

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES  
ANTIOXIDANTES DE LA BROZA DEL CAFÉ (*COFFEA  
ARABICA*) VARIEDADES CATURRA Y CATUAÍ DE  
COSTA RICA Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA  
FARMACÉUTICA”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIATURA**

**DANIELA UREÑA CHACÓN**

**TUTOR: MELISSA MARTÍNEZ DOMÍNGUEZ**

**LECTOR: ADAM AMEY WILLIAMS**

**SAN JOSÉ, NOVIEMBRE, 2018**

## Agradecimientos

Inicialmente le doy gracias a Dios por todas las enseñanzas y bendiciones que me ha regalado en la vida, por sostener mi mano en los momentos más difíciles, por su infinita misericordia, por ser mi luz y amor, gracias por haberme dado las fuerzas y voluntad para poder concluir con esta etapa de vida profesional.

A mi padre y madre, Alexander Ureña y Leda Chacón, por su infinito apoyo durante todo mi proceso educativo. Por ser unos padres luchadores y trabajadores, que a pesar de las dificultades entregaron alma y corazón para que pudiera cumplir mi sueño, nuestro sueño. Gracias por demostrarme que a pesar de las diferencias se puede ser el complemento perfecto y que con los ojos puestos en Dios se puede lograr cualquier cosa. Los amo con todo mi corazón, nunca me cansaré de agradecerles.

Melania Ureña, mi hermanita, gracias por ser mi mejor amiga, mi apoyo incondicional, mi compañera de estudio y por demostrarme que con actitud se puede superar cualquier dificultad o adversidad, eres lo que mejor que Dios me ha dado, te amo.

A mi hermano Eduardo Ureña, por ser mi ejemplo de estudio, trabajo y perseverancia, gracias por motivarme a lo largo de mi vida y por demostrarme que a pesar de las dificultades no me puedo dar por vencida.

Caridad Zúñiga, mi viejita hermosa, quien goza de la luz eterna, gracias porque con tu dulzura y ejemplo me enseñaste que con fe nada es imposible, te extraño y amo mucho.

Efraín Chacón, mi abuelito, gracias por ser uno de mis mayores ejemplos de valentía y perseverancia, le doy gracias a Dios por tenerte a mi lado en este momento y poder compartir este triunfo contigo, te amo.

A Mariano Castro, por su cariño, comprensión, consejo y apoyo incondicional que me ha brindado durante esta etapa.

A mi primo Enrique Romero, por haberme demostrado su gran amor y pasión por lo que hace, gracias a usted pude realizar mi proyecto de tesis.

A mi amiga y compañera de la universidad, Hellen Vásquez, gracias por sus consejos, inmensa bondad y apoyo absoluto durante todo este proceso de estudio.

A mi profesora tutora Dra. Melissa Martínez, de todo corazón le doy gracias por su motivación, paciencia y dedicación durante la elaboración de este proyecto, sin usted no lo hubiera podido lograr.

## **Dedicatoria**

Le quiero dedicar este proyecto inicialmente a Dios, por haber estado a mi lado en todos los momentos de mi vida, por darme sabiduría y fuerza para poder alcanzar esta meta.

A mi padre Alexander Ureña, porque con lucha y sacrificio me permitió estudiar, entregó más de lo que podía dar con el fin de que yo pudiera alcanzar mi sueño y a mi madre Leda Chacón porque con su gran fe, apoyo, dedicación y amor me dio fuerzas en los momentos más difíciles. A los dos les dedico esta tesis, porque sin duda este logro se los debo a ustedes.

## **Pensamientos**

*“En las caídas, no pierdas el coraje, reanímame para una nueva confianza y una más profunda humildad.”*

***San Pío de Pietrelcina***

*“No hagas nada por obligación ni por compromiso, sino por amor.”*

***Facundo Cabral***

## Contenido

Tablas .....	12
Figuras .....	14
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	16
Planteamiento del problema .....	16
Objetivos .....	18
Objetivo general .....	18
Objetivos específicos. ....	18
Justificación.....	18
Antecedentes .....	22
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	30
Plantas medicinales .....	30
Etnobotánica .....	31
Farmacognosia.....	31
Fitoquímica.....	31
Fitoterapia.....	32
Fitofarmacología.....	32
Fitofármacos .....	32
Relevancia de las plantas medicinales en la industria farmacéutica.....	32
Formas farmacéuticas.....	33
Administración tópica .....	33
Cremas.....	34
Extractos vegetales y aceites esenciales .....	34
Metabolismo primario y secundario.....	35
Metabolitos primarios. ....	35

Metabolitos secundarios.....	35
Principales metabolitos que se encuentran en los extractos vegetales y aceites esenciales .....	35
Compuestos Fenólicos.....	38
Ácidos fenólicos .....	39
Flavonoides.....	41
Taninos .....	43
Método de Folin-Ciocalteu.....	45
Métodos de obtención de los aceites esenciales y extractos vegetales.....	46
Arrastre con vapor.....	47
Destilación con agua-vapor.....	48
Hidrodestilación.....	49
Rotavapor.....	50
Determinación de la composición de los extractos vegetales y aceites esenciales.....	50
Cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas. ....	50
Espectrofotometría.....	51
.....	54
Café ( <i>Coffea arábica</i> ).....	55
Partes de la planta del café.....	56
Hojas. ....	56
Flores.....	56
Fruto.....	56
Clasificación científica .....	58
Variedades del café.....	58
Historia del café en Costa Rica.....	59
Producción del café en Costa Rica .....	59

Zonas de cultivo.....	59
Variedades de café en Costa Rica.....	60
Periodos de cosecha.....	61
Procesos a los cuales se somete el café después de su recolección.....	61
Beneficiado húmedo.....	61
Despulpamiento.....	61
Secado.....	61
Molienda.....	62
Broza o cáscara del café.....	62
Utilidad de la broza del café.....	63
Impacto de la broza o cáscara del en el medio ambiente.....	63
Composición nutricional de la broza del café.....	64
Composición química de la broza del café.....	65
La piel.....	66
Epidermis.....	67
Dermis.....	68
Hipodermis.....	68
Funciones de la piel.....	68
Afecciones de la piel.....	69
Envejecimiento de la piel.....	69
Radicales libres.....	70
Radicales libres y rayos ultravioleta.....	72
Reacciones oxido-reducción o redox.....	73
Estrés oxidativo.....	73
Enfermedades asociadas al estrés oxidativo.....	74

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC.....	74
Hipertensión arterial.....	74
Enfermedades cardiovasculares.....	75
Cáncer.....	75
Antioxidantes .....	75
Control biológico de los procesos oxido- reducción .....	76
Clasificación de las sustancias antioxidantes respecto a su mecanismo de acción .....	77
Antioxidantes primarios.....	77
Antioxidantes secundarios.....	77
Antioxidantes terciarios.....	78
Clasificación de las sustancias antioxidantes respecto a su fuente de obtención .....	78
Fuentes exógenas de los antioxidantes.....	78
Fuentes endógenas de los antioxidantes.....	80
Cofactores.....	81
Sinergismo de los antioxidantes.....	81
Beneficios de los antioxidantes en la salud humana.....	81
Envejecimiento.....	82
Enfermedades cardiovasculares.....	82
Cáncer.....	83
Diabetes.....	83
Antioxidantes y otras enfermedades.....	83
Análisis de la propiedad antioxidante .....	84
Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) .....	85
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>87</b>

Enfoque .....	87
Método.....	87
VARIABLES.....	88
Instrumentos .....	89
Fase I. Recolección y almacenamiento de la broza del café.....	89
Fase II. Preparación de la muestra para su extracción.....	89
Fase III. Empleo de los métodos de extracción de Soxhlet y arrastre por vapor para la obtención del extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ).....	90
Soxhlet. ....	90
Arrastre por vapor. ....	91
Fase IV: Pruebas de identificación químicas de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ). ....	91
Fase V: Identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante espectrofotometría IR y cromatografía de gases acoplada a masas.....	92
Espectrofotometría IR modelo Agilent Technologies Cary 630 FTIR. ....	92
Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).....	92
Fase VI: Cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante el método de Folin Ciocalteu. ....	92
Fase VII: Valoración de la capacidad antioxidante del extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante el método de ORAC .....	93
Fase VIII: Elaboración de una crema con el extracto obtenido de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) .....	94
Procedimiento de recolección y análisis de los datos.....	95
Fase I. Recolección y almacenamiento de la broza del café.....	95
Fase II. Preparación de la muestra para su extracción mediante soxhlet y arrastre por vapor. ...	97
Extracción de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante el equipo de soxhlet .....	99

Extracción de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante el equipo de arrastre por vapor ...	102
Fase IV: Pruebas de identificación de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ).....	104
Gelatina y sal.....	104
Cloruro férrico. ....	104
Fase V: Identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante espectrofotometría IR y la cromatografía de gases acoplada a masas. ....	105
Espectrofotometría IR modelo Agilent Technologies Cary 630 FTIR. ....	105
Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).....	106
Fase VI: Cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ), mediante el método de Folin Ciocalteu. ....	106
Fase VII: Valoración de la capacidad antioxidante del extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante el ensayo de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno). ...	110
Fase VIII. Elaboración de una crema con el extracto obtenido de la broza del café.....	117
Fase IX: Análisis de los resultados obtenidos en el laboratorio.....	117
<b>CAPITULO IV: ANALISIS DE RESULTADOS</b> .....	119
Recolección y almacenamiento de la broza del café.....	119
Empleo de los métodos de extracción de Soxhlet y arrastre de vapor para la obtención del extracto de la broza del café.....	121
Extracción con equipo de Soxhlet .....	121
Determinación del peso del extracto de la broza del café de cada muestra. ....	123
Broza .....	124
Peso total del extracto .....	124
Microlote 8% de humedad.....	124
Convencional 8% de humedad.....	124

Convencional 75% de humedad.....	124
Determinación del porcentaje de rendimiento de la extracción por Soxhlet. ....	124
Fórmula.....	124
Extracción con equipo de arrastre de vapor.....	126
Pruebas de identificación al extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ). ....	128
Identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza del café por Espectrofotometría IR y Cromatografía de gases acoplada a masas. ....	131
Cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ), mediante el método de Folin Ciocalteu.....	140
Determinación de los mg de ácido gálico equivalentes a 100 g del extracto .....	141
Eliminación de las interferencias para obtener la concentración final de polifenoles totales ..	142
Valoración de la capacidad antioxidante del extracto de la broza de microlote al 8% de humedad del café ( <i>Coffea arabica</i> ) mediante el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) .....	146
Posible formulación cosmética a base del extracto de la broza del café ( <i>Coffea arabica</i> ) .....	152
Elaboración de una crema cosmética a base del extracto de la broza del café con propiedades antioxidantes.....	154
Gramos de extracto de la broza del café requeridos para obtener una capacidad antioxidante aproximada de 470 $\mu\text{mol}$ de Trolox/100 gramos de la preparación .....	155
Capacidad antioxidante.....	155
Polifenoles totales. ....	155
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	161
Conclusiones .....	161
Recomendaciones.....	162
REFERENCIAS .....	164

## Tablas

Tabla 1. Característica, Sustancias Activas y Función de los Compuestos Glicósidos, Terpenos y Alcaloides .....	37
Tabla 2. Fuentes Alimentarias de los Ácidos Fenólicos.....	41
Tabla 3. Características y Fuentes Alimentarias de los Flavonoides .....	43
Tabla 4. Características y Composición Nutrimientales de la Cáscara de Café de la Especie <i>Coffea arabica</i> .....	65
Tabla 5. Especies Reactivas de Oxígeno.....	71
Tabla 6. Clasificación de los Antioxidantes .....	78
Tabla 7. Diluciones Correspondientes para los Extractos .....	108
Tabla 8. Diluciones Correspondientes para la Preparación de Disoluciones Patrón de Trolox. ....	111
Tabla 9. Diluciones Correspondientes para la Preparación de los Extractos de las Muestras..	112
Tabla 10. Distribución de Pozos de Agua en la Placa del Biotek .....	114
Tabla 11. Distribución de patrones de Trolox en los pozos de la placa del Biotek .....	114
Tabla 12. Distribución de las muestras y disoluciones para determinar la capacidad antioxidante .....	115
Tabla 13. Distribución de muestras y diluciones para la determinación de capacidad antioxidante .....	116
Tabla 14. Peso Total del Extracto Obtenido de la Broza del Café ( <i>Coffea arabica</i> ) .....	124
Tabla 15. Porcentajes de Rendimiento Obtenidos Mediante Soxhlet .....	125
Tabla 16. Descripción de las Señales IR Obtenidas en el Extracto de la Broza del Café de Microlote .....	132
Tabla 17. Componentes Químicos Mayoritarios y de Interés Presentes en el Extracto de la Broza de Café de Microlote. ....	135
Tabla 18. Componentes Químicos Mayoritarios y de Interés Presentes en el Extracto de la Broza de Café Convencional. ....	138
Tabla 19. Valores de la Curva de Calibración del Ácido Gálico .....	140
Tabla 20. Resultados Detallados y Obtenidos para la Determinación de Polifenoles Totales ..	142
Tabla 21. Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de la Broza del Café de Diferentes Regiones.....	144
Tabla 22. Valores de la Curva de Calibración de Trolox.....	147
Tabla 23. Resultados Obtenidos Mediante el Método de ORAC.....	148
Tabla 24. Contenido de Fenoles Totales y Valores ORAC de Frutas Colombianas.....	150

Tabla 25. Porcentajes de los Reactivos Necesarios para la Elaboración de la Crema .....157

Tabla 26. Características de la Crema Elaborada a Base de Extracto de la Broza de Café .....157

## Figuras

Figura 1. Estructura Química del Fenol.....	38
Figura 2. Estructura Química de Algunos Fenoles Ácidos.....	40
Figura 3. Estructura Molecular de Algunos Flavonoides.....	42
Figura 4. Estructura Química de los Taninos Condensados.....	44
Figura 5. Mecanismo de Acción del Reactivo de Folin-Ciocalteu.....	46
Figura 6. Método de Extracción de Mezclas Aromáticas.....	47
Figura 7. Equipo de Destilación por Arrastre de Vapor.....	48
Figura 8. Equipo de Soxhlet.....	49
Figura 9. Unidades Estructurales que se Encuentran en Regiones Específicas del Espectro Infrarrojo.....	54
Figura 10. Planta de Café.....	55
Figura 11. Partes del Fruto del Café.....	57
Figura 12. Regiones de Costa Rica en Donde se Produce el Café.....	60
Figura 13. Aspecto Físico de la Cáscara del Café <i>Coffea Arabica</i> de Costa Rica: A) Fresca y B) Seca.....	63
Figura 14. Diagrama de la Piel.....	67
Figura 15. Estructura de un Radical Libre.....	72
Figura 16. Neutralización del Radical Libre por un Antioxidante.....	76
Figura 17. Mecanismo del Método ORAC.....	86
Figura 18. Broza de Café Convencional con 75 % de Humedad.....	96
Figura 19. Broza de Café Convencional con 8% de Humedad.....	96
Figura 20. Broza de Café de Microlote con 8% de Humedad.....	97
Figura 21. Disminución del Tamaño de la Broza del Café.....	98
Figura 22. Peso de la Broza del Café para su Extracción.....	98
Figura 23. Equipo de Soxhlet Empleado en la Obtención del Extracto.....	100
Figura 24. Rotavapor.....	101
Figura 25. Equipo de Arrastre por Vapor.....	103
Figura 26. Separación de Fases Mediante el Embudo Separador.....	104
Figura 27. Espectrofotómetro IR Agilent Technologies Cary 630 FTIR.....	106
Figura 28. Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu Pharmaspec UV-1700.....	110
Figura 29. Espectrofluorómetro Biotek.....	117
Figura 30. Proceso de Secado de la Broza de Café en Coopedota R.L.....	120
Figura 31. Proceso de Secado de la Broza del Café en el Beneficio Tributos del Ota.....	121

Figura 32. Extracto con Disolvente Obtenido Mediante el Método de Soxhlet .....	122
Figura 33. Extracto Obtenido al Eliminar el Disolvente Etanol, Mediante el Rotavapor.....	123
Figura 34. Extractos Obtenidos Mediante el Método de Soxhlet: 1) Microlote 8% humedad 2) Convencional 8% humedad 3) Convencional 75% humedad.....	126
Figura 35. Extracto Obtenido Mediante Arrastre por Vapor.....	127
Figura 36. Reacción Taninos Hidrolizables con Reactivo de Gelatina y Sal.....	128
Figura 37. Prueba de Identificación de Gelatina y Sal de los Taninos Hidrolizables .....	129
Figura 38. Reacción del Fenol con el Cloruro Férrico.....	130
Figura 39. Prueba de Identificación de Polifenoles .....	130
Figura 40. Espectro Infrarrojo Obtenido del Extracto de la Broza de Café de Microlote, Mediante el Equipo de Soxhlet .....	131
Figura 41. Cromatografía de Gases Acoplada a Masas del Extracto de la Broza del Café de Microlote .....	134
Figura 42. Cromatografía de Gases Acoplada a Masas del Extracto de la Broza del Café Convencional.....	137
Figura 43. Curva de Calibración del Ácido Gálico.....	140
Figura 44. Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de la Broza del Café de dos Diferentes Regiones de Costa Rica.....	145
Figura 45. Curva de Calibración de Trolox.....	147
Figura 46. Estructura del Único Fenol Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl- Encontrado en el Extracto de la Broza del Café.....	152
Figura 47. Productos Caudalíe Paris.....	153
Figura 48. Apariencia de la Crema a Base del Extracto de la Broza del Café .....	158
Figura 49. Producto Envasado .....	159
Figura 50. Producto Terminado y Debidamente etiquetado .....	160

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

En esta investigación se pretende estudiar la composición y propiedades antioxidantes; específicamente, las que se les atribuyen a los componentes químicos que posee la broza o cáscara del café (*Coffea arabica*). Al ser este cultivo una de las principales actividades agrícolas del país y su bebida una de las más consumidas, resulta de interés este estudio porque se desea generar un valor agregado en la industria farmacéutica a este material que es considerado un desecho, contribuyendo de esta manera con el medio ambiente y con los problemas que se generan en la piel debido a la oxidación, también se busca crear un nuevo aporte económico a los productores de café.

La producción del café es una de las principales actividades agrícolas de muchas regiones a nivel mundial, es considerado como el segundo producto básico más valioso del mundo, siendo el petróleo el primero; sin embargo, su cultivo se ve afectado por diversos factores, como lo son: el clima, acidez de suelo, plagas y enfermedades, estas alteran directamente la cantidad producida por cada cosecha y, por ende, el ingreso económico de los caficultores, (Brasileiro, 2018). Respecto a ello Lacafeógrafa (2018, párr.2.) indica que los productores de café deben buscar diferentes alternativas para poder subsistir.

Así mismo, Brasileiro (2018), señala que además de las problemáticas que afectan la cantidad de la cosecha del café existe una más preocupante, la crisis en los precios mundiales de este producto, dichos precios están por debajo de los costos de producción, ello golpea fuertemente a los caficultores y compromete la sostenibilidad económica de la producción en varios países, por esta razón resulta importante buscar solucionar mediante innovadoras ideas.

Castellas, Cely, Caedozo y Leroy (2017), mencionan que debido al interés que ha despertado compensar los factores que afectan en la producción del café se ha determinado que durante los procesos del beneficiado de este fruto se obtienen diversos subproductos como la cáscara, la cual no genera utilidad y más bien es considerada desecho, por lo que se deposita en los ríos, provocando contaminación y alteraciones nocivas en el ecosistema, respecto a esto Rosales y Rodríguez (2018, p.12.) expresan: “El producto como tal genera un efecto negativo ambiental con los desechos no tratados, esto genera un impacto ambiental importante”; sin embargo, se ha

determinado que estos materiales son una fuente de sustancias con actividad antioxidante por lo que se les podría generar un beneficio.

Estos antioxidantes pueden ayudar a retrasar el envejecimiento, enfermedades y manchas en la piel de los seres humanos, porque estas alteraciones son producidas por un mecanismo muy complejo en el que intervienen simultáneamente diversos factores exógenos (luz del sol, alérgenos, estrés) y endógenos (las condiciones genéticas y alteraciones en las características de la piel), debido a ello el autor Honorato (2009) indica lo siguiente “Hay dos procesos que intervienen de una forma directa en el envejecimiento de la piel. Son la glicación, que favorece el envejecimiento de la piel a través de la degradación tisular, y la oxidación, que produce una degeneración celular” (p.101).

El envejecimiento de la piel ha sido y sigue siendo una constante histórica, que afecta a todos los seres vivos los cuales han tratado de combatirlo de distintas maneras, con el paso del tiempo muchas partes del organismo sufren de alteraciones en sus células como lo son el estrés oxidativo, que se genera debido a factores tanto internos como externos. Ruiz y Morales (2015, pág. 183) indican que el evitar el envejecimiento de la piel ha sido y será una de la mayores ambiciones de los seres humanos, siendo un reto para la medicina.

El oxígeno, es el causante de dicho estrés oxidativo, resulta ser una molécula imprescindible para la vida, pero su alta reactividad induce a una alteración en el equilibrio de las sustancias antioxidantes, provocando así importantes variaciones negativas a nivel celular (Vega, 2006, p. 4). Debido a esta razón Viada, Gómez y Campaña (2017), destacan lo siguiente: “La naturaleza ha desarrollado sistemas de control, los sistemas antioxidantes, que neutralizan los cambios producidos por el oxígeno y otras sustancias a escala celular” (p.17), por esta razón resulta importante el aprovechamiento y obtención de compuestos antioxidantes de fuentes naturales, mediante métodos de laboratorio para la elaboración de productos farmacológicos que contrarresten dicha oxidación.

En los últimos tiempos ha surgido un enorme interés por encontrarse la utilidad a los desechos del café y por la obtención de nuevos compuestos con propiedades antioxidantes para retrasar las alteraciones en la piel, por esta razón se plantea la siguiente pregunta ¿Cuál es la composición y propiedades antioxidantes que posee la broza del café (*Coffea arábica*) variedades Caturra y Catuaí de Costa Rica, para su aplicación en la industria farmacéutica?

## Objetivos

### Objetivo general

Analizar la composición y propiedades antioxidantes de la broza del café (*Coffea arabica*), variedades Caturra y Catuaí de Costa Rica, para su aplicación en la industria farmacéutica.

### Objetivos específicos.

Identificar mediante pruebas químicas los principales componentes y sustancias polifenólicas presentes en la broza del café (*Coffea arabica*).

Cuantificar el contenido de sustancias polifenólicas presentes en la broza del café (*Coffea arabica*) mediante análisis de laboratorio.

Demostrar la capacidad antioxidante mediante pruebas de laboratorio de la extracción obtenida de la broza del café (*Coffea arabica*), para una posible formulación farmacéutica.

## Justificación

El uso de plantas con propiedades medicinales ha tenido auge en los últimos años y es una práctica que se realiza en países. Diversas industrias acuden a ellas para elaborar productos que sean medicinales y que aporten los nutrientes necesarios para el buen funcionamiento en el organismo humano, por esta razón, la llamada medicina natural se ha ido implementando cada vez más en la sociedad, esto con el fin de lograr y aportar una mejor calidad de vida (Pérez y Jiménez, 2011, pp.195-196).

Las compañías farmacéuticas están buscando sustancias alternativas de otras fuentes, como de plantas y de animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevos medicamentos, ellas contienen un reservorio de sustancias con actividades metabólicas como fenoles y sus derivados (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas) que tienen propiedades curativas, siendo así, de gran beneficio para la salud humana (Sotomayor, 2017, pp.38-39).

De acuerdo con Rosales y Rodríguez (2017, p. 12), el café es uno de los cultivos que es altamente reconocido en Costa Rica y su bebida es consumida en casi todos los hogares además es una de las actividades agrícolas más importantes. El café proporciona múltiples beneficios en la salud; sin embargo, las sustancias presentes en los materiales de desecho no son bien conocidas y no generan un aprovechamiento en el área farmacéutica, por lo que resulta apto un estudio que demuestre las propiedades beneficiosas y farmacológicas que pueden presentar estos residuos.

El café está enfrentando una de sus mayores dificultades, el precio internacional se encuentra muy bajo. Además de ello se suma una serie de problemas relacionados con el clima, mano de obra, falta de financiamiento con los cuales tienen que enfrentar los caficultores día con día (Bejarano, 2018, párr.2). La búsqueda de una solución como la que se propone en esta investigación es aceptable.

Es posible generar una utilidad cosmética a partir de los materiales que son considerados desechos del café, porque son una importante fuente de sustancias antirradicales (Puertas, Villegas y Rojano, 2013, pp. 469-471). Este análisis se enfoca en determinar estos componentes y sus propiedades antioxidantes, porque son beneficiosos para la salud humana, dando validez a los conocimientos ya adquiridos por otros investigadores y generando un valor agregado en la industria farmacéutica a estos residuos que han sido considerados como contaminantes ambientales en los países en donde se cultiva el café.

Esta contaminación ambiental es un tema al que se le ha generado mucha importancia en los últimos años debido a que se ha llegado a descubrir que muchos residuos que son producidos en industrias y que eran considerados inofensivos, han resultado ser altamente contaminantes y provocan alteraciones en el medio ambiente. Por esta razón se han realizado muchos estudios para lograr disminuir el impacto que ellos provocan, elaborando así un plan que sea apto y eficaz para el manejo de desechos; sin embargo, también se está tratando de implementar o de determinar posibles usos que se les puedan dar a estas sustancias y así generar un valor agregado, a la broza y cáscara del café. (Castellas, Cely, Caedozo y Leroy ,2017, p.43).

Como lo indican Puertas, Rivera, Villegas, Rojano y Peláez (2012, p.362), a nivel internacional han realizado diversos estudios a los residuos obtenidos en los procesos a los que se somete el café, analizado sus posibles beneficios y determinando la presencia de sustancias o nutrientes que sean gran utilidad en las industrias. Se han encontrado que presentan capacidad

antioxidante; sin embargo, se menciona que estas propiedades no son bien conocidas y que no se le genera el aprovechamiento o explotación que se debería. En Costa Rica el conocimiento sobre estas propiedades es muy pobre, por lo que este estudio resulta de gran provecho para generar un aporte en el área farmacéutica costarricense.

Los seres vivos que utilizan oxígeno para conseguir energía se ven en el peligro que sus defensas antioxidantes se vean sobrepasadas por la fuerzas oxidantes, provocando de esta manera el estrés oxidativo, el cual provoca aberraciones fisiológicas y el aceleramiento del envejecimiento, porque se genera un daño en el ADN, lípidos y proteínas, esta es una de las principales razones por la cual se generan alteraciones en la piel, para contrarrestar estos problemas se han buscado terapias y fuentes que posean compuestos antioxidantes (Doroteo, Terry, Diaz, Vaisberg y Rojas, 2012, pág. 254-263).

La piel, es uno de los órganos de los seres humanos que se ve más afectado por el estrés oxidativo y por ende a la formación de radicales libres, debido a diversos factores, entre ellos el principal es la exposición a las radiaciones solares que conducen al llamado fotoenvejecimiento. El organismo genera antioxidantes para contrarrestar estos daños; sin embargo, muchas veces se requiere del uso de distintos tratamientos que proporcionen sustancias, como los son los compuestos protectores y regeneradores, estos antirradicales se pueden obtener tanto de fuentes naturales como no naturales, por lo que el buscar nuevas fuentes que contengan estas sustancias es una buena alternativa (Concepción, Peña, Acosta y Gonzales, 2007, párr.4).

El envejecimiento de la piel es un proceso progresivo, irreversible y universal, es una realidad que aqueja a toda la humanidad, se genera debido a expresiones genéticas o a causas del medio ambiente como lo son: los rayos ultravioleta y el estrés, entre muchos más, el evitar alguno de los factores que conducen al envejecimiento de la piel, aparición de manchas, sequedad y enfermedades como el cáncer, ha despertado interés en el ser humano, porque el mismo desea una apariencia estética y saludable (Ruiz y Morales (2015, pág. 183-191). Por tal razón el brindar una alternativa de compuestos como lo son los antioxidantes que brindan protección y retraso de la aparición de estas alteraciones es de gran importancia y beneficio.

Fonseca, Calderón y Rivera (2013, pp. 228-229) destacan que es importante dar a conocer a las cooperativas, beneficios, agricultores, ambientalistas y farmacéuticos el uso y las aplicaciones medicinales, tanto del café como de sus derivados y componentes para prevenir o erradicar

enfermedades y así mismo evitar las alteraciones que se generan en la piel, como lo es el envejecimiento, a causa de los radicales libres, de esta manera, se incentiva a un mejor manejo y manipulación de estos materiales, permitiendo su aprovechamiento y no su desecho o mal uso.

## Antecedentes

El origen del café, como lo menciona Wagner (2001), en su libro “Historia del café de Guatemala” realizado en ese país, fue en el continente africano específicamente en Etiopia, en la antigüedad su fruto y uso no era bien reconocido y era considerado un simple arbusto, fue así hasta en el siglo IX en donde se comenzó a generar un aprovechamiento a este producto y se empezó a conocer y a cultivar a lo largo de muchas partes del mundo, en donde resultó ser una de las principales actividades agrícolas.

Según destaca el autor anterior, la siembra del café en Latinoamérica se comenzó en el siglo XVIII, en donde se convirtió en un importante producto agrícola de exportación. En la actualidad se cultiva en cuatro continentes, entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio. Siete de los países centroamericanos basan su economía en este cultivo, produciéndose en este continente dos veces más café que en el resto del mundo. El café ha ayudado a transformar las estructuras económicas, sociales y agrarias de naciones, los gobiernos comenzaron a dictar disposiciones de favorecimiento para este cultivo porque lo consideraban como un motor social del desarrollo.

Wagner (2001), destaca que la bebida del café fue descubierta en el siglo XVI, por viajeros europeos en donde la consideraron como una bebida exótica y estimulante y ha sido apreciada a lo largo de los años por sus propiedades medicinales. Entre los efectos destacables a los cuales se asociaban sus beneficios se encontraban: la mejora de la circulación sanguínea, dilatación de los vasos del cerebro, estimulación de las funciones intelectuales y regulación de las funciones digestivas.

Como lo indica Jiménez (2013) en su libro “ El café en Costa Rica”, el primer país centroamericano en donde se intensificó el cultivo del café y se logró convertir en el principal producto de exportación fue en Costa Rica en la década de 1840, pero no fue porque en este país se buscara suplir el consumo doméstico, sino más bien porque Costa Rica era una nación muy pobre y solo tenía un pequeño volumen de exportación de unos pocos productos, el café planteaba esa posibilidad de ingreso económico, porque era considerado un típico producto de exportación. Además, tenía un alto precio en los mercados del exterior.

