792
10	3.333	2.454	2.3975	2.4117	2.4211	3.1909
20	6.667	2.4347	2.3772	2.4055	2.4058	3.8013
50	16.667	2.3156	2.2964	2.3615	2.3245	7.0522
80	26.667	2.159	2.1476	2.1532	2.1533	13.8992
100	33.333	2.125	2.105	2.1601	2.1300	14.8282
					IC ₅₀	117.56

Fuente: Autor

En la tabla 4, se observa que la capacidad antioxidante del extracto acuoso de las hojas de *Coffea arabica* en el punto de concentración máxima 33.333 ug/mL es de un porcentaje de inhibición de 14.8282%. El extracto acuoso de las hojas de *Coffea arabica* tiene un IC₅₀ de 117.56, esto indica una capacidad antioxidante baja, la cual debe ser comparada con el análisis del extracto alcohólico.



4.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto alcohólico

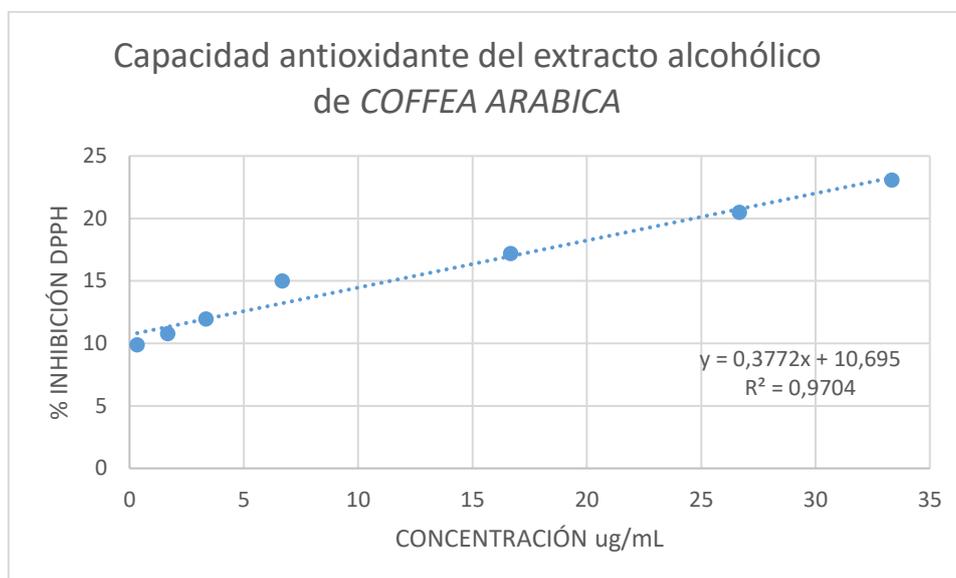
Tabla 5. Resultados de análisis extracto alcohólico.

uL de extracto	Concentración (ug/mL)	Absorbancia 517 nm			Promedio	Inhibición (%)
BLANCO		3.8917	3.8211	3.8015	3.8381	
1	0.333	3.4488	3.4686	3.46	3.4591	9.8738
5	1.667	3.4266	3.3979	3.4486	3.4244	10.7796
10	3.333	3.3882	3.3289	3.4231	3.3801	11.9339
20	6.667	3.3172	3.1173	3.3548	3.2631	14.9814
50	16.667	3.2523	2.96257	3.3195	3.1781	17.1954
80	26.667	3.1256	2.80784	3.2224	3.0519	20.4829
100	33.333	3.069	2.65311	3.1369	2.9530	23.0608
					IC ₅₀	104.21

Fuente: Autor

En la tabla 5, se observa que la capacidad antioxidante del extracto alcohólico de las hojas de *Coffea arabica* en el punto de concentración máxima 33.333 ug/mL es de un porcentaje de inhibición de 23.0608%. El extracto alcohólico de las hojas de *Coffea arabica* tiene un IC₅₀ de

104.21, esto significa que en comparación con el extracto acuoso posee una mayor actividad antioxidante.