Como lo menciona Gómez (2010), en su estudio “Cultivo y beneficio del café” realizado en México, destaca que el fruto del café es sometido a diversos procesos para su recolección y

obtención de la bebida; sin embargo, en los métodos a los que es sometido se obtienen diferentes subproductos que, en siglos pasados, no se les generaba un aprovechamiento útil y comenzaron a ser una fuente importante de contaminación y problemas ambientales. En el último siglo se ha tratado de encontrar sus beneficios en el área alimenticia y en la salud humana.

No obstante, en la investigación de Naranjo, Velaz y Rojano (2011), titula como “Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades”, mencionan que a lo largo de los años nuestros ancestros han logrado comprobar que no solo la bebida del café posee propiedades medicinales sino también los subproductos que se obtienen en los procesos de beneficiado del café. Se ha determinado su relación beneficiosa con la salud, logrando evidenciar que estos subproductos presentan posibles actividades antioxidantes, anticarcinogénicos y antimutagénicas.

A continuación, se mencionarán los antecedentes internacionales que respectan a dicha investigación.

Los subproductos que se obtienen a partir del beneficiado del café resultan ser altamente contaminantes para el medio ambiente, así lo afirma Rodríguez (2000), en su estudio “Manejo de residuos en la agroindustria cafetera” realizado en Perú, en donde destaca que, para controlar la contaminación potencial del agua debido a los desechos generados por el café, se debe llevar un apropiado y adecuado manejo de residuos. El autor destaca las investigaciones y usos que se han generado a partir de estos subproductos pero que se debe seguir buscando posibles e innovadoras soluciones para disminuir el impacto negativo que generan en el ambiente.

Las sustancias antirradicales han sido en los últimos años un tema estudiado y analizado, como es el ejemplo de la investigación de Núñez (2011), titulada como “Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades” elaborada en Cuba, en donde brinda información sobre las sustancias antioxidantes e importancia en la salud humana, además destaca que con ellas se están elaborando múltiples productos naturales y sintéticos, porque existe una alta concentración de los llamados radicales libres en el organismo de los seres humanos, los cuales no son beneficiosos para la salud, por lo que el interés por estos productos antioxidantes ha ido en aumento en los últimos años, eliminan o reducen la cantidad de estos radicales, previniendo alteraciones fisiológicas en el organismo humano.

Según los autores, Guala, Pérez, Barducco y Elder (2012), en el estudio “Obtención de fracciones enriquecidas durante la extracción de aceites esenciales crudos” elaborado en Chile, fundamentan información referente a los extractos y aceites esenciales obtenidos de las plantas, los cuales, corresponden a una mezcla de varias sustancias que son biosintetizadas por las mismas plantas, aportando características propias para cada una. En la investigación se mencionan los principales componentes químicos que se encuentran en los aceites crudos, así como de las propiedades que se les atribuyen, concluyen que estas sustancias pueden tener una amplia aplicación en diversas industrias.

Como lo afirman y comprueban los autores anteriores, los extractos se obtienen mediante diversos métodos, en dicho análisis mencionan las técnicas de extracción, además de que se pueden realizar comparaciones según el porcentaje de rendimiento en la obtención del material deseado, indican que se debe de considerar tanto las ventajas como las desventajas a la hora de seleccionar el mejor método, siendo la destilación por arrastre con vapor una de las más conocidas y efectivas, la cual, consiste en poner en contacto el material vegetal con vapor de agua.

Puertas et al (2012), en el estudio “Comparación entre el estado de maduración del fruto de café (*Coffea arábica L.*). El contenido de antocianinas y su capacidad antioxidante” elaborado en Colombia, menciona que las sustancias antioxidantes también se encuentran y en mayor cantidad en la piel (pericardio) del fruto, es decir, en la coloración roja, además menciona los procedimientos a los cuales se somete la cáscara para el estudio (extracción, método para determinar las sustancias y la capacidad antioxidante), se determinan las antocianinas y los polifenoles, los cuales se encuentran en distintas cantidades dependiendo del estado de maduración del café.

En el artículo de Calvo y López (2012) titulado “Ejercicio físico y radicales libres, ¿es necesaria una suplementación con antioxidantes?” elaborado en España, exponen información de suma importancia, debido a que menciona los factores que pueden llevar a la alta producción de los radicales libres y en consecuencia al estrés oxidativo, además indican las diversas alteraciones celulares que se generan debido a ellos y como resultado las alteraciones fisiológicas, aparición de distintas patologías y el envejecimiento prematuro, por lo que llegan a concluir sobre la importancia del uso o consumo de sustancias antioxidantes para erradicar los radicales.

En el estudio realizado por Doroteo, Terry, Diaz, Vaisberg y Rojas (2012), titulado como “Compuestos fenólicos y actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia aspinosa* (tara)” realizado en Perú, menciona información importante y específica sobre los efectos y daños que sufre la piel debido a la luz solar y la radiación ultravioleta, en donde se producen sustancias reactivas como el oxígeno que va dañando gradualmente el ADN, generando arrugas y cáncer. La capacidad antioxidante se determinó y comprobó mediante diversos ensayos invitro, los diferentes extractos obtenidos presentaban estas propiedades, por lo que se comprueba la importancia de elaborar un producto cosmético con capacidad antirradical.

Puertas, Villegas y Rojano (2013), en su artículo “ Borra de café colombiano (*Coffea arabica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres in vitro” elaborado en Colombia, indican la cantidad de residuos que se generan en la industria cafetalera en Colombia, por lo que el estudio se basó en determinar las principales sustancias de la borra (residuo obtenido después de la preparación de la bebida) que se caracterizan como antirradicales, mediante la espectroscopia de masas, lograron determinar que se puede generar un valor agregado en la industria farmacéutica a este residuo, debido a las sustancias antioxidantes que posee.

En la investigación realizada por Fonseca, Calderón y Rivera (2013), titulado como “Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia)”, indican la importancia y la magnitud que ha tenido a nivel mundial esta bebida, mencionan la diversidad de los compuestos bioactivos que posee y el efecto beneficioso que presentan en la salud humana, en el análisis se logran cuantificar las sustancias con capacidad antioxidante, mediante el reactivo ABTS y el de Folin-Ciocalteu, destacan que estas características antioxidantes no solo se pueden obtener de la bebida en sí, sino también de los subproductos que se generan durante los procesos a los que es sometido este fruto.

Zapata, Piedrahita y Rojano (2014), en su investigación “Capacidad de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia”, elaborada en Colombia, resaltan que las frutas y hortalizas poseen un alto potencial nutricional y terapéutico, contienen compuestos polifenólicos que están relacionados con la capacidad antioxidante, por tal razón emplean el método de ORAC (capacidad atrapadora de radicales de oxígeno) para determinar dicha capacidad

antioxidante y el método de Folin Ciocalteu para cuantificar el contenido de polifenoles, de esta manera obtienen diferencias estadísticamente significativas entre los alimentos a los cuales se les realizaron los estudios, las muestras alimentarias fueron clasificadas en tres grupos debido a su contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante: bajo ( $<100$  mg/100 g), intermedio (100-500 mg/100 g) y alto ( $>500$  mg/100 g).

Palomino y Luiz (2015), mencionan en su análisis determinado como “Capacidad antioxidante en los residuos de la industria del café”, elaborado en Brasil, que a partir de los residuos que se obtienen en la industria cafetalera se pueden encontrar compuestos fenólicos con alta capacidad antioxidante, los autores lograron determinar que el residuo que posee mayor propiedad antioxidante es la cáscara del café, por tal razón sugieren la posibilidad de su reutilización, ya que los compuestos antioxidantes tienen innumerables aplicaciones en distintas áreas como lo es la farmacéutica y alimenticia.

Existen muchos desconocimientos sobre los aportes que pueden generar las plantas, por tal razón, se han realizado estudios a nivel internacional, como en la investigación realizada por Sotomayor (2017), titulada como “Modelo de indicadores de valor agregado de plantas medicinales para elevar el potencial exportador” realizada en Perú, en donde indica la importancia de generar un buen aprovechamiento a las plantas y sus derivados, por lo que se realizó dicho estudio, en donde se proporciona información útil sobre los beneficios y propiedades que aportan y mencionan que a causa de ello son de gran interés a nivel de muchas industrias, como lo son la alimenticia y la farmacéutica.

Para obtener el extracto de la materia vegetal se emplean distintos métodos de extracción, Calle y Mendoza (2017), en su tesis “Extracción de taninos de la borra de café mediante lixiviación de Soxhlet” elaborada en Ecuador, mencionan características sobre el método de lixiviación Soxhlet. Se basa en una extracción con un disolvente orgánico, sometido a calor, volatización y condensación en donde gotea constantemente sobre la muestra y seguidamente se evapora el disolvente para obtener el producto buscado, destacan que este procedimiento es considerado como una de las técnicas más eficaces y viables para la para la obtención de aceites esenciales en comparación con otros métodos que son utilizados para la extracción de estos materiales.

De acuerdo con Rodríguez (2017), en la tesis “Determinación de polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticologensa y elaboración de una fórmula dermocosmética a partir del

extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe” elaborado en Perú, proporciona información relevante y amplia sobre el llamado estrés oxidativo, provoca una pérdida del equilibrio de las sustancias que son prooxidantes y los mecanismos que son considerados antioxidantes, en el estudio se determinan sustancias extraídas del alga *Eisenia cokeri* y mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), se comprueba que el material obtenido tiene propiedad antirradical debido a la presencia de los polifenoles y como resultado se elaboró una fórmula dermocosmética con característica antioxidante.

El autor Pérez (2017), en su estudio “Economía cafetera y desarrollo económico en Colombia” realizado en Colombia, mencionan que a lo largo de los años la producción del café se ha visto afectada por diversos factores ambientales sin duda lo que ha generado mayor problema a los caficultores es la economía del café, debido a que ha habido una contracción de precios históricos sin precedentes que ha logrado deprimir el ritmo de expansión de la industria cafetera mundial por lo que se ha limitado el poder de compra de las familias productoras, afectando el ingreso económico en varios países, el escritor destaca que es un problema que se ha repitiendo a lo largo de los años y con lo que van a tener que lidiar los productores de este cultivo, por lo que es necesario la búsqueda del cómo compensar dicha situación.

Antecedentes nacionales que respectan a dicha investigación.

De acuerdo con Agüero, Segura y Parra (2013), en su estudio “Análisis comparativo de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de cuatro marcas de tisanas de *Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*) comercializadas en Costa Rica”, proporcionan métodos para determinar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en la extracción. Emplean el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de compuestos fenólicos y el método de DPPH para identificar la capacidad antioxidante, finalmente, se comprueba la efectividad y eficacia de estos métodos ya que se logró determinar lo deseado.

Uno de los estudios referentes al tema del café, es el realizado por Vargas (2014), tiene como nombre “Prefactibilidad técnica y financiera sobre la producción y comercialización de bebida fermentada de broza de café para el beneficio de Coopetarrazú” y fue elaborado en Costa Rica, el mismo menciona la importancia de generar un aprovechamiento en el área alimenticia a los residuos que son obtenidos por el despulpamiento del café, de esta manera, se plantea crear una bebida fermentada, para ello se realizó un análisis comercial sobre el impacto que tendría este vino

en el mercado, el cual resultó realmente positivo debido a que es derivada de este material que es considerado un desecho.

Jiménez (2016), en su tesis “Valoración de la pulpa del café (*Coffea arabica*) mediante la extracción de ácidos hidroxinámicos y clorogénicos” realizada en Costa Rica, destaca que la cáscara del café es una fuente potencial de sustancias antioxidantes, en dicha investigación se estudia la composición polifenólica mediante el método de Folin Ciocalteu y las propiedades antioxidantes con el método de ORAC, que posee la broza del café de Tres Ríos de Cartago, Costa Rica, determinado así que la broza del café posee una ligera capacidad antioxidante.

Vargas (2017), explica en su tesis “Efecto de la aplicación de *Lecanicullium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo del café (*Coffea arábica*)”, realizada en Costa Rica, explica el rendimiento de la producción del café que ha habido en los últimos años a nivel mundial y en Costa Rica, menciona las zonas del país en donde predomina este cultivo, así como las principales variedades cultivadas, se indican los problemas de plagas; principalmente el de la roya, el cual afecta la producción y calidad del cultivo, en este trabajo se propone una alternativa biológica para erradicar y combatir esta plaga la cual fue efectiva.

Como lo menciona Rosales y Rodríguez (2017), en su tesis “Utilización de pectinas del café (biomasa) para generar geles de uso cosmoceútico” realizado en Costa Rica, se basó en la reutilización de la cáscara del café para aprovechar sus componentes, en el estudio se determinan características aglutinantes y gelificantes de la cáscara o pectina, mediante una extracción con un rotavapor, liofilización y para estudiar las propiedades químicas del extracto se utilizaron análisis con infrarrojo, espectroscopia de masas y resonancia magnética y finalmente se logró la extracción deseada y la producción de una formulación cosmética, por lo que se le genera un aprovechamiento útil a esta fuente que se considera contaminante.

Las información antes mencionada es de utilidad para este estudio, debido a que proporciona un conocimiento profundo acerca de la importancia de los componentes que se sintetizan en la plantas, así como de su aplicación y beneficios que pueden presentar en la salud humana, además se mencionan los principales y óptimos métodos de obtención de los extractos, así como de las técnicas para identificar y cuantificar compuestos, se comprueba que en los residuos obtenidos de los diferentes procesos a los que es sometido el café se encuentran sustancias que son consideradas antioxidantes, tienen gran potencial para eliminar los llamados radicales libres,

previniendo así distintas alteraciones en la fisiología humana. En Costa Rica no se le ha generado un valor agregado en la industria farmacéutica especialmente en el área cosmética a estos materiales obtenidos del café.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

En el presente capítulo se proporcionará una idea clara del tema en estudio, se fundamentará el impacto e importancia que ha tenido la producción del café en Costa Rica y su situación económica actual, así como la composición, beneficio en la salud y posible aplicación en la industria farmacéutica del material de desecho (broza o cáscara) que se genera en el proceso al que es sometido este fruto, se brindará conceptos básicos y sustanciales sobre este tema, se proporcionará información sobre métodos y técnicas químicas que se emplean para la extracción, identificación, cuantificación y determinación de propiedades de los compuestos presentes en este material.

### **Plantas medicinales**

Se define como planta medicinal a cualquier especie que posee en su interior sustancias que son generadas por los procesos de síntesis química que sufre la planta, tales compuestos pueden ser empleados con fines terapéuticos para el alivio o prevención de alguna enfermedad, por ende, son precursores importantes para la elaboración de nuevos fármacos. Se entiende por principio activo, a aquella sustancia que posee una o varias acciones farmacológicas en el organismo. (Valverde, 2010, p.23).

A lo largo de los años, el ser humano ha tratado de obtener mediante diversas fuentes productos alimenticios y curativos, por esta razón se ha mostrado un interés por los recursos que ofrece la naturaleza, obteniendo múltiples beneficios y soluciones para los desequilibrios fisiológicos que pueden presentar. Este interés y conocimiento se ha transmitido con el paso de los años en donde el hombre ha ido perfeccionando y estudiando cada día más sobre el uso y propiedades que presentan las plantas. (Melgadero, Álvarez y Abad, 2008, p.9).

Los autores mencionados anteriormente destacan que los remedios provenientes de las plantas medicinales presentan infinidad de ventajas en comparación con los medicamentos que se obtienen mediante síntesis químicas, sin embargo, las sustancias naturales no siempre son óptimas para todas las enfermedades y personas, por lo que se debe tener especial cuidado, no abusar de ellas y tener un debido control e informar a algún profesional en salud sobre su uso.

Debido a la importancia que han tenido las plantas y sus principios activos para la prevención y curación de patologías, se han implementado diversos puntos de vista científicos para poder analizar más a fondo estas especies vegetales, generando así nuevas ramas de estudio que resultan ser de suma importancia y de conocimiento obligatorio para los investigadores de este tema, dentro de las cuales se mencionan: la fitoquímica, farmacognosia, etnobotánica, fitoterapia, fitofarmacología y los fitofármacos. (Bonilla y Pazos, 2010, p. 101). En el siguiente apartado se describirán y definirán las ramas de estudio.

### **Etnobotánica**

La etnobotánica es un término que se define como:

Una disciplina que se ocupa del estudio del conocimiento y de las conceptualizaciones desarrolladas por cualquier sociedad respecto al mundo vegetal; este estudio engloba tanto la manera como un grupo social clasifica sus plantas, como los usos que les da. (Posey,1986, citado por Bonilla y Pazos, 2010, p.2).

### **Farmacognosia**

La farmacognosia es el conocimiento de los remedios, se encarga de estudiar las materias primas que provienen de las plantas, es decir, las sustancias de origen natural que se pueden emplear para un uso medicinal. La farmacognosia abarca el estudio de las drogas minerales, animales y vegetales para su utilización en la industria farmacéutica. (Bruneton,1991, p.11).

### **Fitoquímica**

La fitoquímica se basa en determinar y cuantificar las sustancias activas presentes en las plantas medicinales. Además, proporciona los métodos químicos y analíticos que se emplean para la obtención de estos principios activos y permite realizar una clasificación de ellos. (Bravo, 2003, p. 20)

## **Fitoterapia**

La fitoterapia se encarga de establecer y agrupar en conjunto los tratamientos terapéuticos que son basados directamente de las drogas de origen vegetal, determinando la manera más sencilla en la que se pueden emplear; por medio de infusiones o por preparaciones galénicas. Esta ciencia ha revolucionado y sirve para tratar enfermedades internas como dermatológicas y cosméticas. (López, 1970, p.18).

## **Fitofarmacología**

La fitofarmacología es una disciplina que permite desarrollar nuevos e innovadores métodos para evaluar con mayor precisión las acciones que se consideran medicinales de las plantas, haciéndola fraccionada o como un todo para determinar sus partes activas. (Bonilla, Pazos, 2010, p.101).

## **Fitofármacos**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), menciona que los fitofármacos son productos que se obtienen por procesos tecnológicos adecuados, para su elaboración se emplea material vegetal que posee propiedades medicinales, son productos que han sido analizados y se conoce su eficacia y riesgo. (Cea, 2013).

## **Relevancia de las plantas medicinales en la industria farmacéutica**

Para la industria farmacéutica, las plantas medicinales y sus derivados, han sido de mucho interés, debido al enorme contenido de sustancias que poseen, por lo que se ha llegado a implementar al mercado farmacéutico, medicamentos completamente novedosos, basados en extractos obtenidos de las plantas medicinales, para elaborarlos, se han realizado y se siguen realizando numerosas investigaciones para su desarrollo e innovación, generando de esta manera una posible y beneficiosa utilidad a estos materiales en el ser humano.

El interés de la industria farmacéutica por las propiedades que brindan las plantas se debe a la alta limitación que presentan para poder obtener medicamentos que se generen por medio de

la síntesis química, debido al elevado nivel de complejidad que presenta este método y por supuesto al alto costo económico que implica. Resulta más factible obtener sustancias ya elaboradas por las plantas, poseen las propiedades curativas, que se requieren. Además, constantemente se están estudiando y encontrando plantas o derivados de ellas que poseen moléculas bioactivas. (Pérez y Jiménez, 2011, p.196).

Como se mencionó anteriormente las plantas son fuente de muchas sustancias que resultan ser medicinales, de ellas se pueden elaborar distintas formas farmacéuticas, obteniendo así productos naturales o medicamentos. A continuación, se describirán distintos términos importantes para este estudio.

### **Formas farmacéuticas**

Según la USP 38 (2015), la forma farmacéutica se caracteriza por ser una combinación de uno o más fármacos y excipientes con el fin de facilitar la dosificación, administración y liberación de medicamento en el paciente; su diseño, material, fabricación y análisis de todas las formas farmacéuticas se centra en la calidad del producto, a estas se le puede modificar el sabor, la apariencia, el tamaño, logrando así una mayor aceptabilidad.

Por otro lado, Montero (2009), destaca que una forma farmacéutica es una disposición individualizada a las que se adaptan las sustancias medicinales (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) para construir un medicamento, los objetivos de las formas farmacéuticas son: regularizar la dosis de un fármaco, controlar su método de liberación y su disponibilidad en el tejido blanco.

### **Administración tópica**

Existen diversos tipos de vías de administración de los fármacos en donde sus diferencias se basan en el tipo de acción que se quiera que ejerza y de la manera más conveniente, por ejemplo, la vía de administración tópica utiliza la piel y las mucosas para la administración de un fármaco, la característica principal de esta vía es que se busca un efecto a nivel local, generalmente la absorción de los principios activos a nivel sistémico no es de interés para esta vía. Los excipientes fundamentales para este tipo de formulaciones de uso tópico son los líquidos, polvos y grasas, los

cuales se pueden combinar entre sí, adaptándose a las características del sitio en donde se desean administrar. (USP 38, vol. 1, 2015, p. 1403).

### **Cremas**

Las cremas, se caracterizan por ser emulsiones semisólidas, poseen más de un 20 % de agua y sustancias volátiles y menos de un 50 % de hidrocarburos, ceras o polioles como vehículos para el fármaco. Por lo general, las cremas están destinadas para su aplicación externa sobre la piel o las membranas mucosas, su consistencia es generalmente suave y untable, comúnmente, se describen como formas farmacéuticas no lavables o lavables, pueden ser de tipo A/O y de tipo O/A. (USP 38, vol. 1, 2015, p. 1404).

### **Extractos vegetales y aceites esenciales**

Los extractos vegetales y aceites esenciales son líquidos, se caracterizan por ser olorosos y ópticamente activos. Estos compuestos se consideran subproductos, se obtiene de las plantas, y es formado por el proceso de síntesis, llamado metabolismo en donde se deriva el metabolismo primario y secundario, el contenido de este material en las vegetaciones alcanza un valor máximo con condiciones climáticas soleadas y cálidas. (López, 1970, p.20). Se citarán frecuentemente a los autores Ávalos y Pérez (2009), Stashenko (2009) y Albarracín y Gallo (2003).

Estos compuestos se acumulan en los tejidos y órganos de las células vegetales, en los espacios intercelulares o debajo de la epidermis de los pelos de las glándulas, su función es característica para cada especie, son fundamentales para la supervivencia de las plantas, son consideradas sustancias muy complejas y de gran utilidad y de beneficio para la salud, debido a ello la industria farmacéutica recurre con frecuencia a estos compuestos con la finalidad de tratar distintas patologías o alteraciones fisiológicas. (López, 1970, p.20).

Las sustancias que se encuentran presentes en estos extractos vegetales y aceites esenciales, son producto del metabolismo que sufren las plantas, se concentran de manera no uniforme, solo en algunas partes de ella, por ejemplo, en las flores, corteza, semillas, rizomas o raíces, son encontradas frecuentemente en las hojas y en los tallos, su presencia va a variar mucho entre planta y planta, por ejemplo las vegetaciones herbáceas poseen de un 0,5 a 2 % promedio de este extracto en su interior. (Stashenko,2009, p. 13)

## **Metabolismo primario y secundario**

Los compuestos químicos que se encuentran en las plantas son generados gracias a los procesos de síntesis y reacciones químicas que realiza las células, dichos compuestos se dividen en dos grupos: a) metabolitos primarios b) metabolitos secundarios.

### **Metabolitos primarios.**

Los metabolitos primarios son formados por todas las plantas y se caracterizan por estar involucrados con los procesos químicos, como lo son la fotosíntesis, respiración y metabolismo de las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales son fundamentales para sus procesos fisiológicos e importante para su supervivencia. (Montero, 2009, p.22).

### **Metabolitos secundarios.**

Los metabolitos secundarios son resultantes del proceso llamado metabolismo primario. Estos compuestos secundarios parecen ser inútiles y sin ningún valor para la planta, sin embargo, sus efectos terapéuticos son destacables, se sintetizan en pequeñas cantidades y su producción es limitada dependiendo del género, familia o especie de la planta. Es sumamente importante el destacar que los metabolitos secundarios también reciben el nombre de productos naturales, porque tienen un importante valor medicinal y económico. Se han utilizado ampliamente en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia. (Ávalos y Pérez, 2009. pp.119-120).

No se ha podido determinar la utilidad específica de estos compuestos secundarios en la planta, sin embargo, se cree que cumplen con diversas funciones como el actuar en contra de depredadores, insectos, microorganismos (bacterias, virus y hongos), también se han considerado como remedios vegetales, debido a que la planta los segrega cuando presenta algún tipo de lesión, sirven para repeler o para así cumplir su ciclo reproductivo. (Stashenko, 2009, p. 13).

### **Principales metabolitos que se encuentran en los extractos vegetales y aceites esenciales**

Entre los compuestos secundarios aislados de las plantas, se destacan algunos especiales, de amplio uso en muchas industrias y que son obtenidos mediante diferentes rutas biosintéticas,

estos compuestos han sido divididos en cuatro categorías, de ellos se derivan diversas sustancias con funciones específicas. Se pueden encontrar: los terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos y glicósidos. (Ávalos y Pérez, 2009, p.120).

En la siguiente tabla se describirán las características, algunas sustancias activas y las funciones respectivas de cada una de ellas.

**Tabla 1. Característica, Sustancias Activas y Función de los Compuestos Glicósidos, Terpenos y Alcaloides**

<b>Clasificación</b>	<b>Característica</b>	<b>Sustancias activas</b>		<b>Función</b>
<b>Glicósidos</b>	Formados por un azúcar y un hidroxilo mediante un enlace glicósido.	<b>Saponinas</b>		Propiedad surfactante
		<b>Glicósidos cardiacos:</b> Digoxina		Regula la actividad cardiaca
		<b>Cianogénicos:</b> Amigdalina		Tóxico, presentes en almendras
		<b>Tioglucósidos:</b> Sinigrina		Tóxico, presentes en la mostaza
<b>Terpenos</b>	Derivan de la unión de unidades de isopreno.	<b>Diterpenoides:</b> Fitol		Forma parte de la estructura de las clorofilas
		<b>Triterpenos:</b> esteroides		Función reguladora y estructural de las membranas
		<b>Tetraterpenos:</b> Carotenoides		Antioxidantes
		<b>Politerpenos:</b> Gaucho		Fabricación de llantas
<b>Alcaloides</b>	Poseen un átomo de nitrógeno y tienen actividad biológica. Se clasifican en función de los anillos presentes en su molécula.	<b>Tropano:</b>	Atropina	Propiedad anticolinérgica
			Cocaína	Droga de abuso
		<b>Purina:</b> Cafeína		Estimulante del SNC
		<b>Isoquinolina:</b>	Codeína	Antitusivo y analgésico
			Morfina	Narcótico
		<b>Piperidina:</b> Nicotina		Droga de abuso
<b>Indol:</b> Vinblastina		Antineoplásico		

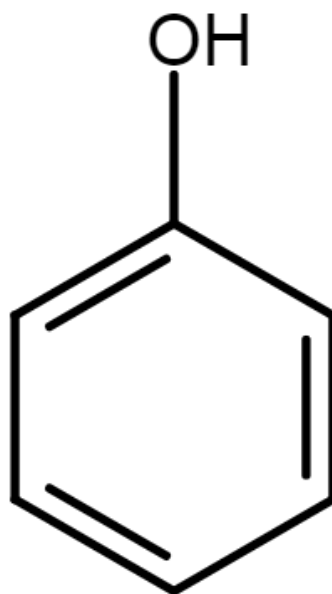
Nota: Avalos y Pérez (2009, pp. 119-145)

Otros de los compuestos o metabolitos secundarios que se pueden encontrar en las plantas son los compuestos fenólicos, poseen derivados o sustancias activas que presentan diversas funciones y que pueden ser de gran beneficio para tratar las diferentes patologías del ser humano.

### **Compuestos Fenólicos**

Los polifenoles o fenoles son compuestos químicos, sintetizados por las plantas, en su estructura molecular poseen un anillo aromático, con uno o más sustituyentes del grupo hidroxilo, son considerados sustancias polares, tienden a ser solubles en agua. Los polifenoles constituyen un grupo numeroso de sustancias, incluyen compuestos con estructuras variadas. (Tomas, 2003, citado por Rodríguez, 2017, p.10).

**Figura 1. Estructura Química del Fenol**



Nota. Avalos y Pérez (2009, p. 130)

Según menciona el autor anterior, los compuestos polifenólicos son biológicamente activos existen muchas evidencias, epidemiológicas, estudios in vitro, estudios en humanos y animales, que aseguran que dichas sustancias proporcionan un beneficio al organismo, porque proporcionan

defensa contra diversas enfermedades, entre ellas la protección contra lesiones celulares, inhibición del crecimiento de tumores, bloqueo de vías que pueden provocar el crecimiento de tumores, envejecimiento, daños en la piel y en el resto del organismo.

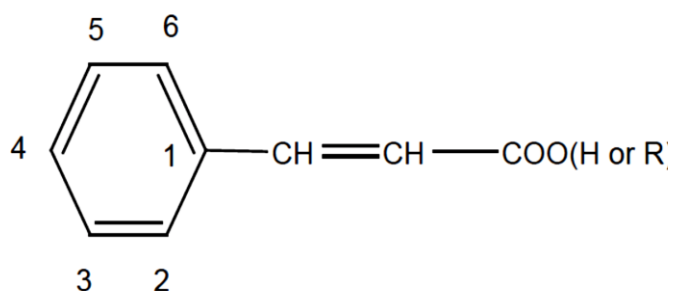
Es importante destacar que las propiedades biológicas a las cuales se les atribuye a los polifenoles van a depender de la estructura, peso molecular y los sustituyentes que presente la molécula, una de estas cualidades es la capacidad antirradical, es decir, la de captar los radicales libres, es por esta razón que son considerados sustancias con capacidad antioxidante y por ende ayudan a prevenir el envejecimiento, cáncer y aparición de enfermedades cardiovasculares. (Drago, López y Sainz, 2007, p. 59).