4.4 Comparación de la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *Coffea arabica*

En este apartado se detallarán los resultados obtenidos del análisis de los extractos alcohólico y acuoso para su comparación.

4.4.1 Comparación de la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *Coffea arabica*

Análisis de dos muestras

4.4.1 Comparación entre porcentajes y valores de IC₅₀

Tabla 6. Comparación entre porcentajes de inhibición.

Extracto Acuoso	Extracto Alcohólico
1,9793	9,8738
2,2792	10,7796
3,1909	11,9339
3,8013	14,9814
7,0522	17,1954

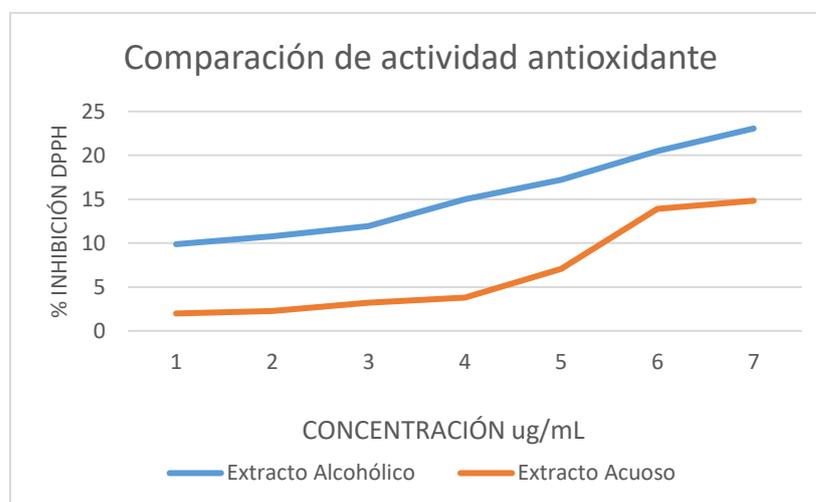
13,8992	20,4829
14,8282	23,0608

Fuente: Autor

Tabla 7. Comparación entre valores de IC_{50} .

IC₅₀ Extracto	IC₅₀ Extracto
Acuoso	Alcohólico
117.56	104.21

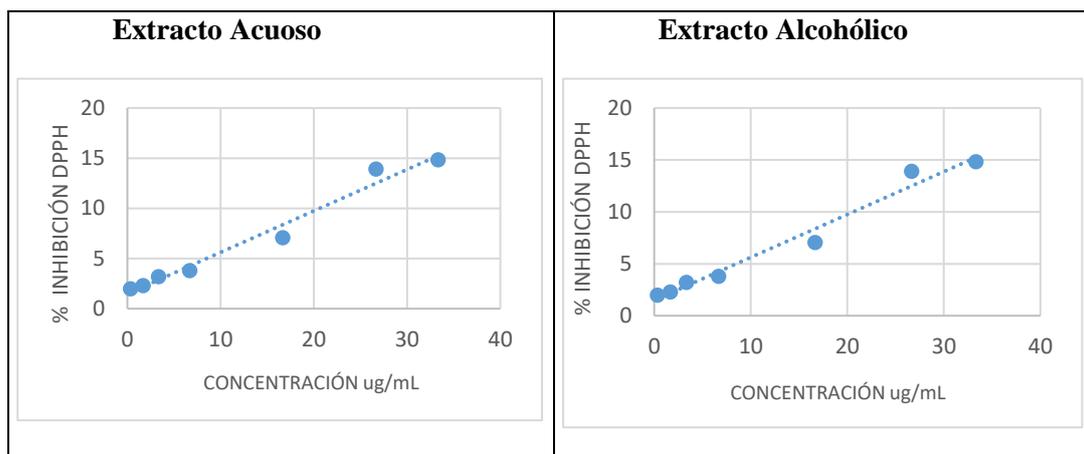
Fuente: Autor



Como se demuestra en la tabla 6, los porcentajes de inhibición en el punto más alto de concentración de la muestra -3.333 ug/mL- poseen una diferencia de 8.2326, la significancia de esta diferencia se determina mediante el cálculo del valor IC_{50} .

En la tabla 7, evidencia una diferencia entre los valores de IC_{50} de los extractos alcohólico y acuoso de 13.35, lo cual indica una valor a favor hacia el extracto acuoso sin embargo dicha diferencia no es lo suficientemente amplia como para asegurar que dicho extracto posee una actividad antioxidante superior, por tanto se puede afirmar que la diferencia entre la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la hoja de *Coffea arabica* no representa una diferencia significativa.

Tabla 8. Tendencia de los porcentajes de inhibición de los extractos Alcohólico y Acuoso.



Fuente: Autor

En la tabla 8 se puede evidenciar que en el caso de ambos extractos los porcentajes de inhibición siguen una linealidad en ascenso.

Tabla 9. Validación de hipótesis.

<p>Hipótesis nula</p> <p>El extracto alcohólico de las hojas de café arábigo <i>-Coffea arabica-</i> posee mayor actividad antioxidante debido al tipo de solvente empleado.</p>	<p>Valor de significancia de 0.05</p> <p>P valor 0.0020</p>
<p>Hipótesis alternativa</p> <p>La diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso no representa un margen de diferencia significativo.</p>	<p>Valor de significancia de 0.05</p> <p>P valor 0.0020</p>
<p>Hipótesis aceptada</p> <p>La diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso no representa un margen de diferencia significativo.</p>	

Fuente: Autor

En la tabla 9 se evidencia que en base a las diferencias planteadas anteriormente el análisis estadístico determina que con un p valor de 0.0020 el cual es menor en relación al valor de significancia de 0.05, por este motivo se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

La diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso no representa una diferencia significativa.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Mediante el análisis y comparación de la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la hoja de café arábigo *-Coffea arabica-* se puede concluir lo siguiente.

Por el método DPPH se determinó que el extracto que presenta una mayor capacidad antioxidante es el alcohólico con un valor IC_{50} de 104,21 y un porcentaje de inhibición de 23.07 en el punto más alto de concentración, esto frente a un valor de IC_{50} de 117,56 y 14.82 como porcentaje de inhibición obtenidos por el extracto acuoso.

La diferencia entre la capacidad antioxidante de ambos extractos mediante el método estadístico -análisis de dos muestras- se determinó un P valor de 0.002 el cual es menor que el valor de significancia de 0.05, por esta razón se acepta la hipótesis alternativa lo cual indica que la diferencia entre la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso no representa un margen de diferencia significativo.

Por medio del presente trabajo de investigación se pudo concluir que existe una diferencia entre la capacidad antioxidante del extracto alcohólico respecto del acuoso, sin embargo, mediante el análisis estadístico se determinó que dicha diferencia no representa un margen significativo por tanto el uso de alcohol o agua como solvente para la extracción de metabolitos de la hoja de café arábigo *-Coffea arabica-* dependerá del uso final sin que afecte la capacidad antioxidante.

5.2 RECOMENDACIONES

Durante la elaboración de los extractos por maceración se debe tener especial atención en evitar la contaminación cruzada, esto con el fin de evitar que los extractos sean inutilizables debido a sustancias extrañas ya que esto evitaría que los análisis puedan llevarse a cabo.

La precisión en cantidades de compuestos y extracto debe tener la mayor exactitud posible ya que de lo contrario los análisis y comparaciones adquieren mayor complejidad por cálculos y conversiones que requerirían.

Las normas de bioseguridad que normalmente se utilizan al trabajar en un laboratorio toman más importancia y complejidad debido a la situación actual de la pandemia, la Universidad Politécnica Salesiana da las pautas de bioseguridad que a nivel de laboratorio sirven para garantizar la seguridad mientras se labora en las instalaciones de los laboratorios y conllevan a directamente a garantizar resultados viables.

Por el método DPPH se debe tener especial cuidado con la exposición a luz directa, por tanto, es factible trabajar con este método en horas de baja exposición y además modificar el entorno a fin de disminuir la entrada de luz, los reactivos deben ser protegidos con papel aluminio y almacenados en entornos con la menor luz posible, la solución con DPPH diluido debe ser utilizada a brevedad y siempre estar cubierta.