Los compuestos polifenólicos se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Existen, reconocidos, 8000 compuestos polifenólicos, la mayoría poseen una estructura de 3 anillos, dos aromáticos y un heterociclo oxigenado, sin embargo, se pueden encontrar compuestos polifenólicos más sencillos que poseen un solo anillo aromático, conforme aumenta el número de sustituyentes, se va incrementando la complejidad de la estructura molecular, proporcionando así, la gran diversidad de estructuras derivadas de los compuestos polifenólicos. (Mercado, de la Rosa, Wall, López y Alvarez, 2013, p. 37)

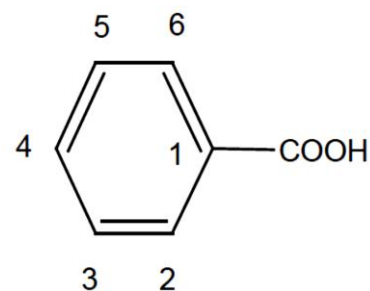
### **Ácidos fenólicos**

Los ácidos fenólicos se caracterizan por pertenecer a los grupos fenólicos más simples, que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, entre ellos se incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico, estos últimos son un amplio grupo de sustancias químicas, entre sus funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolito para el crecimiento y reproducción de las plantas. Además, participan como agentes protectores frente a distintos patógenos. (Muñoz y Ramos, 2007, p. 26).

Figura 2. Estructura Química de Algunos Fenoles Ácidos



Ácido hydroxycinámico



Ácido hydroxybenzoico

Ácido hydroxycinnámico

- Ácido cafeico 3,4 -OH
- Ácido clorogénico 3,4 -OH
- Ácido *p*-coumarico 4 -OH
- Ácido ferulico 4 -OH

Ácido hydroxybenzoico

- Ácido gálico 3,4,5 -OH
- Ácido syringico 4 -OH
- Ácido vanilico 4 -OH

Nota. Muñoz y Ramos, 2007, p. 26.

**Tabla 2. Fuentes Alimentarias de los Ácidos Fenólicos**

<b>Clase</b>	<b>Sustancia activa</b>	<b>Fuente alimentaria</b>
<b>Ácido hidroxicinámico</b>	Ácido cafeico Ácido Clorogénico Ácido Ferúlico	Granos de café, blueberry, cerezas dulces, naranja, papa blanca y uva
<b>Ácido hidroxibenzoico</b>	Ácido elágico Ácido gálico	Granada, juego de uva negra y verde

Nota. Muñoz y Ramos, 2007, p. 26.

### **Flavonoides**

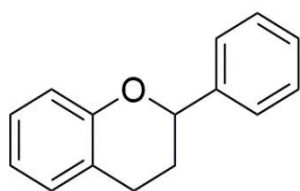
Los flavonoides son los compuestos polifenólicos que se caracterizan por presentar en su estructura molecular, tres anillos formados de dos centros aromáticos y un heterocíclico central oxigenado, dentro de estos compuestos se mencionan las catequinas, flavonas y antocianidinas, se ha demostrado que los flavonoides ayudan a prevenir la agregación plaquetaria, así como la inducción de la relajación muscular y poseen actividad antioxidante, las frutas, verduras y los vinos son la principal fuente de flavonoides. (Drago, López y Sainz, 2007, p. 59).

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y tienen una función en la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis, durante la cual, logra catalizar el transporte de electrones, su formación se da a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. Dichos compuestos fenólicos cumplen un papel importante en las plantas porque regulan su metabolismo. (Drago, López y Sainz, 2007, p. 59).

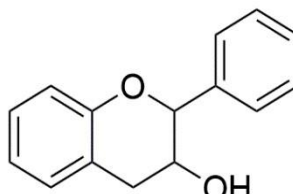
Se conocen más de 5000 compuestos de flavonoides en la naturaleza, muchos de ellos son los responsables de las propiedades organolépticas de alimentos de origen vegetal y por ende se asocian por proporcionar la calidad a dichas especies. Avalos y Pérez (2009, p. 129). A

continuación, se mostrará la principales estructuras moleculares de los flavonoides, así como sus funciones y medios de obtención.

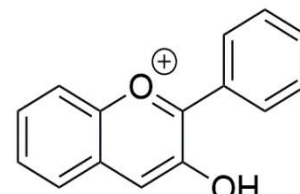
**Figura 3. Estructura Molecular de Algunos Flavonoides**



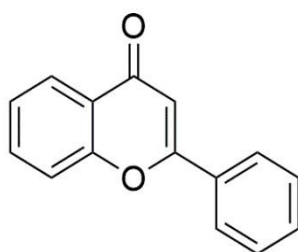
Flavonoide



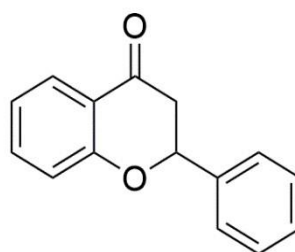
Flavan-3-ol



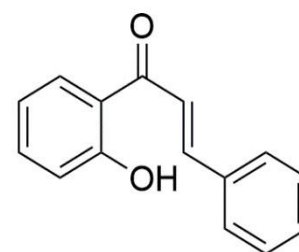
Antocianina



Flavona



Flavonona



Chalcona

Nota. Jiménez, 2017, p. 40.

**Tabla 3. Características y Fuentes Alimentarias de los Flavonoides**

<b>Sustancia activa</b>	<b>Características</b>	<b>Fuente alimentaria</b>
<b>Antocianinas</b>	Son los responsables de los tonos rojos, azules y violetas de las frutas y hortalizas Refuerzan las fuentes antioxidantes de las células	Fresas, ciruelas, uvas, berenjena, mora, rábano, repollo morado
<b>Flavononas</b>	Proporcionan un sabor amargo Neutralizan los radicales libres, fortalece la defensa antioxidante	Cítricos y naranjas amargas
<b>Flavonas</b>	Presentes en muchas especies vegetales, son los flavonoides más comunes, presentan propiedad antioxidante	Presentes en frutos con pigmentos amarillos
<b>Chalconas</b>	Son escasos, a partir de ellas se sintetizan compuestos flavonoides específicamente flavononas	Cítricos
<b>Flavonoides</b>	Contribuyen con el mantenimiento de la salud cardiaca	Té, cacao, manzanas

Nota. Cartaya y Reynaldo, 2013, p. 5-6.

### **Taninos**

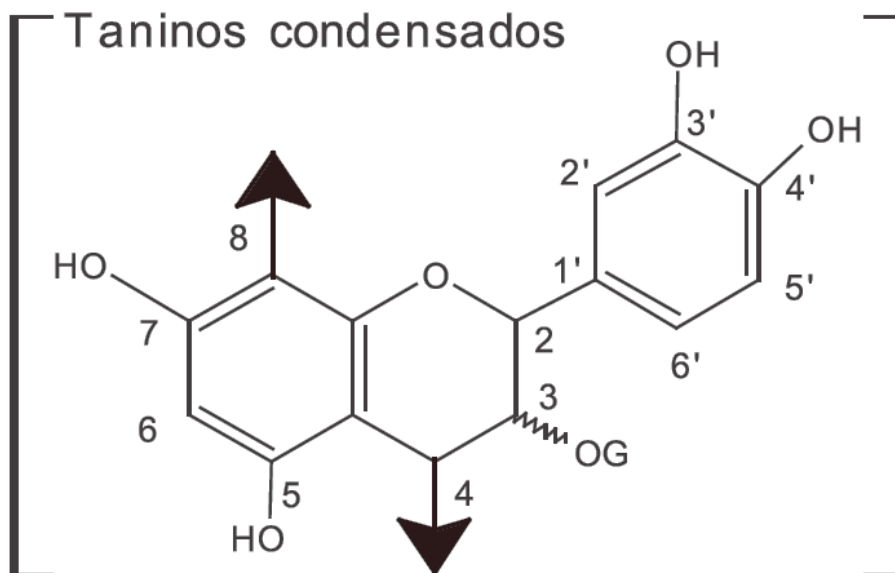
Los taninos, son sustancias amargas producidas en el interior de algunas plantas y están ampliamente distribuidos en las cortezas, frutos, hojas, raíces o semillas de especies vegetales, son capaces de formar complejos con macromoléculas y minerales sirviendo así como un mecanismo de defensa de las plantas contra herbívoros, tanto los taninos hidrolizables como los condensados,

proporcionan diversas funciones en el organismo de los seres humanos entre ellas se pueden mencionar: capacidad de astringencia (cicatrizante), antioxidante, protectores, antihemorrágico.

Los taninos son compuestos poliméricos más complejos que se clasifican en hidrolizables y condensados, los taninos que se consideran hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico y pueden estar unidos a una molécula de glucosa, mientras que los taninos condensados resultan de la condensación de unidades de flavonoles, tales como la catequina. Son formadores de diversas sustancias: como ligninas y resinas, pero también se le atribuye su capacidad moderadora de oxidaciones, presentan capacidad antioxidante, estos compuestos se pueden encontrar en lentejas, vino tinto y jugo de manzana. (Mercado, de la Rosa, Wall, López y Alvarez, 2013, p. 37)

En la siguiente figura se muestra la estructura de un tanino condensado.

**Figura 4. Estructura Química de los Taninos Condensados**



Nota. Muñoz y Ramos, 2007, p. 26.

La determinación y cuantificación de los polifenoles presentes en una muestra alimento o material vegetal se da, gracias a métodos químicos de laboratorio, los cuales permiten conocer y poder comparar el nivel de estas sustancias, debido a la cantidad de estos compuestos polifenólicos y tipos presentes, varían en función de la especie vegetal, horas de exposición al sol, grado de

madurez, procesado y condiciones de almacenamiento. Entre las técnicas de cuantificación de polifenoles se encuentra el método de Folin-Ciocalteu. (Tovar, 2013, pp.18-19)

A continuación, se enriquecerá el conocimiento sobre el método de cuantificación de polifenoles Folin-Ciocalteu. En este apartado se mencionará repetidamente a los autores García, Fernández, Fuentes (2015) y Tovar, (2013).

### **Método de Folin-Ciocalteu**

La técnica de Folin-Ciocalteu, se emplea para determinar el contenido total de compuestos polifenólicos presentes en una muestra vegetal, este método consiste en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu, a un pH básico, formando así una coloración azul, la cual se puede determinar con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm, dicho reactivo está constituido por una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico los cuales, reaccionan con los compuestos fenólicos presentes en la muestra que se está estudiando. (García, Fernández, Fuentes, 2015, pp. 4-5).

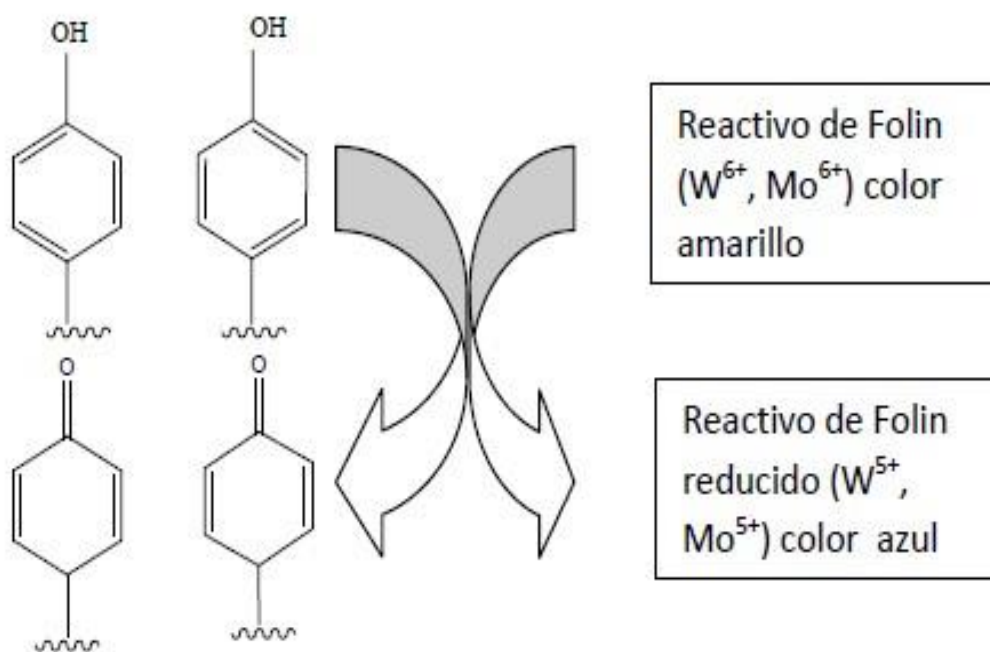
El autor anterior destaca que las dos sales que se encuentran en el medio ácido forman el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos provoca la formación de un complejo color azul intenso, dicha intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles, es importante destacar que el mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que también se podría considerar como una medida de la actividad antioxidante total.

En dicho ensayo se utiliza el buffer de carbonato, esto con el fin de ajustar el pH y el punto final de reacción se alcanza a los 120 minutos aproximadamente a temperatura ambiente. En diferentes estudios se varía la concentración del reactivo, alcalinidad y temperatura, para buscar una reducción significativa del tiempo necesario para llegar al estado estacionario. En diferentes ocasiones se ha remplazado el buffer de carbonato por una solución de hidróxido de sodio, de esta manera se disminuye el tiempo de reacción a aproximadamente cuatro minutos, consiguiéndose de igual manera datos altamente confiables. (Tovar, 2013, p.18)

La oxidación que sufren los polifenoles presentes en la muestra provoca la aparición de una coloración azul, la cual presenta una absorción máxima a 765 nm y se cuantifica por la espectrofotometría y mediante una recta patrón con ácido gálico. (Tovar, 2013, p.18), respecto a

ello los autores, García, Fernández, Fuentes (2015), destacan lo siguiente “Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción” p.5.

**Figura 5. Mecanismo de Acción del Reactivo de Folin-Ciocalteu.**



Nota. García, Fernández, Fuentes, 2015, p.5.

### **Métodos de obtención de los aceites esenciales y extractos vegetales.**

De acuerdo con Stashenko (2009, pp.1-17), existen diversos métodos químicos que son empleados para la obtención de los aceites esenciales que se encuentran en las materias vegetales, de los cuales, la eficacia y rendimiento de la extracción varía entre cada uno, por lo que se debe determinar previamente, antes de realizar una extracción cual es método más adecuado. Los diferentes procesos de extracción para la posible obtención de extractos vegetales y aceites esenciales se resumen en la figura que se muestra a continuación.

**Figura 6. Método de Extracción de Mezclas Aromáticas**



Nota. Albarracín y Gallo (2003, pp. 16-23).

En este apartado, se indicarán y describirán los principales métodos de extracción que se muestran en la figura 2, se hará énfasis a las técnicas más utilizadas y las que serán empleadas en esta investigación.

#### **Arrastre con vapor.**

El arrastre con vapor se caracteriza por emplear vapor seco, sobrecalentado, logra penetrar el material vegetal, a una presión más alta que la atmosférica, la presión provoca que se rompan las células de la planta, arrastrando el extracto que se condensa después de atravesar un refrigerante. Este proceso ocurre debido a que el agua es más densa que el aceite y este se caracteriza por ser poco soluble en ella. (Stashenko, 2009, p.17).

El objetivo principal de este método, es el separar una mezcla de varios componentes aprovechando de esta manera sus diferentes volatilidades, la destilación resulta ser una de las principales técnicas de laboratorio empleada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas u otros compuestos orgánicos arrastrables. (Stashenko, 2009, p.17).

**Figura 7. Equipo de Destilación por Arrastre de Vapor**



Nota. Stashenko, Martínez y Castrillón, 2014, p. 30.

### **Destilación con agua-vapor.**

En este método de extracción se emplea un vapor húmedo que es proveniente del agua en ebullición; permite traspasar a la planta que se encuentra suspendida en la superficie, los componentes sensibles a las altas temperaturas se separan, facilitando su obtención. La mayoría de los aceites esenciales de las plantas herbáceas se destilan u obtienen por este método. (Stashenko, 2009, p.17).

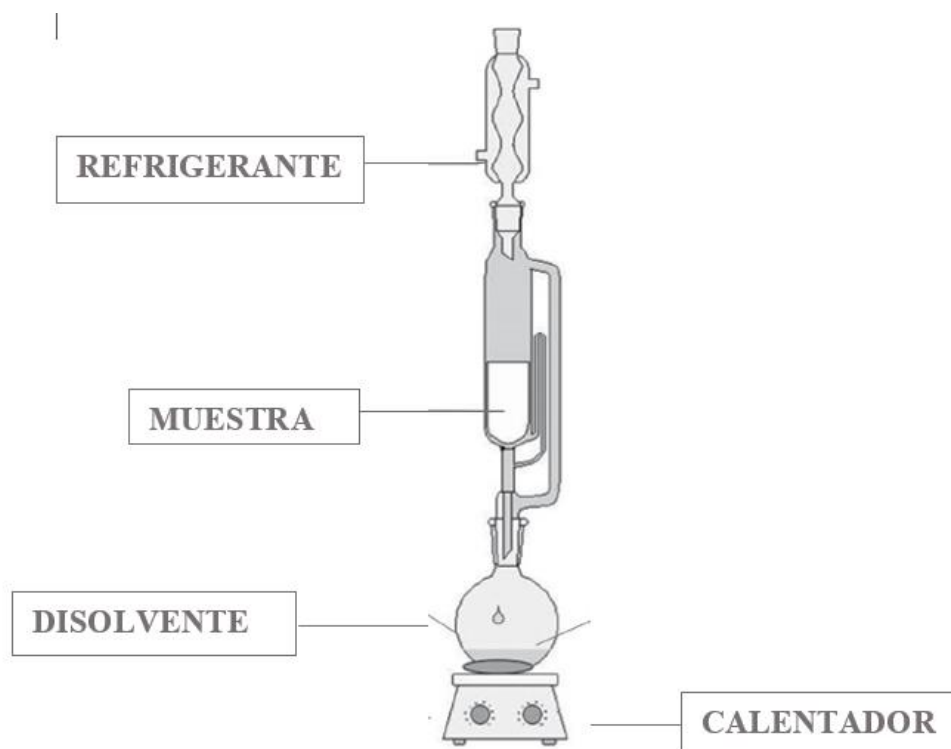
#### ***Método de Soxhlet.***

Uno de los métodos que utiliza la destilación con agua-vapor es el procedimiento de soxhlet. Este método será empleado, para la obtención del extracto vegetal de la broza del café y se describe de la siguiente manera:

El sistema de extracción de soxhlet, se compone de un balón, donde en él se encuentra un solvente es calentado hasta ebullición, un tubo de extracción de soxhlet, se coloca la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa o un filtro adaptado y un condensador, luego de

evaporarse el líquido empleado es condensado y cae al tubo de Soxhlet, en él se extrae el aceite contenido en la biomasa, hasta que el tubo se llene es sifoneado hasta el balón que contiene el resto de solvente, se repite las veces que sea necesario. (Camapaza, 2013, pp. 35-3)

**Figura 8. Equipo de Soxhlet**



Nota. Stashenko, Martínez y Castrillón, 2014, p. 30.

### **Hidrodestilación.**

De acuerdo con Stashenko (2009, p.17), la hidrodestilación es un proceso de extracción, que se basa en sumergir directamente el material vegetal en agua calentando a altas temperaturas hasta lograr la ebullición del líquido, este método es empleado para la destilación de materiales vegetales delicados, por ejemplo, las flores.

### **Rotavapor.**

Para el aislamiento y purificación de un producto obtenido se emplean disolventes orgánicos que se deben eliminar para separar dichos solventes. Requieren de equipo de laboratorio especializados, entre ellos está el rotavapor; es un aparato que emplea la destilación al vacío y permite la evaporación de un disolvente obteniendo así el extracto deseado, generalmente se utiliza una bomba de vacío y un refrigerante que recircula para condensar inmediatamente el solvente una vez separado de la muestra. Dicho equipo presenta los mismos elementos de un equipo de destilación, con la ventaja que es un procedimiento que proporciona mayor comodidad y rapidez. (Calle y Mendoza, 2017, p. 52)

### **Determinación de la composición de los extractos vegetales y aceites esenciales**

Los extractos vegetales y aceites esenciales suelen ser mezclas muy complejas y el poder identificar cada uno de sus componentes no es una tarea fácil, en tiempos pasados era un proceso muy costoso y largo, porque se requería del aislamiento y purificación sus componentes. Actualmente, existen técnicas instrumentales de análisis y el uso de computadoras y de sistemas informáticos, ha facilitado su identificación. Entre las principales técnicas se pueden citar: cromatografía de alta resolución y espectrofotometría. (Albarracín y Gallo, 2003, pp. 16-23).

#### **Cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas.**

La cromatografía de alta resolución es una técnica que se basa en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (hidrógeno, nitrógeno, argón, helio) y una fase estacionaria que está constituida por un líquido viscoso que se encuentra retenido en el interior de una columna cromatográfica. Dicha columna se coloca en un horno en donde su temperatura puede ser controlable, permitiendo la separación de los componentes que se encuentran en la mezcla. El cromatógrafo posee un sistema de inyección, que permite introducir la muestra en su interior y un detector que refleja las sustancias presentes (Albarracín y Gallo, 2003, pp. 25).

Como lo mencionan los autores anteriores, para lograr la identificación de los componentes de un aceite esencial o extracto vegetal se utilizan y comparan los tiempos de retención, siendo este el lapso que transcurre entre la inyección de la muestra y la aparición del pico en el cromatógrafo,

sin embargo, estos resultados pueden variar dependiendo de las técnicas de inyección empleadas, temperatura o alteraciones en el equipo cromatográfico. (p.25).

La cromatografía de gases es una técnica que permite conseguir la separación de mezclas complejas, sin embargo, una vez que los componentes han sido separados, detectados y cuantificados individualmente del único dato que se dispone para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención que se representa por medio de picos cromatográficos y no representa una precisión total, dicho procedimiento se acopla a la espectroscopia de masas. (Gutiérrez y Droguet, 2012, pp. 37-38)

Los autores mencionados anteriormente indican que dicha espectroscopia de masas permite identificar de manera, casi precisa, cualquier sustancia pura, proporciona un espectro el cual es característico para cada molécula y suministra información estructural sobre la molécula analizada, sin embargo, su limitante es que normalmente no es capaz de lograr identificar los componentes individuales de una mezcla sin que se hayan separado previamente sus componentes, por tal razón se han asociado las técnicas de espectroscopía de masas y la cromatografía de gases, pudiendo así mejorar la identificación de las moléculas presentes en una muestra.

La muestra que se quiere analizar se inyecta en el cromatógrafo de gases, se separa de la columna cromatográfica obteniendo los componentes individuales y los tiempos de retención de cada uno de ellos, dichos componentes pasan directamente al espectrofotómetro de masas para su identificación, dicho espectrofotómetro proporciona los espectros y actúa como detector cromatográfico al registrar una corriente iónica. (Gutiérrez y Droguet, 2012, pp. 37-38)

### **Espectrofotometría.**

La espectrofotometría permite la identificación de los componentes presentes en los extractos, se realiza en sus espectros de masa, los cuales, son obtenidos por medio de un impacto electrónico y por ionización química. Las técnicas espectroscópicas mayor utilizadas son la ultravioleta-visible y la infrarroja en donde se puede utilizar el espectro IR. (Albarracín y Gallo, 2003, pp. 26-27).

Las técnicas de espectrofotometría se basan en la absorción de energía por una molécula y logran medir la respuesta de una molécula a dicha absorción, por ejemplo en la espectrofotometría

de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtiene información sobre el esqueleto de carbonos y los hidrogeno unidos a él, mientras que el espectro IR se determina la presencia o ausencia de grupos funcionales claves, por otro lado, la espectroscopia visible (UV-VIS), establece la distribución de los electrones, en especial las moléculas que poseen sistemas de electrones  $\pi$  conjugados y en la espectrofotometría de masas se obtiene el peso y la fórmula molecular de las moléculas. (Carey y Giuliano, 2014. p.510).

Se proporcionará información acerca de la técnica de espectrofotometría IR y espectroscopia UV. Serán empleadas en este estudio.

### ***Espectrofotometría IR.***

La espectrofotometría IR es un método instrumental aplicado con frecuencia para determinar estructuras orgánicas, específicamente, grupos funcionales presentes dentro de una molécula, las unidades estructurales, vibran en modos característicos y esta sensibilidad a dichas vibraciones de grupos es la base de la espectrofotometría IR. (McMurry, 2008, pp.422-423)

La espectrofotometría IR, es un ensayo que se basa en la medida de la absorción de distintas frecuencias de la radiación del IR por sólidos, líquidos o gases, permitiendo así la identificación de sustancias con diferencias estructurales, es importante destacar que el espectro infrarrojo es único para cada compuesto. Una molécula puede absorber la radiación IR debido a cambios vibracionales, que se producen provocando movimiento de estiramiento y de flexión. (Carey y Giuliano, 2014. p.547-548)

Las moléculas poseen cierta cantidad de energía y están en movimientos constantes, sus enlaces se estiran y se contraen, los átomos se mueven de un lado a otro y provocan otras vibraciones moleculares, la cantidad de energía que contiene una molécula no es variable en forma continua, pero si puede ser cuantificada, debido a que una molécula únicamente puede estirarse y doblarse a frecuencias y niveles. (Carey y Giuliano, 2014. p.547-548)

Un espectro IR, usualmente contiene más señales de las que se pueden asignar, sin embargo, el autor anterior destaca lo siguiente “Se gana información asociando las absorciones seleccionadas con unidades y grupos funcionales particulares y observando, cuál unidad estructural se puede

excluir de la consideración, porque una señal clave que la caracteriza está ausente del espectro” p. 547.

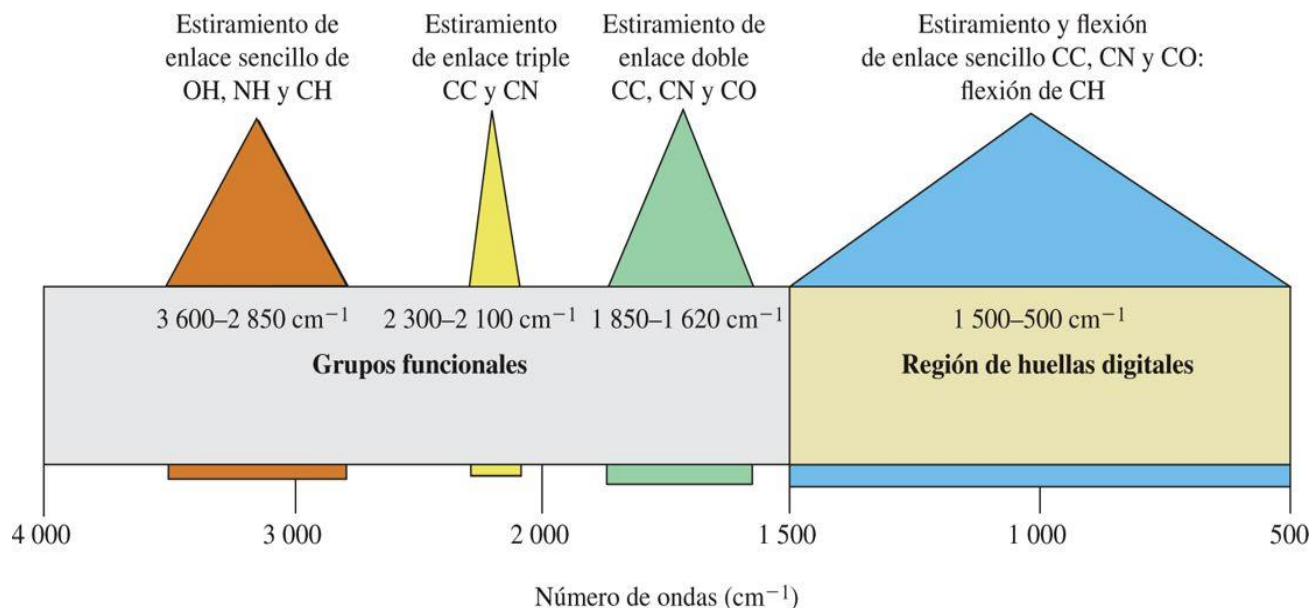
### *Interpretación de los espectros IR.*

La interpretación completa de un espectro IR es un poco complicada, debido a que la mayor parte de las moléculas orgánicas, poseen diversos tipos de estiramientos enlace y movimientos de doblamiento, por lo tanto pueden presentar diversas absorciones, no es necesario el interpretar por completo un espectro IR, para lograr obtener información estructural útil, se sabe que la mayor parte de los grupos funcionales tienen bandas de absorción características que no varían de un compuesto a otro, el conocer donde ocurren, permite obtener información estructural sobre dichos espectros.

El autor anterior enfatiza que es importante tener en cuenta que los enlaces cortos y fuertes vibran a una energía más alta y a una frecuencia mayor de lo que los hacen los enlaces largos y débiles, al igual de los resortes cortos y fuertes los cuales vibran más rápido que un resorte largo y débil, por tal razón, los enlaces triples absorben a una mayor frecuencia que los enlaces dobles que absorben una frecuencia mayor que los enlaces simples, otro aspecto a considerar, los resortes que conectan masas pequeñas vibran más rápido que los resortes que conectan masas grandes, por tal razón, los enlaces C-H, O-H y N-H vibran a una mayor frecuencia que los enlaces entre los átomos más pesados C, O y N.

En la siguiente figura se indican las unidades estructurales que comúnmente se pueden encontrar en regiones específicas del espectro infrarrojo, generalmente se hace énfasis a las señales en el intervalo de  $400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , debido a que en esta región se encuentran las vibraciones características de los grupos funcionales. La región  $1500\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$  se conoce como la región de las huellas digitales, porque en esta región el patrón de señales varía más entre compuesto y compuesto. (Albarracín y Gallo, 2003, pp. 26-27).

**Figura 9. Unidades Estructurales que se Encuentran en Regiones Específicas del Espectro Infrarrojo.**



Nota. Carey y Giuliano, 2014. p.548.

### ***Espectroscopia UV-VIS.***

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible presentan una enorme aplicación en la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies tanto orgánicas, como inorgánicas, dicha espectroscopia se basa en la medida de la transmitancia (T) o de la absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en una cubeta transparente que tiene un camino óptico de  $b$  cm. Normalmente la concentración de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia, para su determinación se emplea la llamada *ley de Beer*. (Carey y Giuliano, 2014. p.553-555).

La espectroscopia UV depende de las transiciones entre los niveles de energía electrónica y se utiliza para identificar sistemas de electrones  $\pi$  conjugados, la energía requerida para promover un electrón de un estado electrónico al siguiente se encuentra en el intervalo visible y ultravioleta del espectro electromagnético, por lo general se identifica la radiación en el intervalo UV-VIS por su longitud de onda en nanómetros, la región visible corresponde de 400 a 800 nm, las bandas de

UV-VIS se caracterizan por su absorbancia la cual sirve para medir la radiación que es absorbida cuando pasa a través de la muestra. (Carey y Giuliano, 2014. p.553).