Se recomienda evaluar la capacidad antioxidante de las hojas de café arábigo -*Coffea arabica*- mediante otros métodos como ABTS, además de esto realizar una colecta de muestra en estadios pre y post cosecha del grano de café.

BIBLIOGRAFIA

- Allinger, N. L. (1983). Química orgánica. Reverté.
- Alvarado, A. S. (1994). Cultivo y beneficiado del café. EUNED.
- ANUAL, D. U. C., & LEAVES, B. C. O. C. COMPOSICIÓN BIOACTIVA DE HOJAS DE CAFÉ.
- Arcila, J., FARFAN, F., Moreno, A. M., Salazar, L. F., & Hincapié, E. (2007). Sistemas de producción de café en Colombia.
- Arnao, I., Suárez, S., Cisneros, R., & Trabucco, J. (2012). Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la hojas y las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón). Revista de la Sociedad Química del Perú, 78(2), 120-125.
- Arnao, I; Suárez, S; Cisneros, R. y Trabucco, J. Miembros del C.I. Bioquímica y Nutrición - Facultad de Medicina - UNMSM. Avenida Grau 755, Lima 1 – Perú.
- Ávila, Z. G. (2001). Química Orgánica. Experimentos con un enfoque ecológico. J.
- Bailey, A. E. (2001). Aceites y grasas industriales. Reverté.
- Barreira, S. R. (2008). Crecimiento del arbolado, producción de pasto y efectos edáficos en sistemas silvopastorales fertilizados con lodos de depuradora. Efecto residual. Univ Santiago de Compostela.
- Benthath A, R. S.-G. (2008). Falvonoids in health and Disease. En Vitamin nature of
- Beyer, H., & Walter, W. (1987). Manual de química orgánica. Reverte.
- Bisset, N. G. (1994). Herbal drud and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on
- Boelcke, O. y. (1987). Plantas vasculares de la Argentina, nativas y exóticas (Vol. II).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1), 25-30.
- Bravo Díaz, L., AYUSO GONZALEZ, M. J., FERNANDEZ ARCHE, M. A., & GARCIA JIMENEZ, M. D. (2003). Farmacognosia. Elsevier, Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur S.A.
- Burns, R. A. (2004). Fundamentos de química, 1. Pearson Education.
- Carrión Jara, A. V., & García Gómez, C. R. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación*

- de eficiencia de metódica* (Bachelor's thesis).
- Cebrián, J. (2016). *Diccionario de plantas medicinales*. RBA Libros.
- Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., & Cedrón, J. C. (2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1), 57-63.
- Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, 2(1), 1-4.
- Dobislaw, E. (2004). *Formulario de licorería: métodos industriales para la fabricación de bebidas alcohólicas*. Reverté.
- Doroteo, V. H., Díaz, C., Terry, C., & Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1), 13-20.
- Echavarría, A., Regnault, H. D. A., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., de Astudillo, L. R., & Benitez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales/Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Ciencia Unemi*, 9(20), 29-35.
- Enrique Ruiz Reyes, Margarita Suarez, *Revista CENIC Ciencias Biológicas* año 2015
- falvona* (págs. 137-161). New York: Marcel Dekker.
- Fonnegra, F. G. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Universidad de Antioquia.
- Guarnizo Franco, A., & Martínez Yepes, P. N. (2009). *Experimentos de química orgánica*.
- Hernandez, A. G. D. (2010). *Tratado de nutrición/Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos/composition and nutritional quality of foods* (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana.
- Juan Carlos Cedrón de la Universidad de Ingeniería & Tecnología (UTEC). Av. Cascanueces 2281 Santa Anita, Lima 43 - Perú.
- kinetics. *Biochem Biophys Res Com*, 282(61), 1161-1168.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology*, 24(4), 691-693.
- Leitao, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 2011; 15, 127.