### **Café (*Coffea arábica*)**

En este apartado se citarán frecuentemente a los autores Jiménez (2013), Calle y Mendoza (2017) y al Instituto de café de Costa Rica [ICAFFE], porque los mismos proporcionan información relevante sobre el café, variedades, beneficiado y subproductos, tanto en Costa Rica como a nivel mundial, es de suma importancia para esta investigación.

El café consiste en un grano o fruto y es uno de los productos que ha presentado mayor complejidad, debido a su historia, su comercio y su riqueza química, está conformado por diversos compuestos, entre ellos, sustancias químicas, minerales y cafeína, contribuyen con el sabor y olor de esta bebida. El café, es considerado un arbusto que en el continente africano y en algunas partes del continente asiático alcanza una altura de 12 y 14 metros, pero en América no sobrepasa de los 4 a 6 metros. Se considera como perteneciente a la familia de las Rubiáceas. (Calle y Mendoza, 2017, p.6)

**Figura 10. Planta de Café**



Nota. Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE).

Las siguientes definiciones se tomaron de Calle y Mendoza (2017) y Gómez (2010).

### **Partes de la planta del café**

#### **Hojas.**

Las hojas muestran una extensión ternadas y acompañadas de estipulas, una extensión variable y acuminadas. En su interior se encuentran papilas blandas o bastones glandulosos que secretan una substancia cerosa abundante. (Gómez, 2010, p.115).

#### **Flores.**

Las flores de la planta de café son olorosas y de color blanco, están reunidas en la axila de las hojas, encima de pedículos o pedícelas acompañadas de bractéolas frecuentemente conadas y rodeadas con las estipulas, de una glutinosa. (Gómez, 2010, p.115).

#### **Fruto.**

El fruto es considerado una drupa o blanda más o menos carnosa, encerrando dos núcleos delgados y pergaminosos, fuertes, gruesos y resistentes, convexos hacia afuera y planos hacia adentro, la cara plana presenta un surco vertical profundo que se ve reproducido en la semilla.

Seguidamente se describirán y mostrarán las capas y partes por las que está conformado el fruto del café. (Calle y Mendoza, 2017, p.17).

#### ***Pulpa.***

Es la parte de la cereza del café, es eliminada durante el despulpado, está conformada por el exocarpio (epidermis) y la mayor parte del mesocarpio. (p.17).

### ***Mucilago o mesocarpio.***

Es la parte carnosa del fruto, es de aproximadamente 0.5 mm de espesor (posee azúcares y pectinas). (p.17).

### ***El pergamino.***

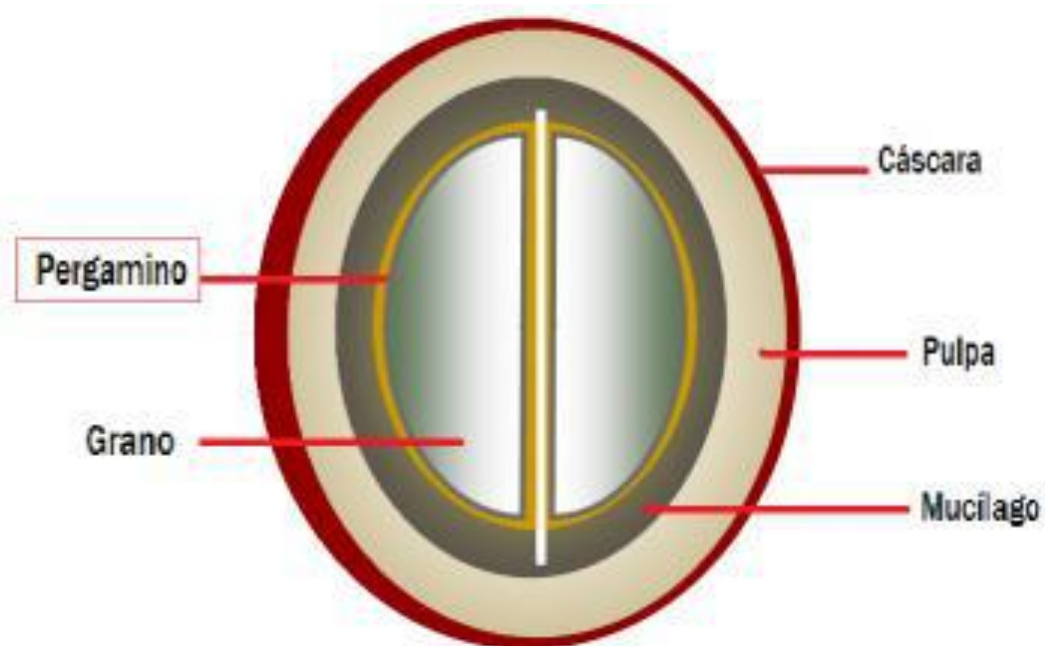
Consiste en una membrana o envoltura frágil la cual rodea el grano del café (endocarpio). (p.17).

### ***Grano de café.***

Se le asigna este nombre, siendo solamente un término comercial, porque corresponde a la semilla de la planta, es empleado para la elaboración de la bebida del café. (p.17).

En la siguiente imagen se pueden observar las distintas partes del grano del café.

**Figura 11. Partes del Fruto del Café**



Nota. Calle y Mendoza (2017, p.17).

## **Clasificación científica**

Según Jiménez (2013, p.102), el nombre científico del café es *Coffea arabica*, es considerado familia de las rubeaceas y es una de las especies más consumidas y producidas a nivel mundial, es originaria de Abisinia, Etiopia, su clasificación botánica es la siguiente:

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: Coffea

Especie: arabica

De acuerdo con el autor anterior, el café es considerado una planta tropical, cosecha una vez al año. Si a la mata del café se le proporciona un manejo adecuado, puede generar frutos durante 20 años; agrónomicamente es siempre recomendable sustituir la planta por una nueva después de dos décadas de producción, también es conveniente sustituirla por otro tipo de variedad o por un nuevo sistema de siembra. (p. 102).

## **Variedades del café**

Existen dos: café arabica (*Coffea arabica*) y café Robusta (*Coffea Canephora*), la variedad arabica es una de las variedades que más se producen a nivel mundial, representa aproximadamente un 75 % de la producción, posee propiedades y cualidades que la hacen una de las bebidas con mayor calidad, presenta un aroma afrutado aporta un agradable sabor, el *Coffea arabica* posee la mitad de la cafeína que tiene la variedad de café robusta. (Jaramillo, 2015, citado por Calle y Mendoza, 2017, p.17).

Por otro lado, los autores citados anteriormente afirman que la variedad de café robusta representa aproximadamente un 25 % de la producción mundial del café, sus granos son más redondos y circulares en comparación con el café arabica. Esta variedad proporciona un sabor más fuerte y es considerada como una bebida de menor calidad, debido a su alto contenido de cafeína, por esta razón en muchos países su siembra y producción es limitada. (p.17).

## Historia del café en Costa Rica

Según Jiménez (2013, pp. 9-11), existen muchas teorías de cuándo se comenzó a implementar la plantación de café en Costa Rica, se menciona que en el año 1779 el señor Javier Navarro, introdujo la plantación de café, canela y mango en este país y se cree que el café era considerado un producto de contrabando para su consumo, por otro lado muchos documentos históricos relatan que Costa Rica fue la primer nación centroamericana que sembró el café con fines comerciales y que su semilla fue traída de Cuba por el gobernador Tomas de Acosta en el año 1804.

El escritor anterior menciona que una de las primeras variedades que fue introducida en Costa Rica fue la llamada variedad criolla o como se le llamaba internacionalmente *typica*, especie *Coffea arabica*, la cual predominó en este país en el siglo XIX y la primera mitad del siglo XX, en este siglo se introdujo el café de la línea *bourbon*, tanto esta variedad como la *typica*, fueron sustituidas por las variedades *caturra* y *catuía*, las cuales son consideradas mutaciones y selecciones de la línea *bourbon*. (pp. 9-11).

## Producción del café en Costa Rica

### Zonas de cultivo.

En Costa Rica, la producción de café se ha ido implementado en varias regiones, difieren en las condiciones climáticas, como lo es la temperatura, humedad y precipitación, estos factores llegan a influir directamente sobre la calidad, el cuerpo y dureza de la semilla, así mismo, también se llega a afectar la proporción del contenido de diferentes componentes que se encuentran en él. (Instituto del café de Costa Rica (ICAFFE, 2018).

Son ocho las regiones en Costa Rica donde se produce el café, en las zonas bajas a menos de mil metros y en las zonas altas donde se encuentran por arriba de los 1200 metros de altitud, en estas zonas el café se caracteriza por ser es más fuerte, ácido, aromático y el contenido de sustancias y componentes es más abundante. A continuación, se muestra un mapa de las regiones en donde se siembra el café en Costa Rica. (ICAFFE, 2018).

**Figura 12. Regiones de Costa Rica en Donde se Produce el Café**



Nota. ICAFE, 2018.

### **Variedades de café en Costa Rica.**

De acuerdo con el ICAFE (2018), el café que se produce en Costa Rica es el de la especie Arabica, variedades Caturra y Catuía, debido a que presenta una mayor calidad por las características organolépticas que posee. Desde el año 1989 se ha prohibido la siembra del café Robusta porque su calidad es inferior, también se ha dejado de cultivar los Catimores, esto con el fin de preservar una mejor calidad de bebida.

### **Periodos de cosecha.**

La producción del café varía según la región, la florea se caracteriza por iniciar con las primeras lluvias del año y la cosecha es en verano, en los meses de noviembre a febrero, esto depende de las condiciones climáticas, afectan directamente su producción. La recolección del fruto es manual y de ahí es enviado a las cooperativas o beneficios del café, para ser sometido a diversos procesos y así lograr obtener el grano que será de utilidad para la elaboración de la bebida. (ICAFE, 2018).

### **Procesos a los cuales se somete el café después de su recolección**

#### **Beneficiado húmedo.**

El beneficiado húmedo se caracteriza por ser un procedimiento en donde se incluye la fermentación y el lavado del grano rojo, con ayuda de agua, permitiendo la separación de los granos ya sea por su tamaño o peso, debido a que los granos de menor calidad son los que flotan, de ahí se conducen a la despulpadora, este método ya no es muy utilizado por el gasto y contaminación de agua se ha implementado el beneficiado seco. (Jiménez, 2013, p.153).

#### **Despulpamiento.**

El proceso que le sigue al beneficiado húmedo es el despulpamiento el cual se realiza con ayuda de una despulpadora que logra eliminar la pulpa del café, dicho procedimiento consiste en presionar el fruto por medio de unas planchas fijas hasta lograr eliminar la piel roja y dejar solo el grano, la pulpa se desecha y se utiliza solo como abono orgánico, es considerada como fuente contaminante del ambiente. (Calle y Mendoza, 2017, p.20).

#### **Secado.**

Después del despulpamiento del fruto, se procede a secar el grano del café en un patio cementado, para este procedimiento se emplea la energía solar, dicho proceso requiere de mucha mano de obra debido a ello a principios del siglo XX, se comenzaron a emplear secadoras

cilíndricas rotatorias, luego se elimina el pergamino o capa que recubre la semilla y por último se tuesta el grano. (Jiménez, 2013, p.150).

### **Molienda.**

La molienda del café consiste en disminuir el tamaño de los granos ya tostados, posteriormente se dejan enfriar a temperatura ambiente para que se endurezcan, dicho producto es el empleado para la elaboración de la bebida. (Calle y Mendoza, 2017, p.30).

### **Broza o cáscara del café**

Los residuos generados por las industrias cafetaleras representan una importante fuente de contaminación ambiental y figuran como una pérdida significativa de la materia orgánica acumulada (biomasa), la cual podría ser empleada para la producción y recuperación de metabolitos que serían de un importante valor comercial y beneficio para la salud humana. Uno de estos residuos es la llamada broza o cáscara del café. (Palomino y Bianchi, 2015, p.308).

Este residuo del café representa un 42 % del total de peso del fruto que se encuentra fresco, dicho material se obtiene mediante el proceso de despulpamiento del grano, este producto resulta ser uno de los restos más voluminoso, debido a ello, se considera que por cada dos toneladas de café se obtienen alrededor de una tonelada de cáscara, la misma resulta generar un importante impacto ambiental porque su manejo y desecho no es el adecuado. (Fierro, Contreras, Gonzales, Rosas y Morales, 2018, p. 10).

**Figura 13. Aspecto Físico de la Cáscara del Café *Coffea Arabica* de Costa Rica: A) Fresca y B) Seca**



Nota. Fierro et al. (2018, p.10).

#### **Utilidad de la broza del café.**

Según destaca el autor anterior, a la pulpa del café se le debe dar un tratamiento adecuado, para así evitar los elevados problemas de contaminación en ríos y en el ambiente, se han elaborado estudios para generar un aprovechamiento útil a este material, entre ellos se mencionan: obtención de combustible, extracción de sus componentes activos: polifenoles y cafeína, elaboración de abono orgánico y alimento para animales. (Palomino y Bianchi, 2015, p.308).

Debido al contenido de sustancias polifenólicas la broza de café también ha sido considerada como un material que posee un alto contenido de sustancias antioxidantes, las cuales pueden ser beneficiosas para tratar diversas patologías del ser humano, como lo es el envejecimiento, aterosclerosis, problemas cardiacos y cáncer, sin embargo, su aprovechamiento en la industria farmacéutica no es muy amplio y poco conocido. (López, 2016, p.2).

#### **Impacto de la broza o cáscara del en el medio ambiente.**

El interés por la cáscara de café surgió por un conjunto de factores. Necesidad de alimentos para el ser humano y la industria animal, las fluctuaciones económicas del café, la broza de café ha

presentado y sigue presentando severos problemas de contaminación ambiental. En donde las políticas de control no han sido efectivas y no han provocado un impacto para que realicen investigaciones para encontrarles un posible uso. (Fierro et al. 2018, p.10).

Es importante considerar que solo un 9.5% de la materia del café es aprovechable, el resto del material es considerado desecho y no se le genera utilidad alguna, por esta razón, es depositado en los ríos y suelos. Mediante diversos estudios se ha determinado que los residuos son altamente fermentables por lo que generan olores desagradables y la proliferación de vectores en el ambiente, también provocan alteraciones en el pH y depósitos de cafeína, situación que convierte a dichas aguas residuales y a la cáscara del café como agentes contaminantes. (Londoño, 2017, p.3).

Los desechos que se producen en la industria cafetalera constituyen un elemento importante que puede generar una alteración en el equilibrio ambiental, poniendo en peligro la calidad del aire y por ende la salud del ser humano, en los procesos de beneficiado de café se generan emisiones de aguas residuales que resultan ser focos de vectores que reducen la calidad del medio, en la fase de industrialización del grano, también se generan alteraciones en la calidad del aire, dichos procesos se deben considerar no solo porque provocan variaciones químicas en el ambiente sino también por su incidencia la salud de los pobladores. (Londoño, 2017, p.3).

### **Composición nutricional de la broza del café.**

La broza de café es rica en diferentes nutrientes, los cuales pueden variar dependiendo de la especie del fruto, nivel de madurez, humedad y las condiciones a las cuales ha sido sometido, sin embargo, es de importancia consideración que en la cuantificación nutrimental de la cáscara pueden ocurrir pérdida de elementos después de haber sido despulpado, porque ésta en su proceso de descomposición puede desprender soluciones acuosas ricas en nutrientes. (Fierro et al. 2018, p.12).

En la siguiente tabla se muestran los diferentes elementos que se encuentran presentes en la cáscara del café, es importante destacar que la cantidad de dichos compuestos puede variar dependiendo de los factores mencionados.

**Tabla 4. Características y Composición Nutrimentales de la Cáscara de Café de la Especie *Coffea arábica***

<b>Variable medida</b>	<b>Unidad</b>	<b>Base seca</b>
<b>Nitrógeno (N)</b>	g kg <sup>-1</sup>	17.00
<b>Fosforo (P)</b>	g kg <sup>-1</sup>	2.48
<b>Potasio (K)</b>	g kg <sup>-1</sup>	25.13
<b>Calcio (Ca)</b>	g kg <sup>-1</sup>	4.10
<b>Magnesio (Mg)</b>	g kg <sup>-1</sup>	1.39
<b>Sodio (Na)</b>	g kg <sup>-1</sup>	2.12
<b>Boro (B)</b>	mg kg <sup>-1</sup>	11.00
<b>Cobre (Cu)</b>	mg kg <sup>-1</sup>	21.00
<b>Hierro (Fe)</b>	mg kg <sup>-1</sup>	77.00
<b>Manganeso (Mn)</b>	mg kg <sup>-1</sup>	46.00
<b>Zinc (Zn)</b>	mg kg <sup>-1</sup>	11.00
<b>Carbono total</b>	%	53.428
<b>Nitrógeno total</b>	%	1.7

Nota. Fierro et al, 2018, p.12.

#### **Composición química de la broza del café.**

La cáscara del café está compuesta por diversas sustancias químicas; se caracteriza por ser rica en nutrientes; los azúcares, proteínas, fibras, fósforo, potasio y calcio. En la cáscara se encuentran los azúcares retores como la glucosa, el contenido de dichos sustentos varía según el estado de maduración del fruto, así como de su nivel de humedad.

Además, diversos estudios químicos realizados en países americanos han demostrado que este fruto contiene distintas sustancias como lo son la cafeína y compuestos polifenólicos, a dichos agregados se les atribuyen diversas propiedades como lo son la capacidad antioxidante, cicatrizante y antimicrobiana. El contenido de estas sustancias difiere dependiendo del estado de maduración del fruto y de las condiciones a las cuales ha sido sometido. (Puertas et al, 2012, p. 362).

Braham y Bressani (1972, p. 20), indican que los valores y composición de sustancias en la cáscara de café varían de acuerdo con la variedad del café, prácticas agrícolas o técnicas de

procedimiento a las cuales han sido sometidas, sin embargo, destacan lo siguiente: "La composición química de la pulpa de café fermentada es muy similar a la de la pulpa de café " p. 20.

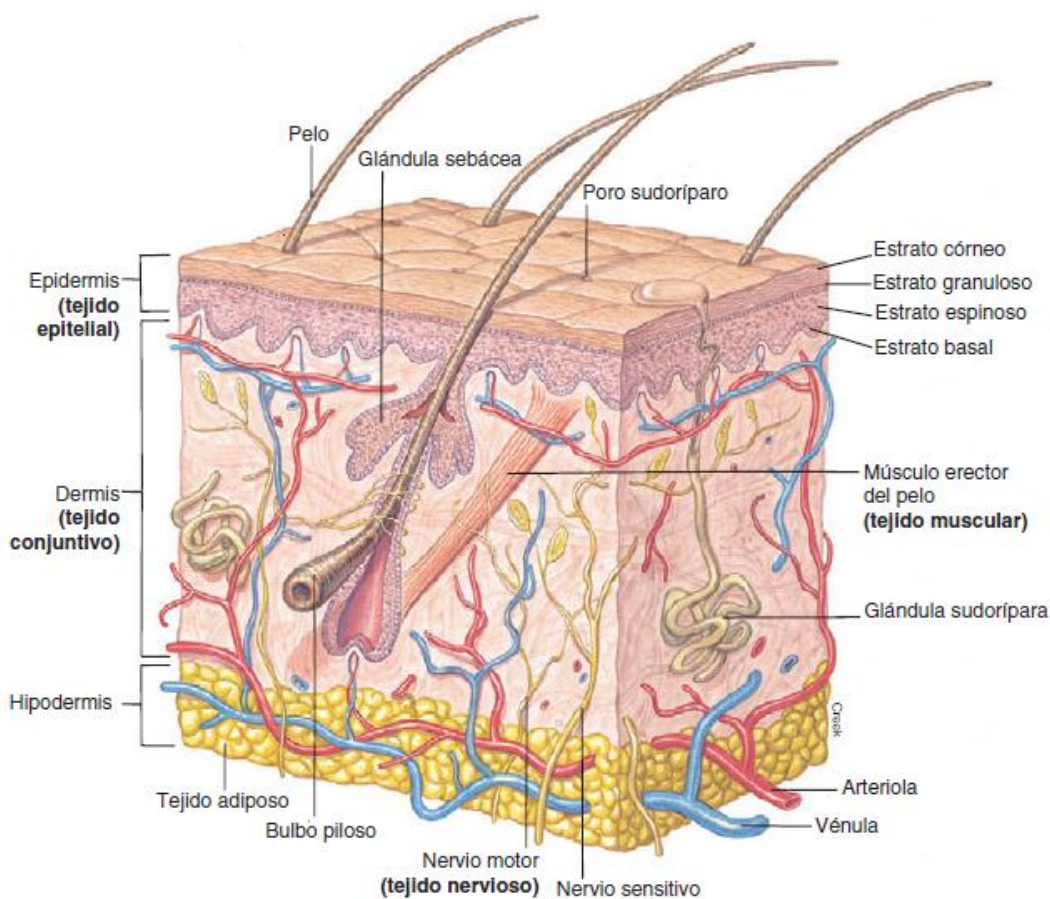
### **La piel**

En el siguiente apartado se mencionarán a los autores: Ira (2008) y Marks y Motley (2011), debido a que proporcionan información relevante para dicha investigación.

Un órgano es una estructura que está constituida por al menos dos tejidos básicos, pero generalmente está formado por cuatro. En términos de superficie ocupada, el órgano con mayor tamaño en el cuerpo es la piel, las personas dependen por completo de esta barrera de 1.7 m<sup>2</sup> que tiene como función el separar el ambiente externo que resulta ser potencialmente dañino del interior del cuerpo, dicho tejido se modifica por regiones para proporcionar un mejor desempeño de funciones particulares, por ejemplo: la piel de las extremidades y el tronco es igual, pero las palmas y plantas, piel facial, piel cabelluda y la del área de los genitales difieren en su estructura y detalles funcionales. (Marks y Motley, 2011, p. 2)

La piel consta de distintas tejidos, los cuales trabajan entre sí para mantener su fisiología y cada uno posee diferentes funciones, se mostrarán las diferentes partes por las que está conformada, se mencionarán y explicarán brevemente las más importantes y que son de consideración para este trabajo.

**Figura 14. Diagrama de la Piel**



Nota. Ira, 2008, p.19.

## **Epidermis**

La epidermis es la capa más superficial de la piel, se caracteriza por ser un tejido queratinizado, es decir, está conformado principalmente por células queratinocitos que contienen tonofilamentos de queratina, los cuales proporcionan y protegen a la piel de la pérdida de agua y de la invasión de microorganismos que resultan ser patógenos para el ser humano, en sí, la epidermis resulta ser una estructura dinámica que puede responder ante estímulos ambientales, su cantidad de división celular y el grosor de la capa queratinizada aumentan debido al estímulo del roce constante. (Ira, 2008, p.19).

## **Dermis**

La dermis es el tejido que se encuentra debajo de la capa de la epidermis, dicho tejido cumple una función importante, porque brinda protección mecánica a las partes del cuerpo subyacentes y permite la unión de todas las estructuras superficiales. Esta capa está conformada principalmente por fibras de colágeno y una red de fibras de tejido elástico, posee los vasos y fibras nerviosas de la piel. (Marks y Motley, 2011, p. 7)

Según destaca el autor anterior, en el tejido de la dermis se da también la formación de tres tipos de glándulas, las exocrinas, sebáceas y sudoríparas. Las glándulas exocrinas son los folículos pilosos que producen el pelo, la secreción de las glándulas sudoríparas enfría al cuerpo tras su sudoración, mientras que las glándulas sebáceas dan lugar a la producción de una secreción aceitosa hacia los folículos pilosos que llevan el sebo a lo que es la superficie de la piel, dicho sebo permite la lubricación de este tejido, evitando que se presente sequedad y grietas. La dermis también está nutrida por los vasos sanguíneos, leucocitos y otro tipos de células que la protegen contra microorganismos.

## **Hipodermis**

La tercera y más profunda capa de la piel es la hipodermis, se encuentra por debajo de la dermis, la mayor parte de este tejido está conformado por adipocitos agrupados, especializados en lo que es la producción y almacenamiento de grasas, aunque los adipocitos son un tejido conjuntivo, sus acumulaciones en el cuerpo se denomina tejido adiposo. (Ira, 2008, p.19).

## **Funciones de la piel**

La piel posee un papel importante para el organismo porque cumple muchas funciones de protección y de conservación, son fundamentales para el buen funcionamiento de los órganos internos, se preserva a si misma de las lesiones que son provocadas por la luz ultravioleta, incrementando la producción de la melanina la cual absorbe la luz ultravioleta, además de ser una glándula endocrina que sintetiza y secreta sustancias como la vitamina D, que actúa como una hormona. (PubMed Health, 2016)

Otras funciones de la piel son la de proteger al cuerpo contra agresiones o microorganismos externos, permite la regulación de la temperatura, gracias a los vasos sanguíneos que conforman la capa de la dermis, evita la deshidratación, presenta células con actividad inmunológica, facilita el intercambio de agua y sustancias, permite percibir mediante sensibilidad el calor, frío o dolor, facilita la administración de fármacos con características absorbibles para tratar patologías locales o sistémicas. (PubMed Health, 2016)

### **Afecciones de la piel**

La piel, es un tejido que cumple muchas funciones es vital para el ser humano, sin embargo, como todo órgano, puede llegar a sufrir alteraciones en su fisiología normal, las afecciones de la piel son generalmente extrínsecas y se desarrollan debido a factores internos del organismos, pero también dichos factores se combinan a través del estilo de vida laboral y social de la persona, así como de los factores ambientales, alta exposición al sol, el cual conlleva a el envejecimiento prematuro. (PubMed Health, 2016)

En el siguiente apartado se describirá brevemente la afección de la piel que es relevante para este trabajo de investigación, el envejecimiento de la piel, así como de los factores que conllevan a que se dé esta alteración de manera prematura.

#### **Envejecimiento de la piel.**

El envejecimiento de la piel es caracterizado por ser un proceso continuo y multifactorial, en donde se puede ver afectado por la acumulación de diferentes cambios en las células y tejidos del cuerpo, provocando la disminución de las funciones biológicas y la capacidad del organismo para adaptarse al estrés metabólico en el tiempo adecuado. (Alves, Castro, Esteves y Trelles, 2013, p.104)

El envejecimiento de la piel se da debido a dos factores, los extrínsecos e intrínsecos, el envejecimiento intrínseco se genera debido a la herencia genética del individuo en donde la persona no puede hacer nada para modificarlo, por otro lado, el envejecimiento extrínseco es el reflejo del estilo vida que conlleva la persona ya sea laboral o social, rayos ultravioleta, ambiente y dieta. (Barrett, 2013, p. 35)

Seguidamente se detallarán más ampliamente el envejecimiento intrínseco y extrínseco.

### ***Envejecimiento intrínseco.***

El envejecimiento intrínseco también es conocido como envejecimiento biológico, el cual resulta ser un proceso inevitable para el ser humano, progresa lentamente a medida que se avanza con la edad, pero dicho factor se puede ver favorecido gracias a los factores ambientales, es decir, a los factores extrínsecos. (Alves, Castro, Esteves y Trelles, 2013, p.104)

### ***Envejecimiento extrínseco.***

Las arrugas son el resultado final de la piel envejecida, dichas rugosidades se pueden prevenir o retardar, evitando la larga exposición a los rayos ultravioleta y a los radicales libres, mejorando la dieta y evitando el humo de tabaco, entre muchos más, estos factores ambientales, mencionados anteriormente cuando se acumulan junto con la herencia del envejecimiento provocarán una alteración prematura de la piel. Los radicales libres mencionados provocan daños en los lípidos, proteínas y en el ADN, ocasionando la limitación de las células para funcionar y mantener su integridad. (Barrett, 2013, p. 35)

Existen varias teorías que explican el proceso del envejecimiento, una de ellas es el llamado estrés oxidativo, el cual es de relevancia para este estudio. Consecutivamente se extenderá y proporcionará información sobre este factor y los radicales libres que lo ocasionan.

## **Radicales libres**

Los radicales libres o especies reactivas del oxígeno, son considerados como estructuras muy inestables y que poseen en su distribución orbital externa, electrones desapareados o impares tienden a generar reacciones con otros compuestos, dichos radicales son altamente reactivos y son capaces de efectuar la prolongación de la cadena de diversas reacciones de oxidación, además presentan una vida de microsegundos, es decir, su vida es sumamente corta, pero debido a su alta reactividad producen un daño de inmensa magnitud porque un solo radical libre, puede perjudicar un millón de moléculas mediante su proceso de autoconstruirse. (Zamora, 2012, pp- 17-26)

En la molécula del oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas

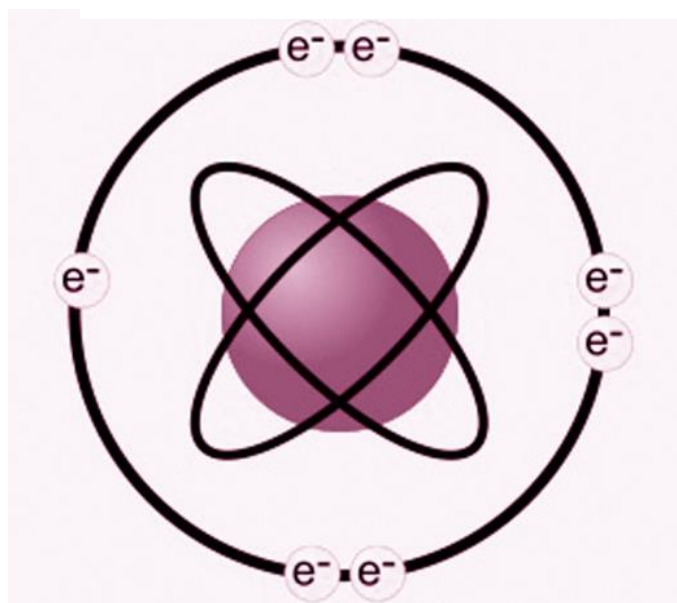
**Tabla 5. Especies Reactivas de Oxígeno**

<b>O<sub>2</sub></b>	Anión súper óxido
<b>HO</b>	Radical hidróxido
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>1 O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singulete.

Nota. Zamora, 2012, pp- 26.

Los radicales libres se producen normalmente durante el metabolismo aerobio que se genera en el organismo de los seres vivos, dichos radicales son empleados en distintos procesos fisiológicos, sirviendo como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos, como lo son las bacterias y los virus, también son originados a partir de muchos agentes externos que se ingiere; los alimentos con alto contenido de grasas y consumo excesivo de alcohol la exposición a contaminantes ambientales, los rayos ultravioleta, agentes tóxicos, el humo de tabaco, herbicidas y agua clorada, provocan el incremento en la concentración de estos electrones libres en las células. (Delgado, Betanzos, Sumaya, 2010, p.12)

**Figura 15. Estructura de un Radical Libre**



Nota. Delgado, Betanzos, Sumaya, 2010, p.1

### **Radicales libres y rayos ultravioleta**

La luz del sol es una fuente importante de lo que son los rayos ultravioleta, dichas radiaciones ocasionan que la vitamina C sea sensible a ellas, provocando su oxidación y la liberación de grandes cantidades de radicales libres, por tal motivo se ve comprometida la síntesis del colágeno y los rayos ultravioleta provocan alteraciones en los receptores de la vitamina A en la membrana celular, por lo que la replicación celular también se ve afectada, aumentando el daño celular. (Barrett, 2013, p. 39)

Los radicales libres y los rayos ultravioleta son causa importante del envejecimiento y los trastornos de la piel, su alta reactividad provoca las variaciones químicas o estructurales de los componentes celulares alterando así su función normal y provocando las afecciones en la piel, es importante destacar que los rayos ultravioleta causan un incremento de las enzimas colagenasas y elastasas siendo estas proteínas las que dañan directamente la dermis contribuyendo a la descomposición de la matriz dérmica. (Barrett, 2013, p. 41)

La exposición prolongada a la UVB ocasiona la aparición de cáncer en la piel, debido a que penetra superficialmente, afectando la epidermis y dañando directamente el ADN celular, por otro

lado, la UVA, penetra profundamente alterando la dermis y generando los radicales libres, por ende, provoca la destrucción de las fibras elásticas y colágenas llevando así al envejecimiento, reacciones fototóxicas y fotoalérgicas. (Delgado, Betanzos, Sumaya, 2010, p.12)

Para poder comprender como se lleva acabo el estrés oxidativo y cómo funcionan las sustancias antioxidantes para erradicar los radicales libres, es importante tener claro el fundamento de las reacciones oxido- reducción o reacciones redox. Se mencionará en qué consisten estas reacciones.

### **Reacciones oxido-reducción o redox**

El proceso oxido- reducción se basa en dos tipos de métodos básicos: a) oxidación que implica pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula, b) reducción que significa ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno, por esta razón, el oxidante se reduce al reaccionar con la molécula que sufre la oxidación, estos procesos suelen suceder de manera cotidiana en la fisiología del organismo humano. (Coronado, Vega, Gutiérrez, Vaques y Radilla, 2015, p. 206)

### **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se caracteriza por ser un proceso que genera un daño en la células, es desencadenado por los llamados radicales libres que se forman principalmente del oxígeno, dicha molécula resulta ser imprescindible para la vida, pero al aumentar su producción incontrolada de radicales libres, puede llegar a afectar uno o varios componentes de las células. Las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, por ende, se provocan una alteración en las funciones de las membranas, reducción de enzimas, respiración celular e inducción genética, por esta razón el oxígeno alterado es considerado como una fuente importante de enfermedades. (Vega, 2006, p. 4)

El autor anterior enfatiza que todo proceso de oxidación ocurre por la pérdida de electrones, captación de oxígeno o donación de hidrógeno. La oxidación siempre va acompañada de un proceso de reducción, generando así las llamadas reacciones oxido-reducción o redox, las cuales son de suma importancia para los seres vivos, como lo son la fotosíntesis en las plantas en donde las materias vegetales obtienen energía o como es en el caso de los organismos eucariotas y

procariotas que gracias a dichos procesos pueden almacenar la energía que es generada en la oxidación de los carbohidratos y otros compuestos orgánicos.

Otro factor que conlleva a que se genere el estrés oxidativo es cuando existe un desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes, debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno. La principal fuente de estos compuestos reactivos son las mitocondrias las cuales logran afectar directamente las funciones normales de las enzimas, membranas y ADN, ocasionando de esta manera el daño celular tanto de órganos como de tejidos. El estrés oxidativo es el principal responsable de generar el envejecimiento prematuro y está altamente ligado con las enfermedades cardiovasculares, degenerativas, neurológicas y cánceres, por esta razón resulta ideal el buscar un equilibrio entre dichas sustancias. (Alves, Castro, Esteves y Trelles, 2013, p.104)

### **Enfermedades asociadas al estrés oxidativo**

A pesar, que el envejecimiento de la piel es causado por el estrés oxidativo, existen diversas

y la disminución de la capacidad antioxidante, la HTA acelera la llamada aterosclerosis provocando en conjunto el estrés oxidativo de los vasos arteriales. (Vega, 2006, p. 7)

### **Aterosclerosis.**

La aterosclerosis se genera debido a la unión de lipoproteínas de baja densidad LDL por los macrófagos, provocando así su unión al tejido vascular, dichas lipoproteínas se oxidan y se fragmentan, sus productos van a tener un mayor poder aterogénico y facilitará la producción de placas de ateroma. (Alves, Castro, Esteves y Trelles, 2013, p.104)

### **Enfermedades cardiovasculares.**

Las células endoteliales coronarias, células sanguíneas circulantes y los miocitos cardiacos son capaces de generar radicales libres, dichas especies tienen el potencial de provocar lesiones en las células vasculares y en los miocitos, desencadenando una serie de reacciones químicas y alteraciones genéticas. (Vega, 2006, p. 7)

### **Cáncer.**

Respecto al cáncer se indica que los radicales libres dañan el ADN, provocando de esta manera distintas mutaciones en las células, convirtiéndolas en cancerosas, el autor relaciona que el humo de tabaco es el causante del cáncer de pulmón, porque en la nicotina se encuentran presentes los radicales libres en abundancia, los cuales atacan los tejidos y dañan las sustancias antioxidantes endógenas del organismo. (Barrett, 2013, p. 41)

## **Antioxidantes**

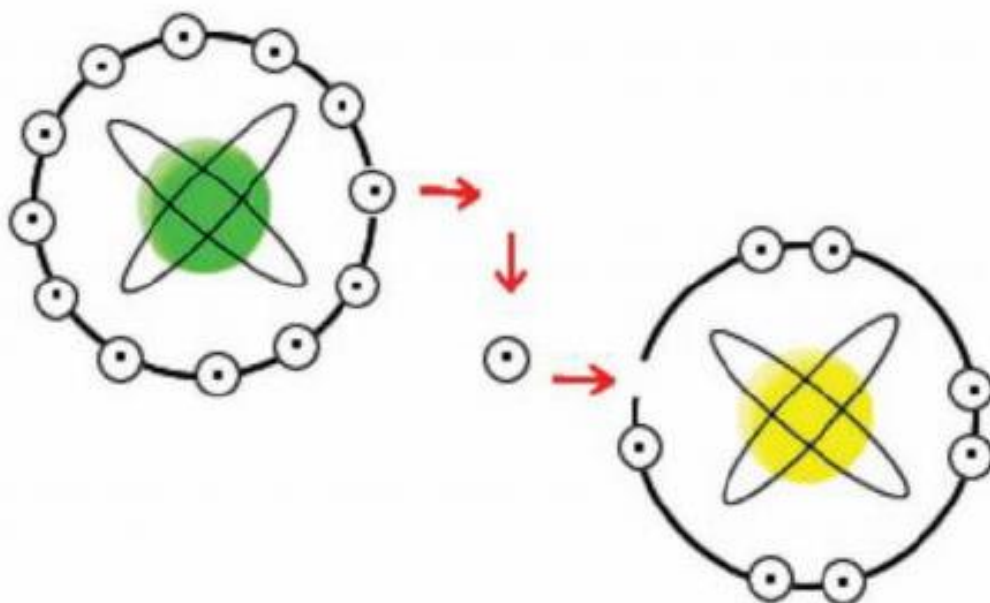
A continuación, se aportará un mayor conocimiento sobre los antioxidantes y su función en el organismo de los seres vivos. La información proporcionada será recuperada de los siguientes escritores; Coronado, Radilla, Vásquez y Vega (2015), Criado y Moya (2011) y Vega, (2006); autor del libro “Estrés oxidativo en medicina: un acercamiento al tema”

Para contrarrestar los efectos dañinos que ocurren en las células, el organismo humano y la naturaleza ha desarrollado estrategias para la prevención de estos daños, entre ellos se pueden mencionar: mecanismos de reparación para aliviar los daños oxidativos, métodos de protección

física y el más importante es el mecanismo de defensa antioxidantes, dichos antioxidantes son empleados como primera opción para cuidar y prevenir el estrés oxidativo y pueden ser obtenidos tanto de fuentes naturales como de fuentes sintéticas. (Rahal, 2014, p. 11)

Un antioxidante es un compuesto capaz de contrarrestar o retardar la acción oxidante de los radicales libres, por lo que previene la oxidación de las células del organismo, el antioxidante al estar en contacto con un radical libre es capaz de ceder un electrón, convirtiéndose en un radical libre, pero no débil y con características que lo hacen no ser tóxico. (Vega, 2006, p.11). Y según Coronado, Radilla, Vásquez y Vega (2015), los antioxidantes, pueden formar complejos estables, impidiendo así la acción catabólica de los llamados radicales libres en la membrana celular.

**Figura 16. Neutralización del Radical Libre por un Antioxidante.**



Nota. Amaya y Portillo, 2017, p. 28.

### **Control biológico de los procesos oxido- reducción**

Según Coronado, Radilla, Vásquez y Vega (2015), el organismo humano posee dos vías que resultan ser fundamentales para proteger al organismo contra los radicales libres, son las vías enzimáticas o endógenas y no enzimáticas o no endógenas. La vía endógena requiere de un apoyo

externo, por tal razón es necesario el uso de antioxidantes, los cuales se pueden obtener a partir de diversas fuentes, como lo es la dieta diaria.

Los antioxidantes también se clasifican respecto a el mecanismo de acción que emplean para proteger contra los radicales libres, el mecanismo se clasifica en: primario, secundario o terciario.

A continuación, se expondrá el tema de clasificación de los antioxidantes, así como de las principales fuentes del mismo.

### **Clasificación de las sustancias antioxidantes respecto a su mecanismo de acción**

Los sistemas de defensa frente a los radicales libres se pueden clasificar respecto a su naturaleza y mecanismo de acción. La información brindada será recopilada de los autores: Amayala y Portillo (2013)

#### **Antioxidantes primarios.**

Los antioxidantes primarios se caracterizan por evitar la formación de nuevos radicales libres, su mecanismo se basa en permitir la inhibición de la síntesis o actividad de enzimas involucradas en la formación de especies reactivas, logrando así convertir a estos compuestos en moléculas menos perjudiciales y permitiendo su estabilización e impedimento de reacción. (Amayala y Portillo, 2013, p. 28)

#### **Antioxidantes secundarios.**

Los antioxidantes secundarios logran capturar a los radicales libres evitando de esta manera la reacciones en cadena, ejemplos de ellos son los fenoles, los cuales tienen la capacidad de aceptar el electrón que se encuentra desapareado en el radical libre, permitiendo su estabilidad en su estructura, evita la propagación de la cadena de los radicales libres. (Amayala y Portillo, 2013, p. 28)

### **Antioxidantes terciarios.**

Los antioxidantes terciarios, logran reparar la moléculas que ya han sido dañadas por los radicales libres, incluyen en ellos enzimas reparadoras del ADN. La función principal de estos antioxidantes es el remover las especies reactivas que han sido generadas.

### **Clasificación de las sustancias antioxidantes respecto a su fuente de obtención**

Los antioxidantes se pueden clasificar en antioxidantes endógenos, fabricados por las propias células del organismo y en exógenos, los cuales se obtienen a partir de fuentes externas, como lo son la dieta, también existen algunos cofactores de las enzimas antioxidantes.

**Tabla 6. Clasificación de los Antioxidantes**

<b>Exógenos</b>	<b>Endógenos</b>	<b>Cofactores</b>
<b>Vitamina E</b>	<b>Glutación peroxidasa</b>	<b>Cobre</b>
<b>Vitamina C</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Zinc</b>
<b>Betacaroteno</b>	<b>Superóxido dismutasa (SOD)</b>	<b>Manganeso</b>
<b>Flavonoides</b>		<b>Hierro</b>

Nota. Criado y Moya, 2011, pp. 11

### **Fuentes exógenas de los antioxidantes.**

Como se mencionó anteriormente las fuentes antioxidantes se clasifican en dos: sistema enzimático o endógeno y sistema no enzimático o exógeno, el sistema no exógeno resulta ser especialmente útil cuando ocurre una saturación del sistema endógeno, dicha fuente está conformada por una serie de compuestos que funcionan como depuradores de los radicales libres, e intervienen retrasando su producción, estos compuestos exógenos son obtenidos a través de la

dieta. (Zamora, 2015, p. 7). Se mencionará brevemente la información referente a dichas sustancias.

### ***Vitamina E.***

Mayor (2010), destaca que la vitamina E se caracteriza por ser un conjunto de compuestos fenólicos (tocoferoles y tocotrienoles) de ellos, el alfa tocoferol es el más conocido y común posee mayor actividad vitamínica. Es considerado como un antioxidante lipofílico que se encuentra en las membranas celulares, su función principal es la de neutralizar el oxígeno singulete, capturar los radicales libres de hidroxilo y capturar el anión superóxido.

### ***Vitamina C.***

La vitamina C o el ácido ascórbico al contrario de la vitamina E es considerado como un antioxidante hidrosoluble, que actúa potenciando el efecto de otros antioxidantes como lo son la vitamina E y el selenio. Es importante mencionar que la vitamina C no es sintetizada en el organismo, debe ser suministrada por medio de la dieta. La vitamina C, actúa neutralizando el oxígeno singulete y captura los radicales libres hidroxilo y aniones superóxido, se cree que esta vitamina, participa sobre el endotelio vascular previniendo la oxidación del óxido nítrico y en la disminución de la peroxidación lipídica, por estas razones se ha determinado su papel importante para la prevención de la aterosclerosis. (Criado y Moya, 2011, pp. 13)

### ***Betacaroteno.***

Los betacarotenos, se caracterizan por provocar una neutralización del oxígeno singulete, es considerado como un importante precursor de la vitamina A. El betacaroteno es un antioxidante lipofílico, tiene la capacidad de capturar las especies reactivas del oxígeno producidas en la piel a causa de los rayos ultravioleta, por esta razón es utilizado habitualmente en las cremas solares, para evitar la fotodermatosis. (Mayor,2010, p.2)

### **Fuentes endógenas de los antioxidantes.**

En cuanto al sistema de fuentes endógenas, se sabe que está basado en un complejo enzimático que se encuentra en el organismo de todos los seres vivos, proporcionan defensa contra los radicales libres. Dichas fuentes endógenas requieren de otros nutrientes o cofactores para poder ejercer sus reacciones. Entre las principales fuentes endógenas de los antioxidantes del organismo se pueden encontrar:

#### ***Glutación peroxidasa.***

El glutación peroxidasa es una enzima selenio dependiente que permite la catalización de la reducción del  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) a agua y alcohol, el glutación peroxidasa emplea como agente reductor el glutación reducido, cada una de sus subunidades poseen un átomo de selenio, el cual es esencial para su actividad. (Amayala y Portillo, 2013, p. 29)

#### ***Superóxido dismutasa (SOD).***

La superóxido dismutasa o (SOD), es una enzima que tiene como principal función el eliminar los radicales superóxido, es decir, cataliza la conversión de superóxido en peróxido de hidrogeno, dicha enzima está presente en casi todas las células, pero su concentración difiere respecto a cada tejido y a su actividad metabólica de cada célula. (Criado y Moya, 2011, p. 11)

#### ***Catalasa.***

Según Amalaya y Portillo (2013), la catalasa se encarga de la descomposición del  $H_2O_2$  para formar agua y oxígeno, junto con la peroxidasa actúa como protector de la hemoglobina y se encuentra principalmente en las mitocondrias de las células.

## **Cofactores.**

Todos los antioxidantes poseen una cierta afinidad hacia un o unos radicales libres, dichos antioxidantes actúan de distintas maneras o mecanismos de acción, sin embargo, estos factores antirradicales, para ejercer su función dependen de otros nutrientes que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes y que son necesarios incorporar en el organismo, entre ellos se pueden mencionar: el zinc, manganeso, selenio y cobre, estos tienen como función el actuar como cofactores de las enzimas antioxidantes, también tienen la capacidad de ejercer su capacidad antioxidante de manera independiente. (Criado y Moya, 2011, pp. 15-16)

Como lo sugieren los autores anteriores, distintos mecanismos fisiológicos, dependen que se posean cantidades adecuadas de elementos, por ejemplo: en la renovación celular, el zinc lucha contra los radicales libres, el selenio aumenta la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, el manganeso protege contra la peroxidación lipídica y el cobre actúa como antioxidante, protegiendo a las células contra los efectos tóxicos que provocan los radicales libres.

## **Sinergismo de los antioxidantes**

Los antioxidantes pueden trabajar en conjunto, este sinergismo se produce cuando dos o más antioxidantes presentes en un sistema muestran un efecto general superior al que se puede obtener con un solo tipo de antioxidante. El papel sinergista consiste en regenerar al antioxidante que ya ha sido oxidado mediante una reacción redox que logra catalizar su paso al estado reducido original, es decir, los antioxidantes se regeneran uno al otro. (Amalaya y Portillo, 2013, p. 30),

## **Beneficios de los antioxidantes en la salud humana**

Al conocer los efectos negativos que generan los radicales libres y por ende el estrés oxidativo en la salud humana, es importante entender la función que cumplen los antioxidantes en el organismo, estas sustancias logran evitar o retrasar la aparición de distintas alteraciones fisiológicas que son causadas por factores tales como: la dieta, estilo de vida, radiación solar, pesticidas, medicamentos, entre otros. (Zamora, 2015, p. 7).

Zamora (2015), destaca que la suplementación con sustancias antioxidantes en el organismo humano ha sido fundamentada en diversos estudios a lo largo de los años y se ha determinado sus múltiples beneficios en la salud, unos compuestos se buscan en alimentos de origen animal o vegetal, se implementan en la dieta diaria y en distintas formulaciones farmacéuticas, para así generar un balance entre las sustancias antioxidantes endógenas y exógenas del ser humano.

Existen enfermedades relacionadas directamente con un desbalance del sistema oxidativo, por lo que las sustancias antioxidantes tienen un gran papel e implicación, entre ellas se pueden mencionar: el envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes. (Coronado, Radilla, Vásquez y Vega, 2015, p. 208). En el siguiente apartado se mencionará la implicación de estas sustancias antioxidantes en las patologías o alteraciones antes mencionadas.

### **Envejecimiento.**

Según destacan los autores Coronado, Radilla, Vásquez y Vega (2015), el envejecimiento se genera debido a dos factores: uno genético, el otro por radicales libres y estrés oxidativo, este último factor tiene relación con el envejecimiento, debido a que existe una disminución en la protección antioxidante y por ende alteraciones en la células, por lo que se cree que el aumentar la expectativa de vida y el envejecimiento de la piel se puede obtener disminuyendo los efectos de los procesos oxidativos mediante la ingesta diaria de antioxidantes y el uso de productos naturales botánicos o medicamentos para la piel que los contengan.

### **Enfermedades cardiovasculares.**

Como se mencionó anteriormente las enfermedades cardiovasculares están asociadas al estrés oxidativo, este conduce a elevadas concentraciones de peroxidación lipídica. Diversos estudios han determinado que tanto la vitamina E como la vitamina C, protegen contra la aparición de dicha enfermedad, porque reaccionan contra los radicales libres que generan la fase lipídica, se sabe que las partículas de LDL oxidasas pueden modificar la inflamación y los mediadores trombogénicos, por lo que la prevención de la oxidación del LDL con los antioxidantes podría retrasar o inhibir la progresión de dicha enfermedad cardiovascular o los factores que la generan.

Otros antioxidantes que poseen acción vasodilatadora y vasoprotectora son los polifenoles. (Zamora, 2015, pp. 11-14).

### **Cáncer.**

El autor anterior también menciona que el cáncer es una de las enfermedades más temidas a nivel mundial, pues causa la mayor cantidad de muertes en diversos países, se ha encontrado su estrecha relación fisiopatológica con las alteraciones encontradas en el metabolismo de los lípidos y la peroxidación lipídica, evidencias han demostrado la asociación entre la vitamina E y la disminución de padecer algún tipo de cáncer, el consumo de betacarotenos protege contra los rayos X y la vitamina C puede proteger contra la mutagénesis inducida por la quimioterapia.

### **Diabetes.**

Los antioxidantes gracias a sus mecanismos permiten la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, específicamente la glucosa, también se cree que permiten la estimulación de la secreción de insulina en el páncreas y activa los receptores en los tejidos diana para la hormona. (Coronado, Radilla, Vásquez y Vega, 2015, p. 208)

### **Antioxidantes y otras enfermedades.**

Se ha estudiado la relación que tienen las sustancias antioxidantes con las enfermedades neurodegenerativas como lo es el Alzheimer, porque las neuronas son sumamente vulnerables al daño causado por los radicales libres, afectando así el envejecimiento cerebral, por tal razón se cree que el uso de un suplemento antioxidante como los es la vitamina E o la vitamina C, disminuyen el riesgo de llegar a padecerla, por otro lado, distintos estudios han demostrado que el consumo de antioxidantes ayudan a estimular el sistema inmunológico, fortaleciendo así la defensa contra muchas enfermedades. (Zamora, 2015, pp. 18-20).

## Análisis de la propiedad antioxidante

En el siguiente apartado se recopilará información de los siguientes autores: Zapata, Piedrahita y Rojano (2014) y Huet (2017).

En los últimos años ha habido un gran interés científico y de la población en general por la determinación y obtención de sustancias antioxidantes a partir de fuentes naturales como lo son las frutas y los vegetales, debido a que dichos compuestos, proporcionan múltiples beneficios para la salud humana, por tal razón se han llegado a utilizar en el campo nutricional, en la industria agrícola, cosmética y de alimentos, con el fin de brindar una protección antirradical al organismo. (Zapata, Piedrahita y Rojano, 2014, p. 3)

Para poder verificar la presencia de sustancias y por ende su capacidad antioxidante se han diseñado distintos métodos químicos que permiten determinar la actividad antirradical de un compuesto, estos procedimientos pueden ser tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, una de las pruebas más empleadas para realizar estas mediciones en un compuesto mezcla o alimento, son las determinaciones *in vitro*, las cuales consisten en comprobar la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, la pérdida de color ocurre de manera proporcional a la concentración, estos estudios *in vitro* proporcionan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones *in vivo*. (Zapata, Piedrahita y Rojano, 2014, p. 3)

Distintos compuestos cromógenos, son utilizados para determinar la capacidad de muchas sustancias antioxidantes; que contienen diversos frutos, para captar los radicales libres generados, operando así en contra de los efectos que son perjudiciales de los procesos de oxidación, sin embargo, es importante recalcar que ningún método podrá reflejar por sí solo la capacidad antioxidante total, dichos procedimientos deberán expresar la capacidad de los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. (Huet, 2017, p. 11-13)

Entre los principales ensayos que se emplean para determinar la capacidad antioxidante de un extracto o sustancia obtenida a partir de diversas fuentes, se pueden mencionar el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) y el ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-pierilhidrazil). (Huet, 2017, p. 11-14)

## **Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)**

Alvarez, Carvalho, Sierra, Lara, Cardona, Londoño (2012), citado por Jiménez (2017), enfatizan que existen diversos métodos para la determinación de la capacidad antioxidante, sin embargo, el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) ha resultado ser uno de los métodos más eficaces, con mayor precisión y reproductibilidad.

El método ORAC se caracteriza por ser un ensayo que mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ) que lo ha generado la descomposición térmica de un azoderivado AAPH ([2,2'-azobis (2-amidinopropano)] dihidrocloruro), en este método los radicales peróxido generados por iniciadores de radicales libres, reaccionan con la proteína fluoresceína para formar un producto no fluorescente, es decir, a medida que avanza la reacción la sonda fluorescente se consume y por lo tanto disminuye la fluorescencia, el antioxidante adicionado al medio compite con dicha sonda manteniéndose así la fluorescencia. (Zapata, Piedrahita y Rojano, 2014, p. 3)

Para calcular la capacidad antioxidante se tendrá en cuenta el rendimiento neto del AUC (área bajo la curva) en un periodo de tiempo dado, en presencia de un antioxidante menos el área bajo la curva en ausencia de un antioxidante, cuando existe presencia de antioxidantes el AUC se incrementa en forma lineal y proporcional a la concentración de dichos antirradicales. Por tal manera se combina el porcentaje de inhibición y la duración de tiempo de inhibición de la acción de los radicales libres por los antioxidantes en una sola cantidad. (Huet, 2017, p. 11-13)

El autor anterior destaca que para que ocurra lo mencionado, los antioxidantes deben donar un electrón o átomo de hidrógeno a los radicales libres, pudiéndose así estabilizar. Dicho ensayo permite medir la capacidad que tienen todos los antioxidantes presentes en alimentos o materiales vegetales de donar los átomos de hidrogeno a los radicales peroxilo, por lo que el método ORAC cuantifica la capacidad que tendría un alimento para actuar como antioxidante.

Shahidi (2015), citado por Huet (2017), indica que para poder expresar los resultados obtenidos por el método de ORAC, se realiza un comparación de los resultados de distintas muestras y matrices empleando un patrón interno, el cual es análogo a la vitamina E y se expresa



### **CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO**

En el siguiente apartado se indicará el enfoque y método que conlleva esta investigación. Además, las variables, instrumentos y técnicas experimentales que serán de gran utilidad para la elaboración de este proyecto.

#### **Enfoque**

“El enfoque cuantitativo utiliza la recolección de datos para probar la hipótesis con base en la medición numérica y el análisis estadístico, con el fin establecer pautas de comportamiento y probar teorías” (Hernández, Fernández, Baptista, 2014, p.4). El enfoque de esta investigación es cuantitativo, porque se pretende dar validez a la pregunta planteada. La recolección de datos se fundamenta mediante los análisis químicos que se efectuarán a la broza del café para determinar la capacidad antioxidante de sus compuestos, los resultados obtenidos se analizarán mediante métodos estadísticos y con base en lo que muestra la literatura brindando de esta manera confiabilidad al estudio.

#### **Método**

El método de esta investigación se considera experimental, debido a que se establecen una serie de variables y estrategias prácticas para la obtención de resultados, porque se estudiará la capacidad antioxidante y sustancias presentes en la broza del café mediante análisis químicos efectuados en laboratorio. Según Hernández, Fernández, Baptista (2014, p.129), este método se define como: “El investigador pretende establecer el posible efecto de una causa que se manipula”, En este proyecto se busca generar una utilidad, en el área farmacéutica, al material de desecho del café, específicamente la broza, comprobando la presencia de compuestos polifenólicos con capacidad antioxidantes, los cuales resultan ser beneficiosos en la salud humana.

Se realizará en el laboratorio de química de la Universidad Internacional de las Américas (UIA), en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica, la obtención del extracto de la broza del café, las pruebas de identificación de compuestos químicos y el espectro IR se elaborarán en la UIA. La determinación de los compuestos

presentes en el extracto de la broza del café mediante la cromatografía de gases acoplada a masas se realizará en un laboratorio privado. La cuantificación de los polifenoles y la determinación de sus propiedades antioxidantes se efectuará en el CITA.

### Variables

**Tabla 3. Variables de la Investigación**

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional e instrumental</b>
Extracto vegetal de la broza del café ( <i>Coffea arábica</i> )	Los extractos vegetales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas. (Guala, Pérez, Barducco, Marsó y Elder, 2012, p. 152).	Se extraen por métodos químicos: Soxhlet, rotavapor y arrastre por vapor. Se determina el porcentaje de rendimiento de cada técnica.
Compuestos polifenólicos presentes en la broza del café ( <i>Coffea arábica</i> )	Compuestos que contienen en su estructura un grupo fenol, consisten en un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (-OH). (Calle y Mendoza, 2017, p.46).	Se identifican, cuantifican y determinan, por medio de técnicas químicas, pruebas de identificación: gelatina y sal y cloruro férrico y espectroscopia IR. Cuantificación por medio del método de Folin Ciocalteu. Determinación por medio de la cromatografía de gases acoplada a masas
Propiedades terapéuticas de la broza del café ( <i>Coffea arábica</i> )	Sustancia con fines curativos específicos, que ayudan al cuerpo en su lucha contra una alteración fisiológica. (Bonilla y Pazos, 2010, p. 102).	De acuerdo con la naturaleza de las sustancias presentes en el extracto obtenido se determinarán las propiedades o actividades medicinales que posee, la cuales se muestran por medio de pruebas químicas de laboratorio.

Actividad antioxidante	Capacidad que tienen ciertas sustancias para competir con otros sustratos oxidables y así inhibir, o retardar significativamente la oxidación de dichos sustratos. (Poggio,2012, pp. 25-26)	Se valora por medio del ensayo químico de ORAC, capacidad de absorción de los radicales de oxígeno.
------------------------	--	---

### **Instrumentos**

Los instrumentos y técnicas se dividirán por fases de manera que se cumpla un orden y correspondan según el procedimiento que se realizó, brindando un mayor entendimiento del proceso en estudio.

#### **Fase I. Recolección y almacenamiento de la broza del café.**

##### **Material y equipo**

Invernadero

Bolsa hermética.

Cuarto fresco.

La broza del café (*Coffea arabica*) se secó en un invernadero de a 30-40 °C durante ocho y cuatro días, seguidamente se almacenó en bolsas herméticas en un cuarto fresco a temperatura ambiente.

Dicho procedimiento se ejecutó en la cooperativa caficultora Coopedota R.L y en el beneficio cafetalero de Tributos del Ota de la Zona de los Santos.

#### **Fase II. Preparación de la muestra para su extracción.**

##### **Material y equipo**

Mortero

Pistilo

Beaker de 500 mL

Balanza de vidrio

Agitador de vidrio

Para efectuar una adecuada extracción fue necesario morterizar la broza de café, seguidamente se pesó una cantidad aproximada para efectuar la extracción.