- methods. *Free Rad. Biol. Med*, 27(1), 11-12, 1173-1181.
- Monge-Nájera, J. (2002). *Biología general*. EUNED.
- Muñoz Juárez, M. A., & Gutiérrez, D. M. (2009). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana glauca*. Facultad Química, Universidad Autónoma de Queretaro.
- Núñez, C. E. (2008). *Comentarios sobre solventes y solubilidades de sustancias orgánicas*.
- Olaya, F., Julia, M., & Méndez, A. (2003). *Guía de plantas y productos medicinales* (No. LC-0568). Convenio Andrés Bello.
- Olson, J. A. (1996). The bioavailability of dietary carotenoids. Paper presented at the
- Palomino, O. (2001). *Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales*.
- Pannala, A. C.-e. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fastreaction
- Pinelo, M. M. (2004). Interaction among phenolics in food fortification: negative
- PITTMAN, E.D. & M.D. LEWAN, 19 94. *Organic Acids in Geological Processes*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). *Antioxidantes de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia. SA.
- Pozo Cañas, M. A. (2014). *Análisis de los factores que inciden en la producción de café en el Ecuador 2000-2011* (Bachelor's thesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador).
- Prior, R. &. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical
- Sadava, D., & Purves, W. H. (2009). *Vida/Life: La ciencia de la biología/The Science of Biology*. Ed. Médica Panamericana.
- Salgado, P. R., Favarin, J. L., Leandro, R. A., & Lima Filho, O. F. D. (2008). Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agricola*, 65(4), 354-359.
- synergism on antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem*, 52(5), 1177-1180.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Torres, L., & Andrade-Piedra, J. (2011). Manejo de malezas.
- Vera, A. L. A., & Edafología, D. P. A. Á. (2001). El boro como nutriente esencial. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*,(155), 36-47.

Víctor Hugo Doroteo, Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú.

Villagrán, C., & Castro, V. (2003). Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile. Editorial Universitaria.

XVII IVACG Meeting, 1-4.

Youngson, R. (2003). Antioxidantes y radicales libres (Vol. 132). Edaf.

ANEXOS

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
C	Carbono
AA	Actividad antioxidante
%	Porcentaje
N	Nitrógeno
O	Oxígeno
ug	Microgramo
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazilo
g	Gramo
uL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligramo

Ejemplar para recolección de muestra



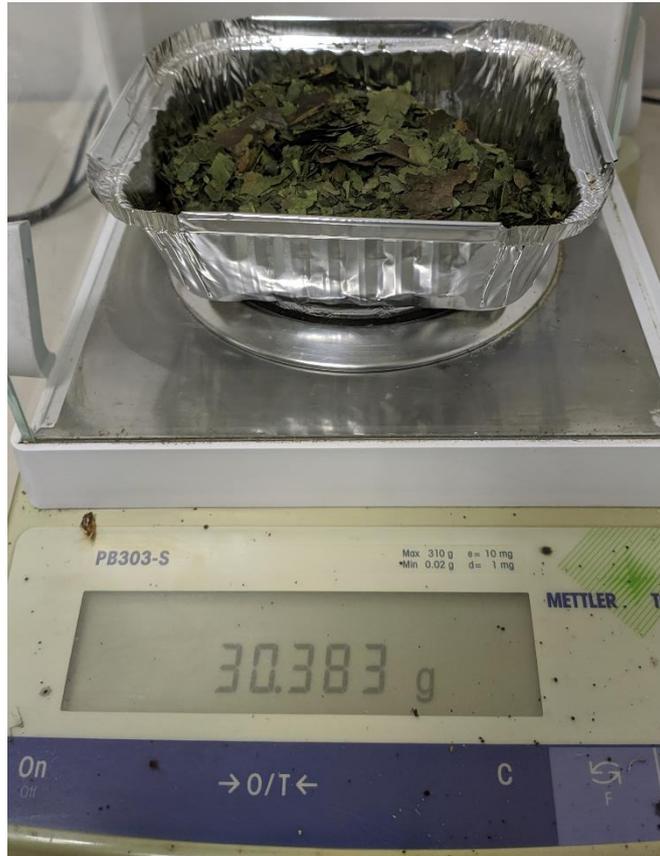
Muestra seleccionada y desecada



Muestra pesada y separada



Pesado de muestra



Extracto post 14 días de maceración



Preparación de extracto alcohólico para filtrado



Preparación de extracto acuoso para filtrado



Preparación de equipo para filtrado



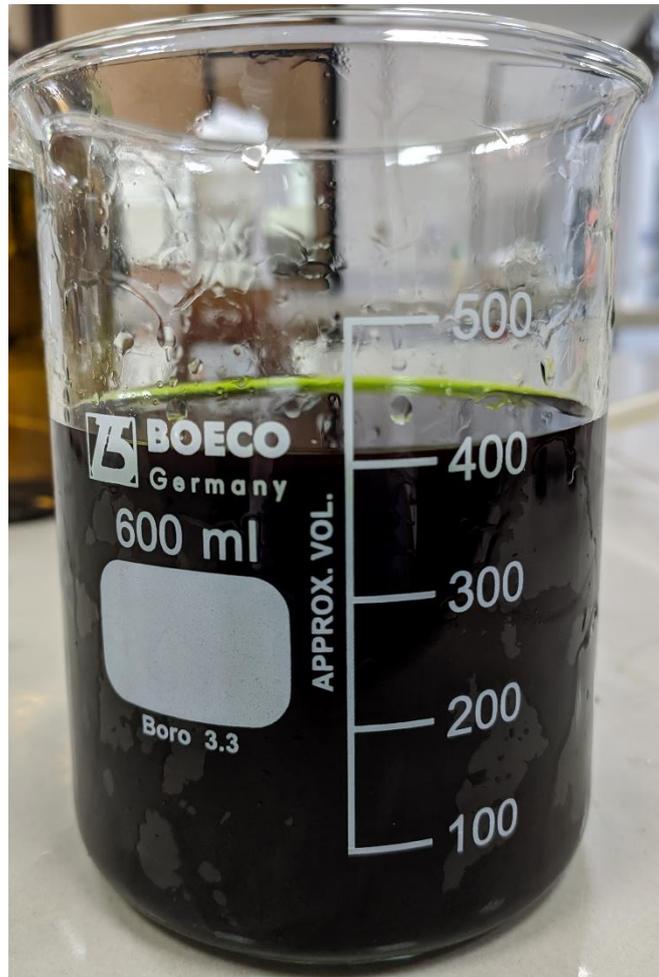
Filtración de extracto



Proceso de filtrado al vacío