Dicho procedimiento se ejecutó en el laboratorio químico de la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

### **Fase III. Empleo de los métodos de extracción de Soxhlet y arrastre por vapor para la obtención del extracto de la broza del café (*Coffea arábica*)**

Se emplearon dos técnicas de extracción de compuestos orgánicos, soxhlet y arrastre por vapor, con el fin de determinar y comparar el procedimiento más efectivo. Los materiales y equipos se muestran a continuación.

#### **Soxhlet.**

##### **Material y equipo**

Equipo Soxhlet

Rotavapor

Balanza granataria

Guantes de látex

Beaker de 10 mL

Beaker de 250 mL

Beaker de 500 mL

Pipeta de 10 mL

Espátula

Filtro de café

Papel aluminio

Hielo

#### **Reactivos:**

Etanol 96%

**Arrastre por vapor.****Material y equipo**

Equipo de arrastre por vapor

Rotavapor

Balanza granataria

Guantes de látex

Beaker de 10 mL

Beaker de 250 mL

Beaker de 500 mL

Pipeta de 10 mL

Espátula

Papel aluminio

Hielo

**Reactivos**

Agua

Cloroformo

Sulfato de sodio anhidro

NaCl (cloruro de sodio)

Dichos procedimientos se ejecutaron en el laboratorio químico de la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

**Fase IV: Pruebas de identificación químicas de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arábica*).****Material y equipo**

Tubos de ensayo

Goteros

**Reactivos**

Gelatina y sal

Cloruro férrico.

Para determinar la presencia de los compuestos de interés (polifenoles) presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arabica*) se requiere de diversas pruebas de identificación, las cuales mediante un cambio en la coloración indican la presencia o no de ellas.

El reactivo de gelatina y sal se utiliza para determinar la presencia de taninos hidrolizables. La prueba de cloruro férrico consiste en determinar la presencia de compuestos fenólicos

Dichos procedimiento se ejecutaron en el laboratorio químico de la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

**Fase V: Identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arábica*) mediante espectrofotometría IR y cromatografía de gases acoplada a masas.****Espectrofotometría IR modelo Agilent Technologies Cary 630 FTIR.****Material y equipo**

Espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 630 FTIR.

Gotero.

Para la identificación de los compuestos químicos o grupos funcionales presentes en el extracto se empleó la espectrofotometría IR. Dicho procedimiento se ejecutó en el laboratorio químico de la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

**Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).**

Para la determinación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza de café se empleó el cromatograma de gases acoplado a masas (CG-MS), dicho análisis se realizó en un laboratorio privado, se utilizó la metodología de referencia del laboratorio.

**Fase VI: Cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arábica*) mediante el método de Folin Ciocalteu.****Materiales y equipo**

Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu Pharmaspec UV-1700

Agitador Vortex.

Agitadores magnéticos.

Baño ultrasónico.

Balanza analítica

Balón aforado de 50 mL, 25 mL y 10 mL

Cronómetro.

Jeringa plástica de 20 mL y filtro de 0,45  $\mu\text{m}$

Cartuchos de extracción en fase sólida

### **Reactivos**

Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Ácido Gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ )

Disolución Fenol Folin–Ciocalteu

Metanol

Este procedimiento se ejecutó en el laboratorio del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), se empleó la metodología de cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu de referencia este laboratorio.

### **Fase VII: Valoración de la capacidad antioxidante del extracto de la broza del café (*Coffea arabica*) mediante el método de ORAC**

#### **Materiales y equipo**

Balanza analítica

Baño ultrasónico

Espectrofluorómetro Biotek.

Micropipeteador 10mL, 1000 $\mu\text{L}$  y 100 $\mu\text{L}$

Papel parafilm, papel aluminio y papel toalla

Balones aforados de 10mL,25 mL,50mL,100 mL,250 mL,500mL y 1000mL

Beaker de 25 mL,100mL y 1 L

Botellas ámbar de 10mL, 25mL, y 1 L

Probetas de 10mL, 100mL y 500mL

**Reactivos**

TROLOX: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

Fluoresceína de sodio  $C_{20}H_{10}O_5Na_2$

AAPH: dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano); dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2 metilpropionamidina)

Fosfato de sodio monobásico  $NaH_2PO_4$

Fosfato de sodio dibásico  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$

Agua

NaOH 0,1 M

HCl 0,1 M

El ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) se efectuó en el laboratorio del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), se empleó la metodología de determinación de la capacidad antioxidante de referencia de este laboratorio.

**Fase VIII: Elaboración de una crema con el extracto obtenido de la broza del café (*Coffea arabica*)**

**Materiales y equipo**

Agitador magnético.

Pastilla de agitación.

Beakers de 50mL.

Beakers de 250mL

Termómetro.

Agitador de vidrio.

Espátula.

Balanza analítica

**Reactivos**

2g de alcohol cetílico

8g de ácido esteárico

9g de glicerina

0,15g de metilparabenos

0,05g de propilparabenos

20g de aceite mineral liviano

2,0g de trietanolamina

100g Agua destilada csp

Extracto de la broza de café.

La elaboración de la crema se realizó en el Laboratorio químico de la Universidad Internacional de las Américas.

### **Procedimiento de recolección y análisis de los datos**

El proceso de recolección y análisis de datos del presente estudio se realizó en el Laboratorio de química de la Universidad Internacional de las Américas (UIA), en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en una laboratorio privado durante el segundo y tercer cuatrimestre del año 2018.

A continuación, se indicarán los procedimientos seguidos se dividirán en fases, para tener un orden adecuado que permita su comprensión.

#### **Fase I. Recolección y almacenamiento de la broza del café.**

La broza de café se consiguió gracias a dos empresas productoras de la Zona de los Santos, El beneficio cafetalero Tributos del Ota y en la Cooperativa de Caficultores de Dota; Coopedota R.L, El material se obtuvo durante el mes de febrero y marzo del año 2018, según su producción. Se recolectó alrededor de seis kilos. Para el almacenamiento y secado se siguieron estos pasos

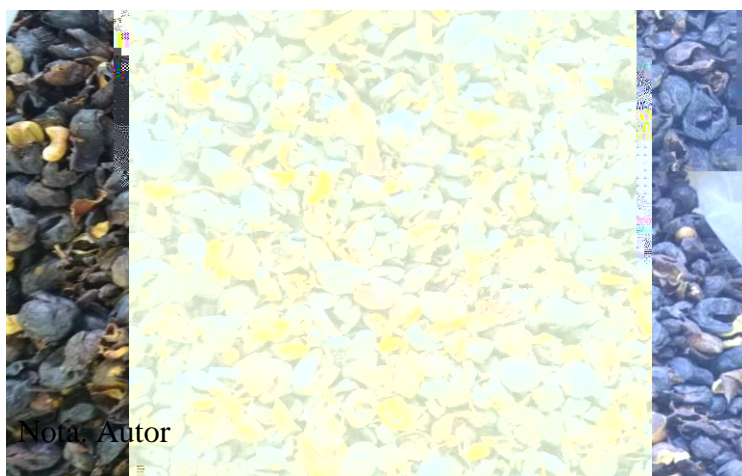
1. Se despulpó el café ya entregado en el recibidor.
2. La broza o cáscara se colocó en un invernadero y se secó al sol.
3. La humedad de la broza del café de microlote y la de café convencional se eliminó mediante el secado al sol en un invernadero a una temperatura aproximada de 30 - 40 °C durante ocho días, en la cooperativa COOPEDOTA R.L obteniendo así una humedad de 8% mientras que la broza del café convencional del beneficio Tributos del Ota se secó igualmente en un invernadero a una temperatura similar, pero por 4 días esta broza presentó un porcentaje de humedad de 75%
4. Se almacenó la broza en bolsas herméticas y se conservó en un cuarto fresco, a una temperatura aproximada de 18- 22 °C.

**Figura 18. Broza de Café Convencional con 75 % de Humedad**



Nota. Autor

**Figura 19. Broza de Café Convencional con 8% de Humedad**



Nota. Autor

**Figura 20. Broza de Café de Microlote con 8% de Humedad**



Nota. Autor

**Fase II. Preparación de la muestra para su extracción mediante soxhlet y arrastre por vapor.**

Se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se morterizó por separado la broza del café de microlote y la convencional mediante un mortero y pistilo, hasta que se obtuvo su disminución de tamaño.
2. Se pesaron aproximadamente 31.13 gramos de la broza de microlote con 8% de humedad y 31,24 gramos de la broza convencional con 8% de humedad y 30,14 gramos de la broza convencional con 75% de humedad, previamente ya morterizadas, se colocaron cada muestra en un equipo soxhlet para su extracción.
3. Se pesaron 45,84 gramos de la broza de microlote con 8% de humedad y se colocó en el equipo de arrastre por vapor para su extracción.

**Figura 21. Disminución del Tamaño de la Broza del Café**



Nota. Autor

**Figura 22. Peso de la Broza del Café para su Extracción**



Nota. Autor

### **Extracción de la broza del café (*Coffea arabica*) mediante el equipo de soxhlet**

Se ejecutó el siguiente procedimiento:

1. Lavado y secado de la cristalería a utilizar.
2. Adaptación de un filtro de café en el fondo de cada Soxhlet, esto con el fin de que no se pasaran muestras del material vegetal a él sifón y provocaran la obstrucción del paso del disolvente en su recirculación.
3. Colocación de las muestras de la broza de café previamente pesadas y morterizadas en cada Soxhlet, con cuidado de que no se fuera a pasar material por el filtro de café colocado en el fondo del equipo.
4. Se armó el equipo de Soxhlet. Se realizó el montaje mostrado en la figura 23.
5. Se midió mediante una probeta 280 mL del disolvente (etanol) y se añadieron a él Soxhlet para que se depositaran en el balón de 500mL.
6. Se conectó la bomba de inmersión para la recirculación del agua (entrada y salida de H<sub>2</sub>O) que se encontraba adaptado en una hielera con agua fría, dicho recirculante se encontraba conectado mediante mangueras de hule a él refrigerante del equipo.
7. Colocación de papel aluminio alrededor del matraz, para que se conservara el calor y se evitara su pérdida.
8. Se calentó a 300 ° C el matraz con la ayuda de un calentador magnético, se mantuvo el disolvente (etanol) en agitación constante, hasta que se alcanzara la temperatura de ebullición del líquido.
9. Se mantuvo la calefacción durante al menos seis horas, para que se logaran al menos 4 recirculaciones del líquido por la muestra vegetal y el sifón de esta manera se obtuvo una mayor concentración de extracción de la broza del café.
10. Se obtuvo el extracto deseado de la broza del café, el cual se encontraba disuelto en el disolvente que se empleó (etanol).

**Figura 23. Equipo de Soxhlet Empleado en la Obtención del Extracto**



Nota. Autor

Para la eliminación del disolvente se empleó el rotavapor y se siguió el siguiente procedimiento

1. Se lavó y secó la cristalería por utilizar.
2. Colocación de agua en el baño termostático.
3. Se conectó la bomba de inmersión del agua (entrada y salida de  $H_2O$ ), que se encontraba adaptado en una hielera con agua fría, mediante mangueras de hule al refrigerante del equipo.
4. Se colocó la muestra obtenida mediante un embudo de vidrio en el balón de destilación.
5. Se adaptó el balón de destilación en el equipo y sujeción mediante una prensa.

6. Se conectó el equipo y calentamiento del agua a una temperatura de 78 °C, para que el etanol se calentara y alcanzara su punto de ebullición, de esta manera se logró la separación del etanol y extracto deseado, dicho calentamiento se mantuvo hasta que no se observara más extracción de etanol.
7. Al extracto de la broza de café que se obtuvo en el balón de destilación, se succionó mediante una pipeta de 15 ml y una pera.
8. Se midieron los mililitros del extracto obtenido y se colocaron en un vial vacío el cual estaba previamente pesado.
9. Finalmente, se obtuvo el peso de la muestra por diferencia.
10. Se determinó el porcentaje de rendimiento del extracto obtenido mediante el método de Soxhlet, para ello se empleó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{gramos de la muestra (broza de café)}}{\text{gramos del extracto obtenido}}$$

**Figura 24. Rotavapor**



Nota. Autor

## **Extracción de la broza del café (*Coffea arabica*) mediante el equipo de arrastre por vapor**

Se efectuó el siguiente procedimiento:

1. Se lavó y secó la cristalería a utilizar.
2. Se montó el equipo de arrastre por vapor. Según se muestra en la figura 25.
3. Mediante una probeta se midieron 270mL del disolvente (agua) y se añadieron al balón generador de vapor de 500mL.
4. En el balón de fondo redondo se agregaron 45.84g de la broza de café de microlote.
5. Se conectó el recirculante del agua (entrada y salida de H<sub>2</sub>O) que se encontraba adaptado en una hielera con agua fría, mediante mangueras de hule al refrigerante del equipo.
6. Se colocó papel aluminio alrededor de cada matraz, para que se conservara el calor y así se evitara su pérdida.
7. Se calentó cada matraz con la ayuda de un calentador magnético a 250 °C, según el indicador del calentador, se mantuvo el disolvente (agua) en agitación constante, hasta que alcanzara la temperatura de ebullición.
8. Fue necesario que se mantuviera la calefacción por tres horas, hasta que la mayor parte del líquido se destilara, pero sin dejar que se secase totalmente.
9. Se obtuvo el destilado de la broza de café en el erlenmeyer recolector de 500mL.
10. Se saturó con NaCl la solución acuosa que se obtuvo en el método de extracción por arrastre, con el fin de separar la muestra del agua.
11. Por decantación se separó el NaCl sin disolver de la solución.
12. Luego se transfirió la solución acuosa a un embudo separador.
13. El tapón y la llave del embudo separador se ajustaron antes de cada uso.
14. Se añadió a la solución acuosa que se encontraba en el embudo separador 20mL de cloroformo.
15. El embudo se manipuló con ambas manos, se sujetó con una mano el tapón y con la otra se manipuló la llave.
16. Se invirtió el embudo y se abrió la llave para liberar la presión de su interior, se agitó suavemente durante tres segundos y se abrió de nuevo la llave.

17. Después que se separaron ambas fases, se retiró la fase orgánica que se encontraba en la parte inferior del embudo (en la llave), la fase acuosa se hallaba en la parte superior del embudo.
18. Se repitió el procedimiento de los puntos 14,15,16,17, por lo que se realizaron tres extracciones de la solución orgánica.
19. Se reunieron todas las fases orgánicas obtenidas y se procedió a la eliminación del disolvente (cloroformo) mediante el rotavapor, (en este caso se siguió el mismo procedimiento de eliminación del disolvente con el rotavapor ya indicado en esta fase)

**Figura 25. Equipo de Arrastre por Vapor**



Nota. Autor

**Figura 26. Separación de Fases Mediante el Embudo Separador**



Nota. Autor

**Fase IV: Pruebas de identificación de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arabica*).**

**Gelatina y sal.**

1. En un tubo de ensayo se agregó un mililitro del extracto obtenido y un mililitro del reactivo de gelatina y sal.
2. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos hasta que se observara la aparición o no de un precipitado.

**Cloruro férrico.**

1. En un tubo de ensayo se agregó un mililitro del extracto obtenido y un mililitro del reactivo de cloruro férrico.
2. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos hasta que se observó un cambio de color verde o azul.

**Fase V: Identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arabica*) mediante espectrofotometría IR y la cromatografía de gases acoplada a masas.**

Se emplearon los siguientes procedimientos:

**Espectrofotometría IR modelo Agilent Technologies Cary 630 FTIR.**

1. Se encendió el computador y el espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 630 FTIR.
2. Se abrió el programa MicroLab Pc.
3. Ingresó de la clave del laboratorio.
4. Se limpió el cristal y la superficie de contacto del espectrofotómetro IR con una toalla y acetona.
5. Se marcó la opción “Start”.
6. Se presionó la opción “Next” para chequear que el cristal funcionara en las óptimas condiciones.
7. Se adicionó una pequeña cantidad mediante un gotero, del extracto obtenido de la broza del café en la superficie del espectrofotómetro IR.
8. Se acercó lo máximo posible el prisma del espectrofotómetro IR a la muestra adicionada en el punto #7 de esta fase.
9. Se marcó la opción “Next”
10. Se asignó el nombre al análisis realizado.
11. Se presionó la opción “Leer” para que se efectuara el análisis de la muestra.
12. El programa arrojó los resultados del IR que se obtuvieron de la muestra del extracto de la broza del café.
13. Se presionó la opción “Detalles”
14. Se presionó clic izquierdo del ratón y se seleccionó “Pintar picos”, el puntero se situó en la parte superior de cada pico del espectro y se deslizó hacia la derecha para obtener su valor.

**Figura 27. Espectrofotómetro IR Agilent Technologies Cary 630 FTIR**



Nota. Autor

**Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).**

Dicho análisis se realizó en un laboratorio privado se empleó la metodología de referencia del laboratorio.

**Fase VI: Cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arábica*), mediante el método de Folin Ciocalteu.**

Se utilizó el siguiente procedimiento:

**Preparación de disoluciones.**

**Disolución de carbonato de sodio.**

- Se disolvieron 75g de carbonato de sodio en un litro de agua.

**Disolución de Folin-Ciocalteu.**

- Se diluyó el reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 1/10 o equivalente con agua, se preparó en el momento del análisis.

**Preparación de la curva de calibración de ácido gálico.**

1. Se midieron exactamente 0,050g de ácido gálico (Masa molar 170,1 g/mol), se disolvió con una mínima cantidad de metanol y se llevó a 100,00mL con agua grado 3 en un balón aforado, de esta manera se obtuvo a disolución madre.
2. Se prepararon las disoluciones estándar de trabajo a partir de la disolución madre de ácido gálico en balones aforados de 10,00mL con agua grado 3. Se tomaron alícuotas de la disolución madre de 0,20mL, 0,40mL, 0,80mL, 1,20mL y 1,60mL se obtuvieron respectivamente las concentraciones de 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L y 80 mg/L.
3. Se tomó una alícuota de 500 $\mu$ L de cada patrón y se colocaron en tubos de ensayo. Además, 500 $\mu$ L de agua grado 3 en dos tubos de ensayo como blancos.
4. Se agregó 2,50mL de la disolución de Folin-Ciocalteu a cada tubo de ensayo que contenía los estándares y los blancos, se dejaron en reposo durante al menos 2 minutos.
5. Se basificó con 2,00mL de disolución de carbonato de sodio cada tubo de ensayo y se agitó en el vortex.
6. Colocación de los tubos en un baño de agua a 50 °C por 15 minutos. Luego se enfriaron rápidamente en baño de hielo.
7. Se ajustó el cero con los blancos y se llevó la absorbancia de cada tubo de ensayo a 760 nm.
8. Se graficó la absorbancia contra la concentración de ácido gálico. Luego se interpoló en la curva la concentración de las muestras en estudio.

**Preparación del extracto de la broza del café para el análisis.**

- Se centrifugó el extracto de la broza de café por 10 minutos a 2500 rpm, el líquido se pasó a un filtro de Watman #41 y luego con la ayuda de una jeringa con un filtro de 0,45  $\mu$ m a un balón de 25mL y se aforó con agua grado 1.

**Parte A. Eliminación de interferencias.**

1. Se buscó la dilución ideal para que el valor de absorbancia quedara dentro del ámbito lineal de la curva de ácido gálico.
2. Escogencia de varias alícuotas del extracto y se realizaron distintas diluciones para encontrar la ideal. En la tabla #7 se describen algunas posibilidades.

**Tabla 7. Diluciones Correspondientes para los Extractos**

<b>Dilución</b>	<b>Alícuota de extracto (mL) (V<sub>1</sub>)</b>	<b>Volumen de agua (mL)</b>	<b>Volumen total (mL) (V<sub>2</sub>)</b>	<b>Factor de dilución total (FD)</b>
<b>1</b>	0,10	9,90	10,00	100
<b>2</b>	0,50	9,50	10,00	20
<b>3</b>	1,00	9,00	10,00	10
<b>4</b>	1,00	4,00	5,00	5
<b>5</b>	1,00	2,00	3,00	3
<b>6</b>	1,00	1,00	2,00	2

Nota. CITA, 2018.

3. Se tomó una alícuota de 500 $\mu$ L de cada dilución preparada y se colocó en tubos de ensayo debidamente identificados.
4. Se tomaron 500 $\mu$ L de agua grado 1 como blanco y se colocaron en un tubo de ensayo debidamente identificado. El blanco se preparó por duplicado para ajustar el cero del equipo.
5. Se agregó 2,50mL de disolución Folin a los tubos de ensayo que contenían los extractos diluidos y los blancos, y se dejaron en reposo por 2 minutos.
6. Se basificó con 2,00mL de disolución de carbonato de sodio en cada tubo de ensayo y se agitó en el vortex.
7. Utilización del blanco para hacer la corrección y se leyó la absorbancia de cada tubo de ensayo a 760 nm.
8. Una vez que se encontró la dilución correcta en este caso la 1, se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L y se colocaron en tubos de ensayo debidamente identificados.
9. Se agregaron 2,50mL de disolución Folin a los tubos de ensayo que contenían los extractos diluidos y los blancos, y se dejaron en reposo por 2 minutos.
10. Se basificó con 2,00mL de disolución de carbonato de sodio en cada tubo de ensayo y se agitó en el vortex.
11. Empleo del blanco para hacer la corrección y se leyó la absorbancia de cada tubo de ensayo a 760 nm.

**Parte B: Retención de polifenoles por medio de cartuchos oasis**

1. Se tomó una alícuota de 1,5mL (V<sub>3</sub>) del extracto acuoso de cada réplica de la muestra en un tubo de ensayo, se agregó 2,5mL (V<sub>4</sub>) de agua grado 3 y se agitó en el vortex.
2. De cada tubo se tomaron 2mL (V<sub>5</sub>) y se colocaron en un cartucho OASIS.
3. Se recogió el filtrado en una probeta de 5 o 10mL limpia y seca.
4. Después de filtrar el extracto acuoso, se lavó el cartucho OASIS con 1 o 2mL de agua. Se recogió el agua del lavado en la misma probeta y se anotó el volumen final (V<sub>6</sub>).
5. Se agitó el filtrado por medio del vortex.
6. Se tomó una alícuota de 500µL de cada réplica y se colocó en un tubo de ensayo también, se tomó una alícuota de agua por duplicado (para ajustar el cero).
7. Se agregaron 2,50mL de disolución Folin a los tubos de ensayo.
8. Se basificó con 2,00mL de disolución de carbonato de sodio cada tubo de ensayo y se agitó en el vortex.
9. Se colocaron los tubos en un baño de agua a 50 °C por 15 minutos.
10. Se utilizó el blanco para hacer la corrección y se leyó la absorbancia de cada tubo de ensayo a 760 nm, se interpoló la concentración con la curva de calibración de ácido gálico.

**Cálculos para determinar la concentración total de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café.**

1. Se graficó la concentración contra la absorbancia. Con regresión lineal se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras.
2. De la regresión lineal  $y = mx + b$  se obtuvo el valor de la pendiente (m) y del intercepto (b). Donde (y) correspondía al valor de la absorbancia y (x) la concentración en mg/L de ácido gálico.
3. Con dicha fórmula y la absorbancia obtenida para cada muestra se obtuvo la concentración de polifenoles totales.

Dicho procedimiento se efectuó en el laboratorio del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y se empleó la metodología de referencia de dicho laboratorio.

**Figura 28.** Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu Pharmaspec UV-1700



Nota. CITA, 2018

**Fase VII: Valoración de la capacidad antioxidante del extracto de la broza del café (*Coffea arabica*) mediante el ensayo de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno).**

Se ejecutó el siguiente procedimiento:

**Disolución amortiguadora de fosfatos 75 mmol/L (pH = 7,4)**

**Disolución A (0,2 mol/L)**

- Se midieron 1,035 g de fosfato de sodio monobásico y se llevó a 100 ml con agua grado 3 en un balón aforado.

**Disolución B (0,2 mol/L)**

1. Se midieron 5,35g de fosfato de sodio dibásico y se llevó a 500mL con agua grado 3 en un balón aforado.
2. Se mezclaron 95mL de la disolución A con 405mL de la disolución B, se diluyó aproximadamente 1 L con agua grado 3 en un beaker y ajusto el pH a un valor de 7,4, para ello se utilizaron disoluciones 0,1 mol/L de NaOH o HCl.

**Disolución de Trolox**

**Disolución madre (400  $\mu$ mol/L)**

- La medición se hizo exacta de 0,01g de Trolox (masa molar 250,32 g/mol) en una balanza analítica, se adicionó unas gotas de etanol al 95% y 50mL de disolución amortiguadora, se

colocó en baño de ultrasonido por dos minutos y finalmente se aforo con disolución amortiguadora en balón de 100mL clase A.

#### Disoluciones de trabajo (4 - 32) mol/L

- Se prepararon las disoluciones estándar como se indica en el tabla 8, y se diluyó con la disolución amortiguadora en tubos de microcentrífuga cónicos de 1,5 mL.

**Tabla 8. Diluciones Correspondientes para la Preparación de Disoluciones Patrón de Trolox.**

Estándar	Alícuota de disolución de trabajo de Trolox ( $\mu\text{L}$ )	Disolución amortiguadora ( $\mu\text{L}$ )	Concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Blanco</b>	0	1000	0
<b>T1</b>	10	990	4
<b>T2</b>	20	980	8
<b>T3</b>	40	960	16
<b>T4</b>	60	940	24
<b>T5</b>	80	920	32

Nota. CITA, 2018.

#### Disolución de fluoresceína ( $8,185 \times 10^{-5}$ ) mmol/L

##### Disolución madre (0,8187 mmol/L)

- Se midió 0,0334 g fluoresceína (masa molar 376,3 g/mol, en un balón aforado de 100mL, se agregó unas gotas de etanol al 95% y 50mL de disolución amortiguadora, se colocó en un baño de ultrasonido por dos minutos y finalmente se aforó con la disolución amortiguadora.

##### Disolución intermedia (8,187 $\mu\text{mol/L}$ )

- Se tomó una alícuota de 100 $\mu\text{L}$  de la disolución madre de fluoresceína y se diluyó a 10mL, con disolución amortiguadora en un balón aforado.

##### Disolución de trabajo (81,87 nmol/L)

- Se tomó una alícuota de 250 $\mu\text{L}$  de la disolución intermedia de fluoresceína y se diluyó a 25mL con disolución amortiguadora en un balón aforado. Se trasvaso a la botella del espectrofluorómetro.

-

### Disolución de radical libre AAPH

- Se midieron 0,393g de AAPH (masa molar 271,17 g/mol) directamente en un beaker de 25mL y se agregó una alícuota de 10mL de disolución amortiguadora con ayuda del pipeteador. Se protegió de la luz con un papel aluminio y se colocó en un baño ultrasónico por 2 min hasta que se disolviera completamente. Se trasvasó a la botella del espectrofluorómetro. Se preparó la disolución unos 10 minutos antes de iniciar las lecturas en el espectrofluorómetro.

#### 1. Preparación del extracto de la broza del café para el análisis.

- Se centrifugó el extracto de la broza de café por 10 minutos a 2500 rpm, el líquido se pasó a un filtro de Watman #41 y luego con la ayuda de una jeringa con un filtro de 0,45 $\mu$ m a un balón de 25mL y se aforó con agua grado 1.

#### 2. Dilución de los extractos de la muestra de la broza del café.

- Preparación de una dilución 1/10 de los extractos iniciales de la muestra de la broza del café (100 $\mu$ L extracto + 900 $\mu$ L disolución amortiguadora de fosfatos) en un tubo de microcentrífuga cónico.

A partir de esta disolución se prepararon las otras diluciones en tubos microcentrífuga cónico como se indica en la tabla 9.

**Tabla 9. Diluciones Correspondientes para la Preparación de los Extractos de las Muestras**

Dilución	Alícuota del extracto de la muestras diluida 1/10 ( $\mu$ L)	Disolución amortiguadora ( $\mu$ L)	Volumen total ( $\mu$ L)	Factor de dilución total
1	10	990	1000	1000
2	10	890	900	900
3	10	790	800	800
4	10	690	700	700
5	10	590	600	600
6	20	980	1000	500
7	20	780	800	400
8	30	870	900	300
9	50	950	1000	200
10	100	900	1000	100
11	100	400	500	50
12	100	100	200	20

Nota. CITA, 2018.

**Acondicionamiento del espectrofotómetro Biotek.**

1. Se presionó el botón de encendido que se encontraba en la esquina inferior izquierda del espectrofluorómetro, y se esperó a que se realizara la verificación automática.
2. Se encendió y abrió el software Gen5 1.10.
3. Se seleccionó la opción “New experiment”, y luego, se seleccionó el protocolo “ORAC (ensayo fondo negro) o ORAC (fondo transparente)” según el tipo de placa que esté utilizando.
4. Treinta minutos antes de realizar las lecturas, se inició el precalentamiento del equipo para que se llegara a una temperatura interna de 37 °C. se presionó la viñeta PREHEATING en el software. Marque la casilla ON. Se esperó hasta que se presentará el mensaje “Temperature reached”
5. Justo antes de iniciar la lectura de la placa, se encendió la lámpara de tungsteno. Se presiono la viñeta TUNGSTEN LAMP y se seleccionó la opción TURN LAMP ON. Se espero hasta que se presentara el mensaje “Bulb is on and ready”.
6. Se colocaron las botellas de disolución de trabajo de AAPH (inyector 1) y fluoresceína (inyector 2) donde correspondían.
7. Se sacó el soporte de placas, se presionó el botón negro que se encontraba a mano izquierda encima del botón de encendido del espectrofluorómetro. Se colocó la placa blanca de lavado en el carro soporte de placas.
8. Se iniciaron los inyectores. Se presionó el ícono de mensaje “temperatura” en el software. Se seleccionó la opción “dispenser”, luego se eligió el inyector 1. Se colocaron 2 000 µL en el volumen a dispensar y luego se presionó “prime” y “ok”. Luego se seleccionó el inyector 2, se colocó nuevamente el volumen 2 000 µL y presionó “prime” y “ok”.
9. Se retiró la placa blanca de lavados.

**Análisis preliminar o estudio de diluciones.**

1. Se preparó la placa con 275µL de agua grado 3 en los pozos como se indica en la tabla 10.

**Tabla 10. Distribución de Pozos de Agua en la Placa del Biotek**

Pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua
<b>B</b>	agua											agua
<b>C</b>	agua											agua
<b>D</b>	Agua											agua
<b>E</b>	Agua											agua
<b>F</b>	Agua											agua
<b>G</b>	Agua											agua
<b>H</b>	Agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua

Nota. CITA, 2018.