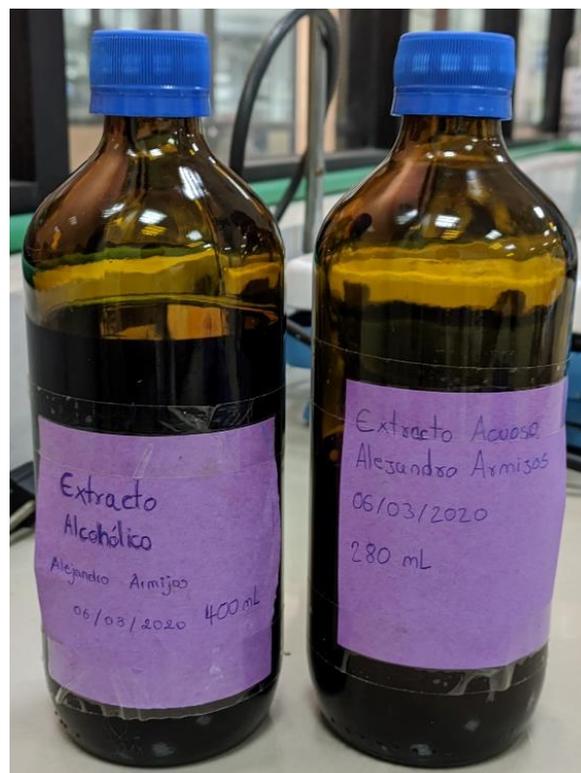
Extracto alcohólico filtrado



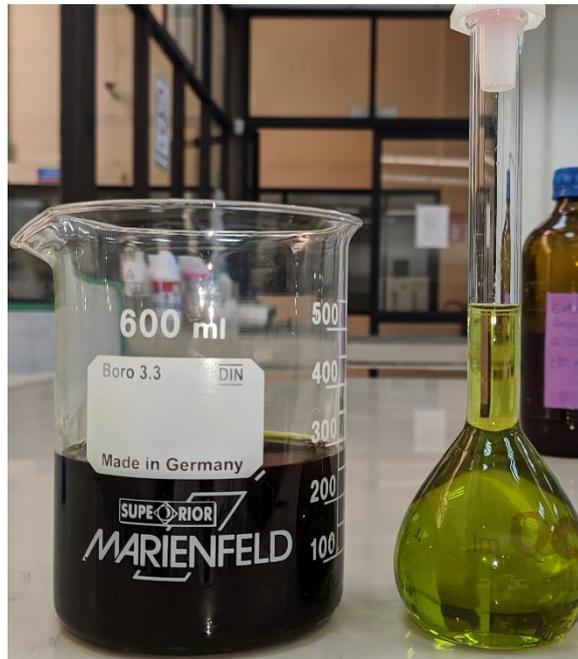
Extracto acuoso filtrado



Extractos filtrados



Extracto diluido para análisis



Reactivo DPPH



Reactivo DPPH diluido



Almacenamiento de dilución DPPH



Espectrofotómetro



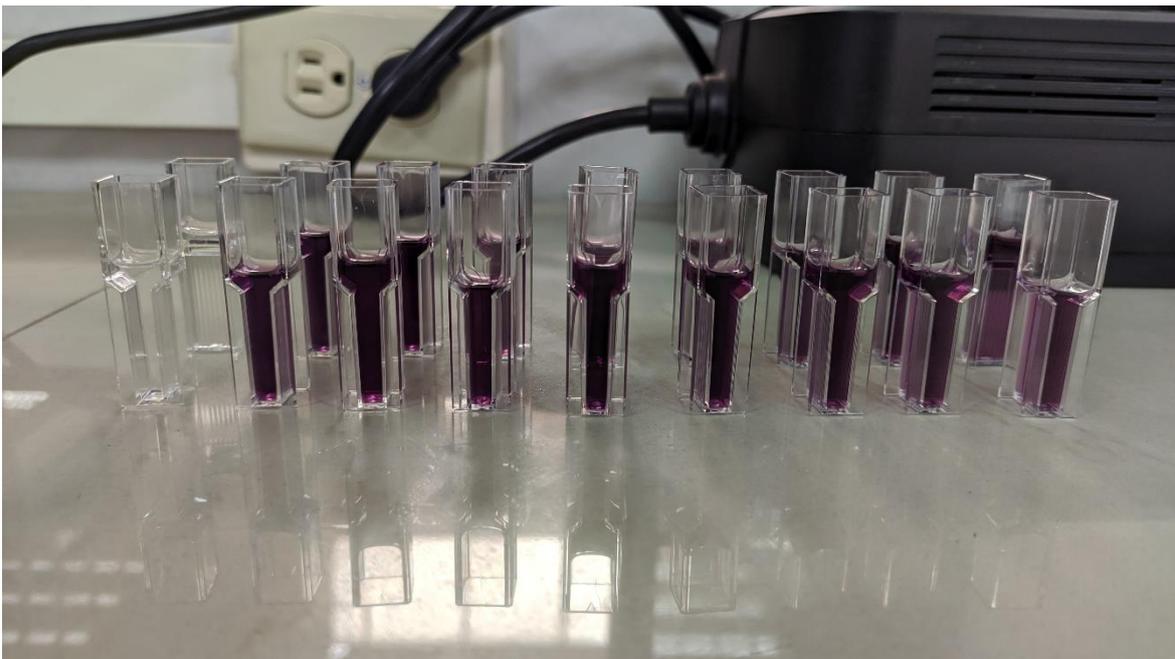
Fracciones de análisis



Análisis de extractos



Celdas post análisis



Software de análisis