2. Se colocaron 25  $\mu$ L de cada una de las disoluciones patrón como se describe en la tabla 11

**Tabla 11. Distribución de patrones de Trolox en los pozos de la placa del Biotek**

Pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	agua	Agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua
<b>B</b>	agua	T5									T5	agua
<b>C</b>	agua	T4									T4	agua
<b>D</b>	agua	T3									T3	agua
<b>E</b>	agua	T2									T2	agua
<b>F</b>	agua	T1									T1	agua
<b>G</b>	agua	Blanco									Blanco	agua
<b>H</b>	agua	Agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua

Nota. CITA, 2018.

3. Se eligieron 6 diluciones de las preparadas anteriormente para cada muestra. Siendo estas consecutivas o alternadas con el fin que se cubriera un mayor espectro.
4. Se colocaron 25  $\mu$ L de las diluciones escogidas de las muestras en los pozos. La placa tiene una capacidad de analizar 6 diluciones distintas de 8 muestras diferentes. El acomodo de estas en la placa se describe en la tabla 12.

**Tabla 12. Distribución de las muestras y disoluciones para determinar la capacidad antioxidante**

Pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua
<b>B</b>	agua	<b>T5</b>	M1D1	M2D1	M3D1	M4D1	M5D1	M6D1	M7D1	M8D1	<b>T5</b>	agua
<b>C</b>	agua	<b>T4</b>	M1D2	M2D2	M3D2	M4D2	M5D2	M6D2	M7D2	M8D2	<b>T4</b>	agua
<b>D</b>	agua	<b>T3</b>	M1D3	M2D3	M3D3	M4D3	M5D3	M6D3	M7D3	M8D3	<b>T3</b>	agua
<b>E</b>	agua	<b>T2</b>	M1D4	M2D4	M3D4	M4D4	M5D4	M6D4	M7D4	M8D4	<b>T2</b>	agua
<b>F</b>	agua	<b>T1</b>	M1D5	M2D5	M3D5	M4D5	M5D5	M6D5	M7D5	M8D5	<b>T1</b>	agua
<b>G</b>	agua	<b>Blanco</b>	M1D6	M2D6	M3D6	M4D6	M5D6	M6D6	M7D6	M8D6	<b>Blanco</b>	agua
<b>H</b>	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	Agua	agua

D= dilución, M = muestra y  $D1 < D2 < D3 < D4 < D5 < D6$

Nota. CITA, 2018.

5. Se colocó la placa en el soporte de placas del espectrofluorómetro de Biotek e inicio el análisis. Se presionó la opción “Read” en el software y luego “Ok”
6. El equipo agregó 150  $\mu$ L de la fluoresceína automáticamente, luego, se realizó una lectura inicial de fluorescencia y se detuvo momentáneamente para poder hacer la revisión de fluorescencia. Se eligió la opción “resume”.
7. El equipo esperó 30 minutos para calentar y estabilizar la temperatura interna, después, agrego 25  $\mu$ L de la solución de AAPH automáticamente. Luego se agitó la placa por (15 s) y se midió la intensidad de fluorescencia cada minuto en cada pozo de la placa por 45 minutos.
8. Cuando el análisis finalizó, se abrió el compartimiento de la placa

9. Se realizaron los cálculos respectivos
10. Elección de la dilución cuya AUC net estuviera dentro del ámbito de AUC net de los patrones de Trolox.

#### Determinación de la capacidad antioxidante.

1. Se preparó una placa con 275µL de agua destilada en los pozos. Tal como se indica en la tabla 9
2. Se colocaron 25µL de cada una de las soluciones. Se describe en la tabla 10
3. Se colocó 25µL de la dilución escogida para cada muestra en los pozos el acomodo de éstas en la placa se describe en la tabla 13

**Tabla 13. Distribución de muestras y diluciones para la determinación de capacidad antioxidante**

Pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	Agua	agua
<b>B</b>	agua	T5	M1DE	M3DE	M5DE	M7DE	M8DE	M6DE	M4DE	M2DE	T5	agua
<b>C</b>	agua	T4	M1DE	M3DE	M5DE	M7DE	M8D	M6DE	M4DE	M2DE	T4	agua
<b>D</b>	agua	T3	M1DE	M3DE	M5DE	M7DE	M8DE	M6DE	M4DE	M2DE	T3	agua
<b>E</b>	agua	T2	M2DE	M4DE	M6DE	M8DE	M7DE	M5DE	M3DE	M1DE	T2	agua
<b>F</b>	agua	T1	M2DE	M4DE	M6DE	M8DE	M7DE	M5DE	M3DE	M1DE	T1	agua
<b>G</b>	agua	Blanco	M2DE	M4DE	M6DE	M8DE	M7DE	M5DE	M3DE	M1DE	Blanco	agua
<b>H</b>	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	Agua	agua

DE = dilución elegida, M = muestra

Nota. CITA, 2018.

4. Se colocó la placa en el soporte de placas del espectrofluorómetro e inició el análisis. Se presiono el ícono “Read” en el software y luego “Ok”
5. El equipo agregó 150 µL de la fluoresceína automáticamente, luego, realizó una lectura inicial de fluorescencia y se detuvo momentáneamente para poder hacer la revisión de fluorescencia.
6. El equipo esperó 30 minutos para calentar y estabilizar la temperatura interna, se agregó 25µL de la solución de AAPH automáticamente. Luego agitó la placa (15 s) y midió la intensidad de fluorescencia cada minuto en cada pozo de la placa, por 45 minutos.

7. Cuando el análisis finalizó, se abrió el compartimiento de la placa.
8. Realización de los cálculos respectivos
9. Interpolación de la concentración a  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente por gramo de muestra

Dicho ensayo se efectuó en el laboratorio del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y se empleó la metodología de referencia de dicho laboratorio.

**Figura 29. Espectrofluorómetro Biotek**



Nota. CITA, 2018

#### **Fase VIII. Elaboración de una crema con el extracto obtenido de la broza del café.**

- 1- Se fundieron todos los ingredientes de la fase I, es decir, el ácido esteárico y el alcohol cetílico a una temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$  en un beaker.
- 2- Se adicionó el aceite mineral y se disolvió el propilparabeno, se continuó calentando hasta una temperatura de  $75^{\circ}\text{C}$ , se mezcló por 35 minutos
- 3- Se calentó el agua destilada, la glicerina y la trietanolamina a  $80^{\circ}\text{C}$  y se disolvió el metilparabeno manteniendo así la temperatura a  $80^{\circ}\text{C}$ , se mezcló por 30 minutos
- 4- Se añadió la fase oleosa a la fase acuosa con agitación constante, para formar el núcleo de emulsión. Se mezcló por 30 minutos
- 5- Se trasvasó la crema al recipiente antes de que esta se enfriara
- 6- Se etiquetó el envase de la crema.

#### **Fase IX: Análisis de los resultados obtenidos en el laboratorio.**

En esta fase se recolectaron los resultados obtenidos por cada procedimiento, se realizó una comparación sobre el porcentaje de rendimiento obtenido por cada método de extracción, además

de un análisis y estudio sobre los componentes químicos presentes en la broza del café, así mismo, se determinó la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes, se valoró la posibilidad de realizar un producto farmacéutico específicamente una crema cosmética que contuviera estas propiedades, todo lo antes mencionado se analizó con ayuda de fundamentos teóricos y científicos.

## CAPITULO IV: ANALISIS DE RESULTADOS

En el siguiente apartado se muestran los resultados obtenidos y se provee toda la información conseguida durante la ejecución de esta investigación por medio de imágenes, tablas y gráficas, las cuales proporcionan una mayor comprensibilidad de los resultados logrados. Además, se analizan todos los datos alcanzados y se comprueban todas las teorías mediante referencias y estudios científicos que dan validez a cada una de ellas, contribuyendo de esta manera al alcance de los objetivos.

### **Recolección y almacenamiento de la broza del café**

La broza del café fue recolectada en la Zona de los Santos, durante los meses de febrero y marzo del año 2018, en la Cooperativa Coopedota R.L y en el beneficio de café de Tributos de Ota, debido a que, en Costa Rica específicamente en la Zona de los Santos y como lo menciona el Instituto de café de Costa Rica (2015), la época de cosecha se da entre los meses de noviembre y marzo.

Se recolectó broza de café (*Coffea arabica*) de microlote y de café convencional; sin embargo, para los estudios de contenido de polifenoles y capacidad antioxidante se seleccionó la broza del café de microlote (variedades caturra y catuaí) esto debido a que Molina (2018) destaca que este café se caracteriza por ser más selectivo, porque ha recibido un mayor cuidado en cuanto a sombra, temperatura, procesamiento y en su recolección se busca que sea un café con característico nivel de maduración, esto influye directamente en el nivel de la capacidad antioxidante. Lo anterior permite que sea un café de mayor calidad en cuanto a precio, sabor y contenido de sustancias, a diferencia del café convencional en donde también es variedad caturra y catuaí, pero con la excepción que el nivel de maduración no es tan puntual y tan selectivo como con el café de microlote, sin embargo, sigue siendo un café de calidad.

La broza de café de microlote y la convencional de Coopedota R.L una vez recolectada se secó al sol en un invernadero, a una temperatura aproximada de 30-40 °C durante 8 días, obteniendo así una humedad de un 8%, porque según indicó la Cooperativa Coopedota R.L, este porcentaje de humedad es un valor estándar ya establecido que se obtiene al mantener a la broza del café en un invernadero a la temperatura y días antes mencionado. Por otro lado, la broza del café convencional

del beneficio de Tributos de Ota fue secada igualmente al sol en un invernadero de 30-40 °C, pero con la excepción que se mantuvo en dicho invernadero durante solo 4 días y por ende presentaba un porcentaje de humedad de 75%, dicho porcentaje es debido al valor estándar que tiene el beneficio de Tributos del Ota. Mediante el proceso de secado se evitó la descomposición de la broza, debido al crecimiento de hongos; además se facilitó la penetración del disolvente en el proceso de extracción. La broza ya sometida al proceso de secado se almacenó en bolsas herméticas en un cuarto fresco a una temperatura entre 18 y 22 °C.

**Figura 30. Proceso de Secado de la Broza de Café en Coopedota R.L**



Nota. Coopedota R.L, 2017

**Figura 31. Proceso de Secado de la Broza del Café en el Beneficio Tributos del Ota**



Nota. Beneficio Tributos del Ota, 2018

### **Empleo de los métodos de extracción de Soxhlet y arrastre de vapor para la obtención del extracto de la broza del café**

Para la obtención del extracto de la broza del café se emplearon dos técnicas de extracción, el método de Soxhlet y el de Arrastre por vapor, inicialmente antes que se ejecutara la extracción por los dos métodos, la muestra de la broza del café se maceró con ayuda de un mortero y un pistilo, de esta manera se buscaba obtener una mayor superficie de contacto de la muestra vegetal con el disolvente empleado, para conseguir un mayor rendimiento en la extracción.

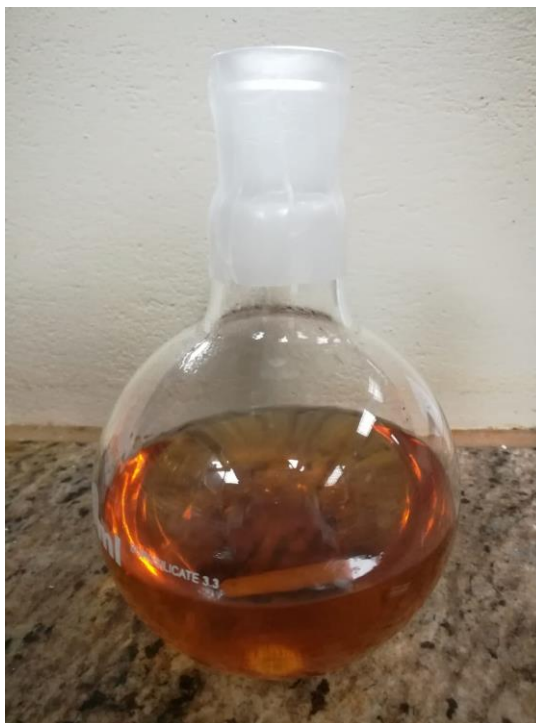
#### **Extracción con equipo de Soxhlet**

Para la extracción de la broza, por medio del método de Soxhlet, se estudiaron dos disolventes: el hexano y el etanol; sin embargo, el disolvente hexano no se empleó, debido a su toxicidad y al efecto fisiológico que provoca, es considerado nefrotóxico, por otra parte se coincidió con Calle y Mendoza 2017, p.56, con respecto a utilizar el disolvente etanol, debido a que resultó ser de fácil manejo, menos tóxico, no generaba reacciones indeseadas en la extracción y producía un mayor rendimiento.

Como menciona Calle y Mendoza 2017, p.56, el método por Soxhlet es el más utilizado para extraer compuestos de materiales vegetales. Inicialmente se colocó un papel aluminio

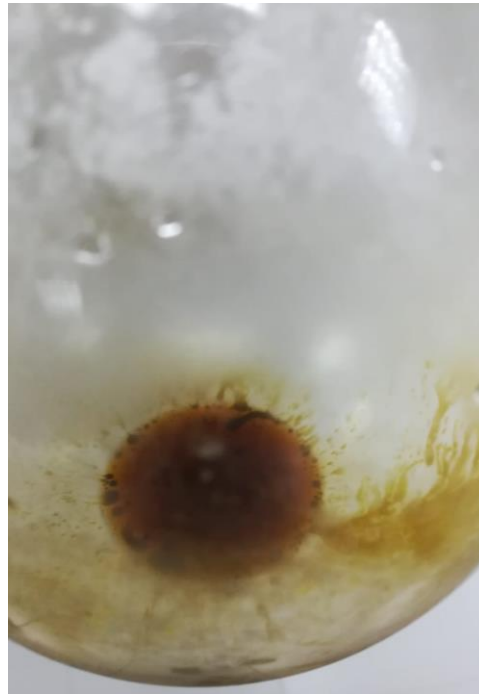
alrededor del balón con el fin de mantener el calor, el proceso se mantuvo en destilación durante 6 horas, posterior a ese tiempo, el extracto se obtuvo en un balón de 500mL y se trasvasó al balón de fondo redondo de este equipo, se mantuvo a una temperatura de 78 °C por lo que el etanol alcanzó su punto de ebullición y se evaporó por completo, logrando purificar el extracto, este procedimiento se efectuó de igual manera, para la broza de microlote y la convencional con 8 y 75 % de humedad.

**Figura 32. Extracto con Disolvente Obtenido Mediante el Método de Soxhlet**



Nota. Autor

**Figura 33. Extracto Obtenido al Eliminar el Disolvente Etanol, Mediante el Rotavapor**



Nota. Autor

Con ayuda de una pipeta volumétrica de 15 ml se obtuvo el extracto del balón y se trasvasó a un vial de vidrio, dicho vial se pesó vacío y después con el contenido del extracto, esto con el fin de determinar su peso y poder calcular seguidamente el porcentaje de rendimiento. Dichos cálculos se muestran a continuación.

**Determinación del peso del extracto de la broza del café de cada muestra.**

**Fórmula**

$$\begin{aligned} & \text{Peso del extracto en gramos} \\ & = \text{peso del vial con el extracto (g)} - \text{peso del vial vacío con tapa(g)} \end{aligned}$$

**Microlote con 8% de humedad**

$$11,96g = 23,02g - 11,06g$$

**Convencional con 8% de humedad**

$$10,57g = 53,97g - 43,40g$$

**Convencional con 75 % de humedad**

$$4,19g = 47,09g - 42,90g$$

**Tabla 14. Peso Total del Extracto Obtenido de la Broza del Café (Coffea arabica)**

<b>Broza</b>	<b>Peso total del extracto</b>
<b>Microlote 8% de humedad</b>	11,96 g
<b>Convencional 8% de humedad</b>	10,57 g
<b>Convencional 75% de humedad</b>	4,19 g

Nota. Autor

**Determinación del porcentaje de rendimiento de la extracción por Soxhlet.****Fórmula**

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{gramos del extracto obtenido}}{\text{gramos de la broza de café}} \times 100$$

**Microlote**

$$38,42 \% = \frac{11,96 \text{ gramos}}{31,13 \text{ gramos}} \times 100$$

**Convencional con 8% de humedad**

$$33,73 \% = \frac{10,57 \text{ gramos}}{31,34 \text{ gramos}} \times 100$$

**Convencional con 75 % de humedad**

$$13,90 \% = \frac{4,19 \text{ gramos}}{30,14 \text{ gramos}} \times 10$$

**Tabla 15. Porcentajes de Rendimiento Obtenidos Mediante Soxhlet**

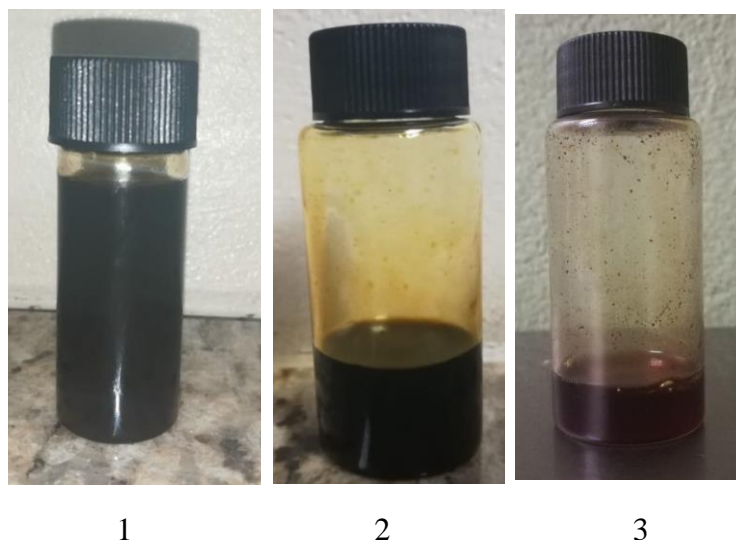
<b>Broza de café</b>	<b>Peso de broza</b>	<b>Peso del extracto</b>	<b>% de rendimiento obtenido</b>
<b>Microlote 8% humedad</b>	31,13 g	11,96 g	38,42 %
<b>Convencional 8% humedad</b>	31,34 g	10,57 g	33,73%
<b>Convencional 75% humedad</b>	30,14 g	4,19 g	13,90%

Nota. Autor

Mediante el método Soxhlet y como se observa en la tabla 15, se obtuvo un porcentaje de rendimiento de extracción de la broza de microlote de un 38.42%, de la broza convencional con 8 % de humedad se logró un 33,73 % y para la broza convencional con 75% de humedad se adquirió un 13.90% de rendimiento. El extracto con mayor humedad presentó una apariencia más acuosa, mientras que la broza con 8% de humedad mostró un aspecto más viscoso y por ende más concentrado, debido a ello la broza con 75% de humedad fue descartada de los próximos análisis. Puertas et al (2012), indica que la humedad provoca alteraciones en las características físicas y químicas de la broza, por tal razón esta debe ser reducida, además que dificulta la penetración del disolvente en el proceso de extracción.

El extracto obtenido de la broza de microlote y convencional al 8% de humedad presentó una apariencia café, aceitosa y melosa, además de un olor dulce y agradable, el extracto obtenido de la broza convencional con un 75 % de humedad presentó las mismas características, pero tenía una apariencia más fluida, esto debido a que la broza presentaba un mayor contenido de agua. En la figura 34 se muestran los extractos obtenidos para cada muestra.

**Figura 34. Extractos Obtenidos Mediante el Método de Soxhlet: 1) Microlote 8% humedad 2) Convencional 8% humedad 3) Convencional 75% humedad**



Nota. Autor

Es importante mencionar que todos los extractos fueron debidamente guardados, para que no se vieran afectados por la luz, calor y humedad.

### **Extracción con equipo de arrastre de vapor**

En esta técnica se empleó como disolvente el agua y se mantuvo la destilación a una temperatura de 250 °C, según el marcador del calentador, una vez completadas las horas de la extracción, se recolectó el destilado, al mismo se le agregó NaCl con el fin de saturar la solución acuosa y facilitar la separación del extracto, seguidamente se transfirió por decantación la solución a un embudo en donde se le hicieron tres lavados con cloroformo, el cual resultó ser más denso que el agua por lo que quedó en la parte inferior del embudo, esta fase orgánica se recolectó y se le agregó sulfato de sodio anhidro, con el fin de eliminar cualquier rastro del agua y así obtener un extracto más puro, posteriormente se eliminó el disolvente con ayuda de un rotavapor para obtener el extracto.

Por el método de arrastre por vapor el extracto fue mínimo, el cual no pudo ser extraído del balón debido a su cantidad, por tal razón el porcentaje de rendimiento no se pudo determinar; sin embargo, se observó que presentaba una apariencia más aceitosa en comparación con el extracto

obtenido mediante Soxhlet, pero en cuanto al olor mostraban semejanza. Balcanzar y Suárez (2011) indican que, sí es posible obtener un extracto de la broza a partir del método de arrastre por vapor, utilizando agua como disolvente, pero que diversos factores pueden influir en el resultado de la extracción. Este método es dependiente de parámetros como lo son el equilibrio líquido vapor, temperatura, presión y composición por lo que una variación en ellos puede provocar un bajo rendimiento de extracción.

**Figura 35. Extracto Obtenido Mediante Arrastre por Vapor**



Nota. Autor

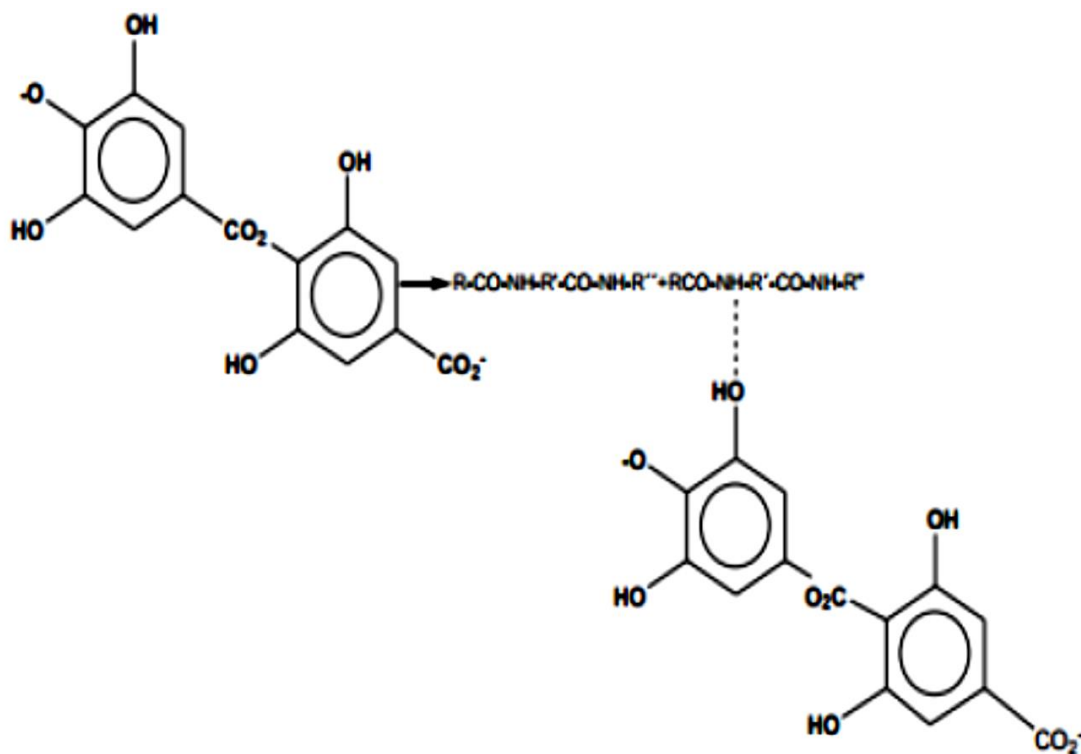
De acuerdo con lo mencionado; el procedimiento que mostró un mayor rendimiento de su extracción fue el de Soxhlet en comparación con el de arrastre por vapor en donde la obtención del extracto fue mínima, por tal razón, el método de Soxhlet resultó ser el más eficaz y por ende el de preferencia de esta investigación para la obtención del extracto de la broza, se coincidió con la investigación de Puertas, Villegas y Rojano (2013) sobre la eficacia y predilección de esta técnica.

### Pruebas de identificación al extracto de la broza del café (*Coffea arabica*).

Se realizaron dos pruebas químicas de identificación de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la broza, específicamente de presencia de polifenoles y de taninos hidrolizables.

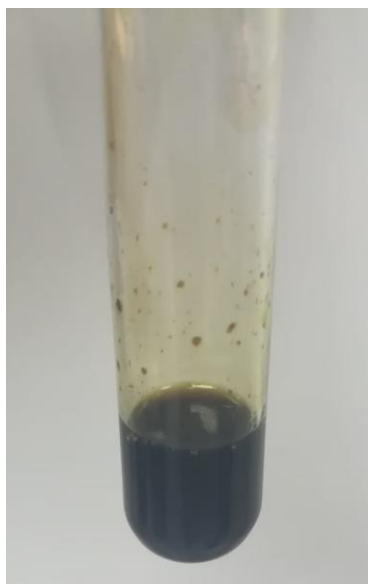
La prueba de gelatina y sal se efectuó mezclando en un tubo de ensayo un mililitro del extracto de la broza y un mililitro del reactivo de gelatina y sal para determinar la presencia de taninos hidrolizables, en donde la aparición de un precipitado provocado por la hidrólisis tanino hidrolizable con el cloruro de sodio en agua y la gelatina neutra, indicarían la presencia de ellos; sin embargo, en dicho extracto y como se presenta en la figura 37, no se obtuvo ningún precipitado y por ende se demostró la ausencia de taninos hidrolizables en el extracto.

**Figura 36. Reacción Taninos Hidrolizables con Reactivo de Gelatina y Sal**



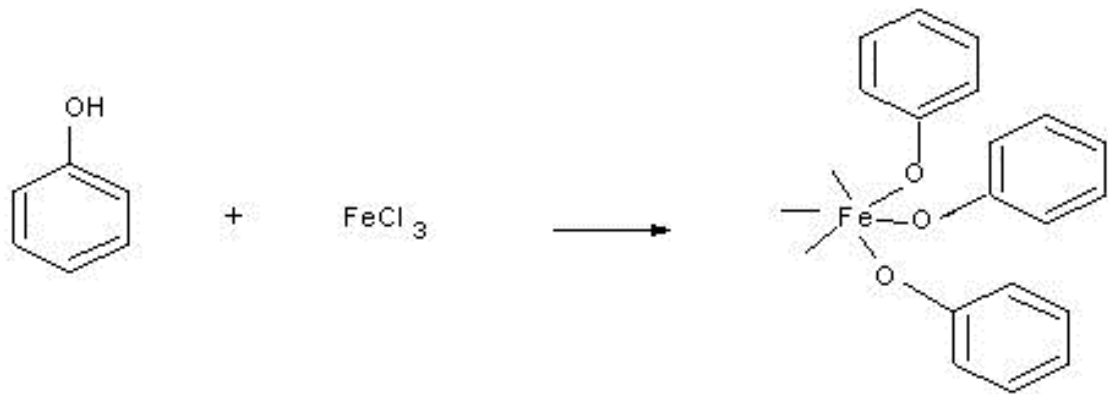
Nota. Calle y Mendoza (2017)

**Figura 37. Prueba de Identificación de Gelatina y Sal de los Taninos Hidrolizables**

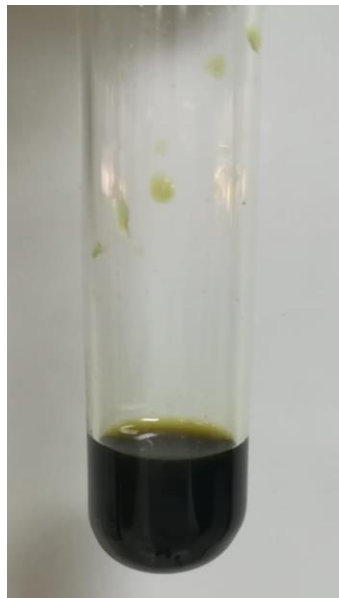


Nota. Autor

La prueba de cloruro férrico permite la determinación de polifenoles presentes en una muestra, mediante un ensayo colorimétrico, en este caso se agregó un mililitro del reactivo a un mililitro del extracto de la broza, se agitó rigurosamente y se presentó como se muestra en la figura 38, una coloración verduzca, indicó la presencia de polifenoles debido a que se mezclaron con las sales de hierro del reactivo y provocaron un ataque del ion hierro al hidrógeno del grupo hidroxilo, reaccionado y desarrollando dicha coloración. Se muestra en la figura 37. Tanto la prueba de gelatina y sal como la de cloruro férrico coinciden con los resultados obtenidos en el estudio de Calle y Mendoza (2017).

**Figura 38. Reacción del Fenol con el Cloruro Férrico**

Nota. Calle y Mendoza (2017)

**Figura 39. Prueba de Identificación de Polifenoles**

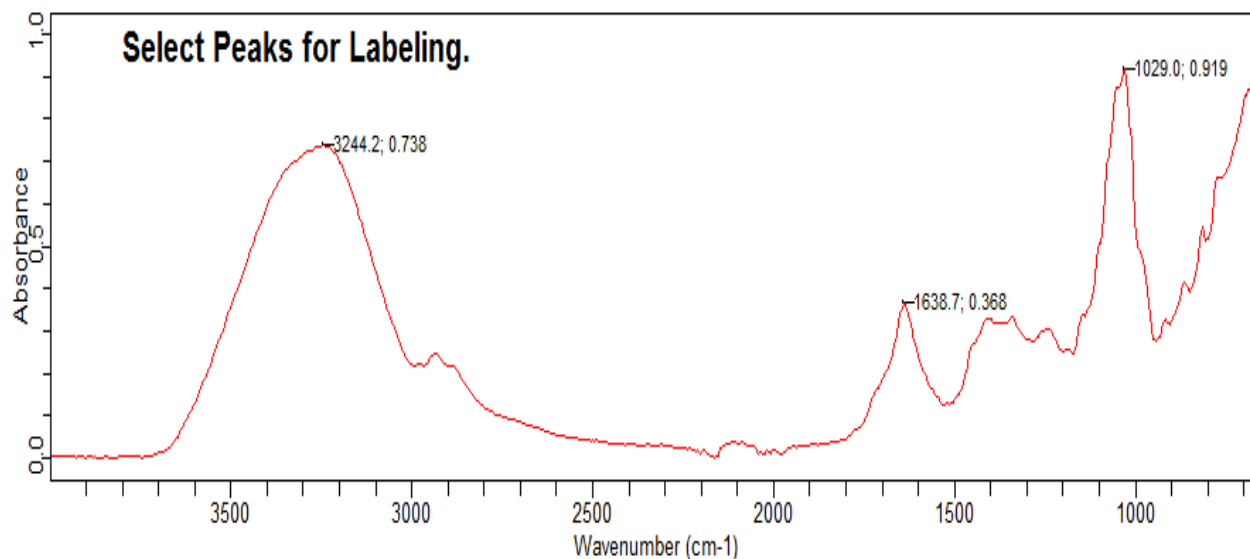
Nota. Autor

## Identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto de la broza del café por Espectrofotometría IR y Cromatografía de gases acoplada a masas.

### *Espectrofotometría IR (Agilent Technologies Cary 630 FTIR).*

Se obtuvo un espectro IR usando el espectrofotómetro (Agilent Technologies Cary 630 FTIR) del extracto de la broza (*Coffea arabica*), es importante mencionar que el análisis se realizó con el extracto fresco de la broza de microlote, debido a que presenta un nivel de maduración mayor el cual y según menciona Puertas et al (2012) posee mayor contenido de fenoles y mediante las pruebas de identificación se obtuvieron iguales resultados tanto para la broza de microlote como la del café convencional. En el espectro IR se observaron las señales de los grupos funcionales más característicos presentes en la muestra del extracto de la broza, en donde cada pico corresponde a un grupo funcional, dicho espectro se muestra en la figura 40.

**Figura 40. Espectro Infrarrojo Obtenido del Extracto de la Broza de Café de Microlote, Mediante el Equipo de Soxhlet**



Nota. Autor

Para el análisis del espectro obtenido, se realizó un listado de las principales bandas que fueron logradas y así mismo se procedió a clasificarlas según el grupo funcional y rango de

absorción presente, esto con el fin de determinar la presencia de sustancias polifenólicas ya que como lo menciona Naranjo, Velaz y Rojano (2011), los derivados que se obtienen a partir de los procesos en que es sometido el café, poseen sustancias con propiedades antioxidantes como los son: los ácidos fenólicos y polifenoles, dichos compuestos se caracterizan por presentar uno o varios grupos OH en su estructura, por esta razón y como se compara con el espectro obtenido y mostrado en la figura 40, la señales que se pretendían encontrar eran las que fueran características a este grupo de sustancias fenólicas.

**Tabla 16. Descripción de la Señales IR Obtenidas en el Extracto de la Broza del Café de Microlote**

<b>Señal detectada (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rango de señal según la teoría (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>
3244,2	3200-3400	OH
1638,7	1600-1700	C = C
1025	1000-1250	C-O

Nota. Autor

Las señales logradas en esta investigación y como se muestra en la figura 40 y en la tabla 16, son las de los grupos OH porque se obtuvo una señal de 3244,2 cm<sup>-1</sup> y como lo indicó Carey y Giuliano (2014. p.548) las señales que se encuentran entre 3200 y 3400 cm<sup>-1</sup> muestran las vibraciones características de estos grupos funcionales OH (hidroxilo) por lo que se demostró la presencia de grupos fenólicos, por otro lado, las señales que se encuentran entre 1600 y 1700 cm<sup>-1</sup> son características de los grupos C = C en este caso se obtuvo una señal de 1638,7 cm<sup>-1</sup> por lo cual se indicó la presencia de este grupo, la señal de 1000-1250 cm<sup>-1</sup> indica un estiramiento de C-O también presente en este extracto de la broza del café en el cual se obtuvo una señal a 1025 cm<sup>-1</sup>.

En la espectroscopia IR, se observaron los grupos funcionales asociados a los grupos polifenólicos que, según la teoría, son los principales componentes de la broza del café. Los resultados obtenidos mediante la prueba de identificación de cloruro férrico y de espectroscopia IR

comprueban la presencia de estas sustancias polifenólicas; sin embargo, algunos de los grupos funcionales de las estructuras detectadas en el IR se determinan y verifican con la cromatografía de gases acoplada a masas mostrada a continuación.

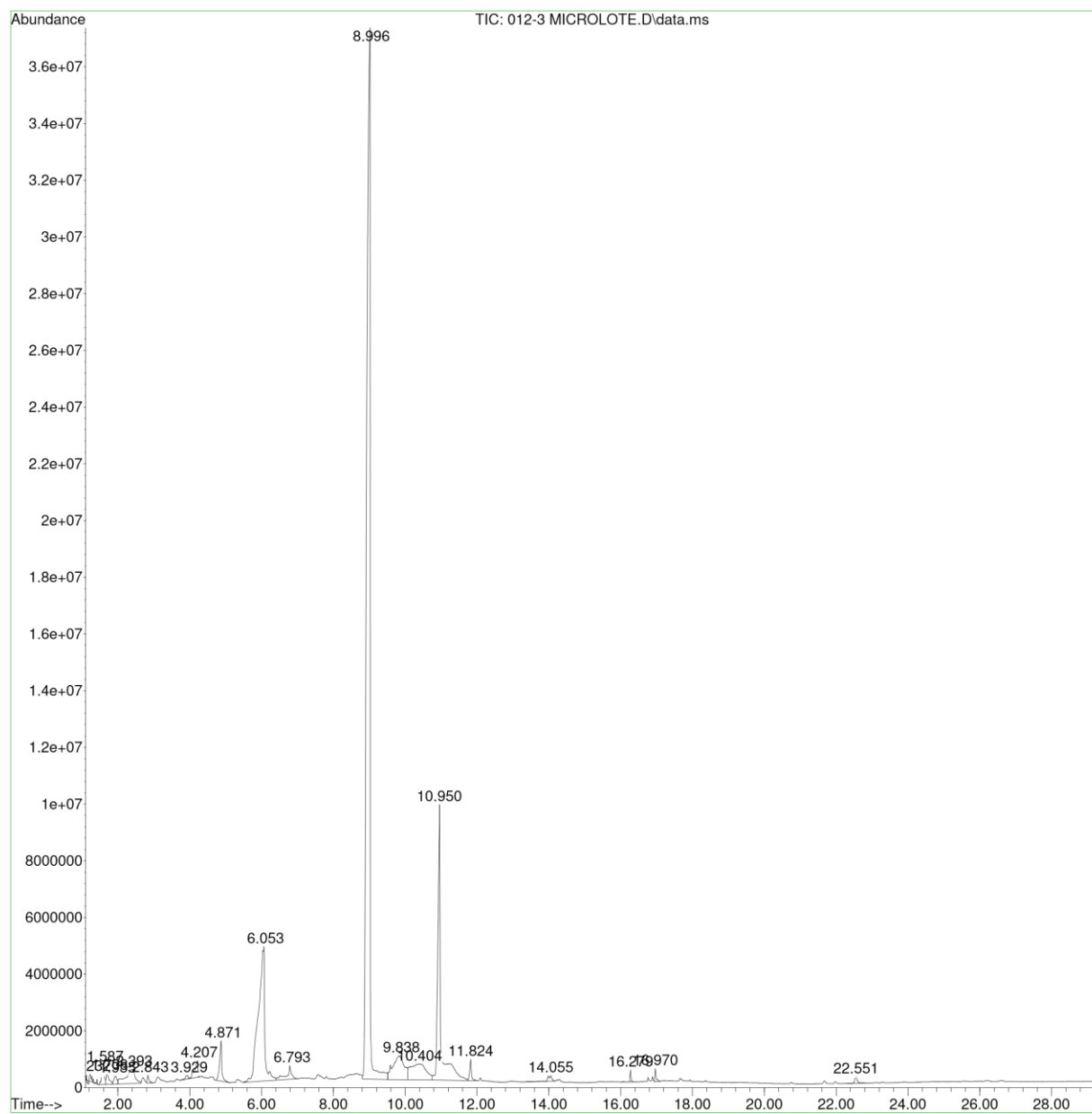
*Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).*

Mediante la cromatografía de gases acoplada a masas se caracterizaron los componentes de interés y presentes en mayor abundancia en el extracto obtenido de la broza del café de microlote y de café convencional, con el fin de realizar una comparación entre la proporción y el contenido de sustancias. Cada pico obtenido representó un componente con su tiempo de retención y su cantidad relativa.

*Extracto de la broza del café de microlote.*

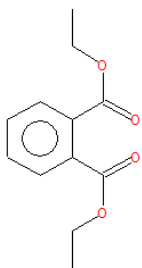
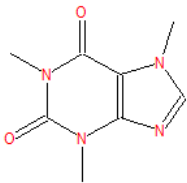
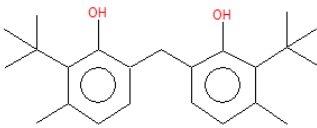
En la figura 41, se muestran los tiempos de retención de los componentes que se encontraban presentes en el extracto de la broza de café de microlote, se obtuvo en promedio la presencia de 20 señales, se tomaron las de mayor interés.

**Figura 41. Cromatografía de Gases Acoplada a Masas del Extracto de la Broza del Café de Microlote**



Nota. Autor

**Tabla 17. Componentes Químicos Mayoritarios y de Interés Presentes en el Extracto de la Broza de Café de Microlote.**

Compuesto	Formula química	Estructura	Tiempo de retención	Área % del componente en la muestra	Probabilidad de coincidencia %
<b>Dietil ftalato</b>	$C_{12}H_{14}O_4$		8,996	56,39	72
<b>Cafeína</b>	$C_8H_{10}N_4O_2$		10,950	12,73	97
<b>Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl-</b>	$C_{23}H_{32}O_2$		16,282	0,19	95

Nota. Elaboración propia, información procedente del análisis realizado en un laboratorio privado, 2018

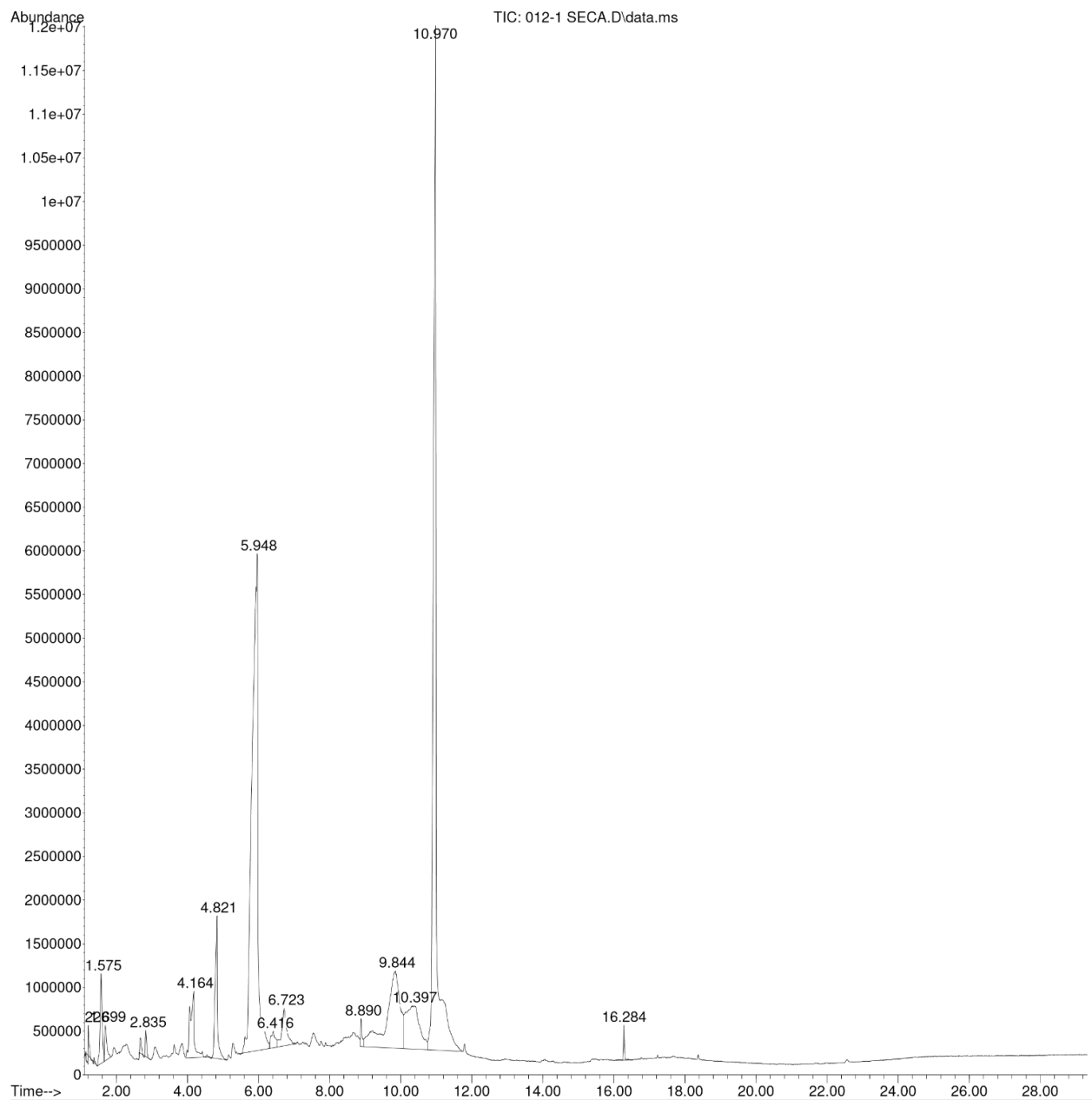
Con respecto al cromatograma de la figura 41 y a la tabla 17 se pudo visualizar que la mayor concentración corresponde al Dietil ftalato, el cual presentó un tiempo de retención de 8,996 y un área porcentual de 56%, dicho compuesto y como lo menciona Silver (2013) es muy utilizado en productos cosméticos y es el responsable del aroma de muchas fragancias; sin embargo, los ftalatos han sido asociados a posibles efectos nocivos en la salud por su alta exposición pero hay

muchos ftalatos diferentes, cada uno con su propia estructura química y propiedades, por esta razón es difícil generalizar sus efectos, el dietil ftalato es el ftalato más inofensivo para la salud y el único ftalato que está aprobado para utilizar en productos cosméticos.

El segundo compuesto que se presentó con mayor proporción en el extracto de la broza convencional fue la cafeína con un tiempo de retención de 10,950 y un área porcentual de 12,73, siguiendo de esta manera el Phenol 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl]- con un tiempo de retención de 16,282 y un área porcentual de 0,19%. Los fenoles son las sustancias de interés de este estudio, debido a que se asocian a las propiedades antioxidantes que presenta la broza del café.

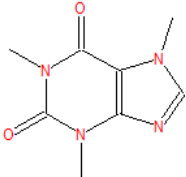
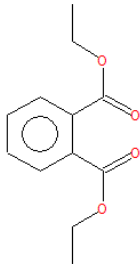
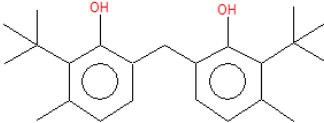
*Extracto de la broza del café convencional.*

**Figura 42. Cromatografía de Gases Acoplada a Masas del Extracto de la Broza del Café Convencional**



Nota. Autor

**Tabla 18. Componentes Químicos Mayoritarios y de Interés Presentes en el Extracto de la Broza de Café Convencional.**

Compuesto	Formula química	Estructura	Tiempo de retención	Área % del componente en la muestra	Probabilidad de coincidencia %
<b>Cafeína</b>	$C_8H_{10}N_4O_2$		10,970	34,28	97%
<b>Dietil ftalato</b>	$C_{12}H_{14}O_4$		8,890	0,43	97 %
<b>Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl-</b>	$C_{23}H_{32}O_2$		16,282	0,40	91%

Nota. Elaboración propia, información procedente del análisis realizado en un laboratorio privado, 2018

En la figura 42, se muestran los tiempos de retención de los componentes que se encontraban presentes en el extracto de la broza de café convencional, se obtuvo en promedio la presencia de 14 señales, se tomaron las de mayor interés. Con respecto al cromatograma y a la tabla 18 se logró visualizar que la mayor concentración a diferencia del resultado obtenido de la broza

de microlote fue la de la cafeína la cual presentó un área de retención de 10,970 y un área porcentual de 34,28 %, seguido de la cafeína se encontraba el Dietil ftalato. y finalmente el Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl-

Como se muestra en la tabla 17 y 18, el contenido mayoritario de la broza de microlote fue de Dietil ftalato a diferencia del de café convencional, el cual presentó menor cantidad de dicho compuesto, la cafeína se encontraba en mayor proporción en el extracto de la broza de café convencional. En cuanto al contenido del fenol (Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl-) se hallaba en mayor proporción en la broza del café convencional.

Los datos obtenidos y reflejados en las tablas 17 y 18 coinciden con la literatura, ya que se demostró la presencia de cafeína y fenoles, como en la investigación de Fonseca, Calderón y Rivera (2013); sin embargo, la presencia del Dietil ftalato no se encuentra como componente en la broza de café de dicho estudio, además del fenol hallado, estos autores destacan que entre los fenoles principales que se encuentran en la cáscara del café son el ácido clorogénico y los taninos.

Es importante destacar que la variación en el contenido y tipo de sustancias presentes tanto en el extracto de la broza del café de microlote como en la de café convencional pudo haber variado debido al nivel de maduración, procesamiento, lugar de origen y condiciones a las cuales fue sometido cada material, porque el café de microlote y como se mencionó es un café más selecto y con un nivel de maduración mayor al del café convencional, esta diferencia favoreció a la variación en cuanto al contenido de sustancias presentes en cada broza.

Se encontró que la broza del café convencional presentó una mayor proporción de la sustancia de interés, es decir del fenol, por lo que resultó ser la broza de preferencia de este estudio. Para los análisis de la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante se empleó la broza de café de microlote, debido a que en ese momento no se contaba con los resultados de la cromatografía de gases acoplada a masas y se seleccionó debido a que Puertas et al (2012), destaca que el nivel de maduración es un factor indicativo de mayor contenido de polifenoles. Mediante la cromatografía de gases acoplada a masas se determinó que el nivel de maduración no fue un factor determinante del contenido de polifenoles.

### Cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto de la broza del café (*Coffea arabica*), mediante el método de Folin Ciocalteu

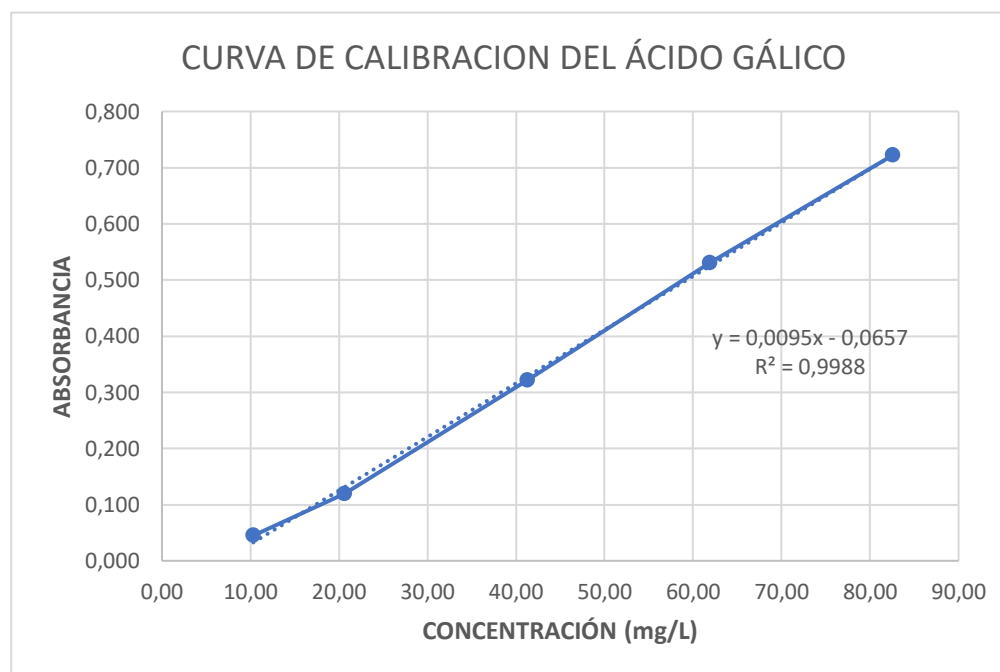
El método de Folin Ciocalteu permite la cuantificación de los polifenoles totales presentes en una muestra, mediante la formación de la coloración y medición de su intensidad, es directamente proporcional al contenido de polifenoles. Inicialmente, se preparó una curva de calibración con ácido gálico, para así poder interpolar en la curva la concentración de las muestras y las absorbancias y concentraciones obtenidas se muestran en la tabla 19 y la curva de calibración en la figura 43.

**Tabla 19. Valores de la Curva de Calibración del Ácido Gálico**

Cn (mg/L)	Absorbancia
10,32	0,045
20,64	0,119
41,28	0,322
61,92	0,531
82,56	0,722

Nota. CITA, 2018

**Figura 43. Curva de Calibración del Ácido Gálico**



Nota. CITA, 2018

Seguidamente se preparó la muestra y se tuvo que pasar por un filtro de Watman #41, esto con el fin de eliminar cualquier partícula que pudiera interferir en el análisis, el extracto se trató de dos maneras parte A y B, en la parte A se elaboraron distintas disoluciones y se buscó una dilución ideal en donde el valor de la absorbancia quedara dentro del ámbito lineal de la curva de calibración y se leyeron las absorbancias, seguidamente en la parte B mediante un cartucho de oasis se retuvieron los polifenoles, este cartucho se empleó para lograr una mayor pureza y reproducibilidad del análisis, luego se obtuvieron las absorbancias respectivas, todos los procesos se ejecutaron por duplicado.

Las disolución ideal de la parte A correspondió a la de la alícuota de 0,1mL y el volumen total de 10mL y la de la parte B perteneció a la de la alícuota 0,5 mL y el volumen total de 3mL, seguidamente con las concentraciones encontradas mediante la interpolación de las absorbancias de cada disolución, se calculó la concentración inicial para cada muestra; mediante el factor de disolución y se determinó el equivalente de los mg de ácido gálico en 100 gramos del extracto de la broza del café. Es importante mencionar que tanto la parte A como la B se realizaron por duplicado. Los cálculos correspondientes se muestran a continuación y se representan según su parte A) y B). En la tabla 20 se muestran claramente los resultados obtenidos.

### **Determinación de los mg de ácido gálico equivalentes a 100 g del extracto**

#### **Fórmula**

$$\frac{mg \text{ ácidogálico}}{100g \text{ de extracto}} = \frac{mg \text{ ácido gálico}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{ml \text{ disolvente}}{ml \text{ del extracto}} \times 100g \text{ de extracto}$$

#### **Cálculos**

$$A) \frac{636 \text{ mg ácidogálico}}{100g \text{ de extracto}} = \frac{63,6 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0,1 \text{ ml}} \times 100g \text{ de extracto}$$

$$B) \frac{21,4 \text{ mg ácidogálico}}{100g \text{ de extracto}} = \frac{34,5 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{3,1 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} \times 100g \text{ de extracto}$$

$$A) \frac{651,7 \text{ mg ácidogálico}}{100g \text{ de extracto}} = \frac{65,2 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10 \text{ ml}}{0,1 \text{ ml}} \times 100g \text{ de extracto}$$

$$B) \frac{21,1 \text{ mg ácido gálico}}{100 \text{ g de extracto}} = \frac{35,1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{3 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} \times 100 \text{ g de extracto}$$

### Eliminación de las interferencias para obtener la concentración final de polifenoles totales

Para eliminar las interferencias fue necesario restar los valores de la parte A y la B para obtener resultados más certeros, dichos cálculos se muestran a continuación.

### Fórmula

$$Cn \text{ final de polifenoles totales} \frac{\text{mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}} = Cn \text{ Parte A} - Cn \text{ Parte B}$$

$$\frac{614,5 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}} = \frac{636 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}} - \frac{21,4 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}}$$

$$\frac{630,6 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}} = \frac{651,7 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}} - \frac{21,1 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ g extracto}}$$

**Tabla 20. Resultados Detallados y Obtenidos para la Determinación de Polifenoles Totales**

Replica	Alí 1 (ml)	Vol 1 (ml)	Alí 2 (ml)	Vol 2 (ml)	Abs	Cn según la curva (mg/L)	Cn muestra (mg/100g muestra)	Cn final (Cn parte a - Cn parte b)	Cn media (mg/100g muestra)
<b>1 a</b>	0.1	10	-	-	0,541	63,6	636,0	614,5	622,6
<b>1 b</b>	-	-	0,5	3	0,264	34,6	21,4		
<b>2 a</b>	0,1	10	-	-	0,556	6,2	651,7	630,6	
<b>2 b</b>	-		0,5	3	0,269	35,1	21,1		

Nota. CITA, 2018

Según la cuantificación que se realizó a los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la broza del café estudiado por medio del método de Folin Ciocalteu, se exhibió que dicho extracto presentó un aporte de entre intermedio y alto de fenoles totales, los cuales y como

se analiza mediante el método de ORAC, pueden presentar propiedades antioxidantes, lo que potencializa así sus posibles efectos beneficiosos en la salud del ser humano, por tal razón se realizó dicho ensayo, con la intención de obtener un estudio que refuerce que la broza del café posee alto contenido de compuestos polifenólicos y por ende pueda ser altamente aprovechada en la industria farmacéutica.

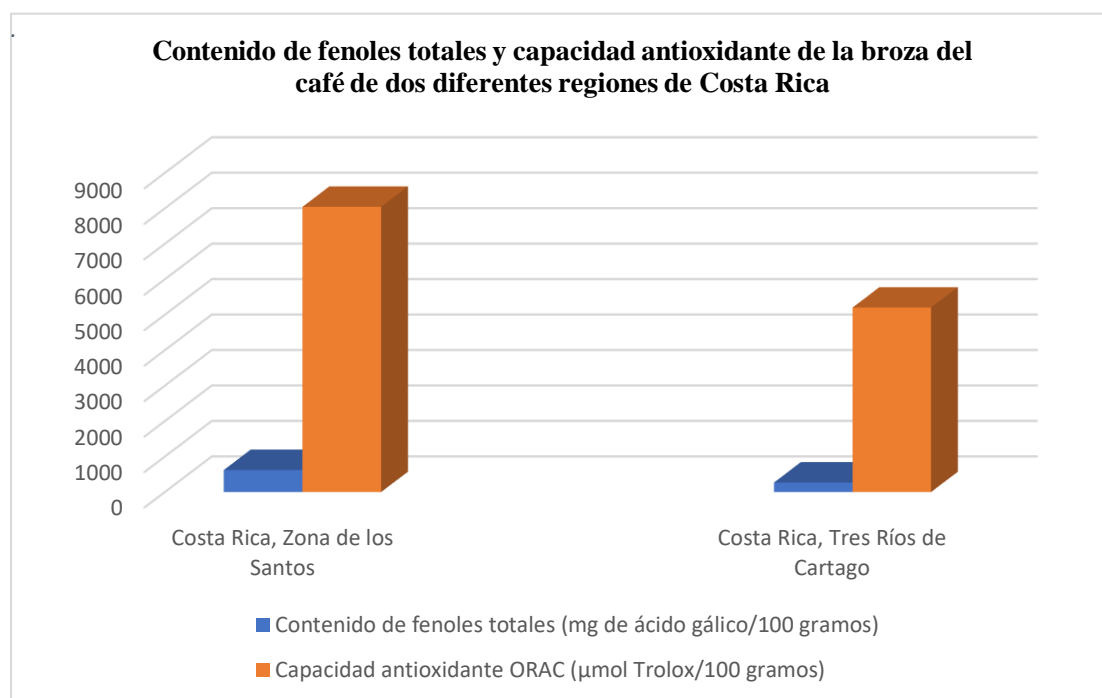
En la tabla 20 y en la figura 44 se exponen los resultados obtenidos de la cuantificación de los fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu y la capacidad antioxidante ORAC, de la broza del café de la región de Tres Ríos, Costa Rica; este fue el único estudio encontrado, en donde se comparan los contenidos de polifenoles totales y capacidad antioxidante del extracto de la broza del café, dichos resultados de contenido de polifenoles se expresan en mg equivalentes de ácido gálico/ 100g del extracto o muestra de la broza del café y la capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol}$  Trolox/100g de extracto.

**Tabla 21. Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de la Broza del Café de Diferentes Regiones**

<b>Extracto de la broza de café (<i>Coffea arabica</i>) proveniente de:</b>	<b>Contenido de fenoles totales (mg de ácido gálico/100 gramos)</b>	<b>Capacidad antioxidante ORAC (<math>\mu</math>mol Trolox/100 gramos)</b>
Costa Rica, Zona de los Santos (extracto obtenido en esta investigación)	$622 \pm 16$	$8044 \pm 449$
Costa Rica, Tres Ríos de Cartago	$270 \pm 13$	$5204 \pm 602$

Nota. Elaboración propia e información procedente de Jiménez (2016).

**Figura 44. Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de la Broza del Café de dos Diferentes Regiones de Costa Rica**



Nota. Elaboración propia e información procedente de Jiménez (2016)

Tal como se representó en la tabla 21 y en la figura 44, el extracto de la broza de café de la Zona de los Santos, Costa Rica obtenido en esta investigación, presentó mayor contenido de fenoles totales  $622 \pm 16$  mg ácido gálico/100g extracto y de capacidad antioxidante  $8044 \pm 449$   $\mu\text{mol Trolox}/100$  gramos del extracto, que el valor reportado por Jiménez (2016) en donde este alcanzó un valor de fenoles totales de  $270 \pm 13$  mg de ácido gálico/100 gramos del extracto y una capacidad antioxidante de  $5204 \pm 602$  en la broza del café proveniente de Tres Ríos de Cartago.

Esta diferencia se debe a que en Costa Rica se cuenta con distintas zonas cafetaleras donde variadas altitudes, suelos y climas de cada una de estas regiones influyen en los meses de maduración y características del café, lo mencionado anteriormente se comprobó, ya que la zona de los Santos se encuentra a una altitud mayor y presenta un clima más frío en comparación con la zona de Tres Ríos, por esta razón, se demostró que las condiciones de altitud y climáticas de la zona de los Santos favorecieron en el contenido de polifenoles totales y por ende en la capacidad antioxidante del extracto de la broza del café del presente estudio.

Jiménez (2016) destaca que el contenido de polifenoles totales es proporcional a la actividad antioxidante, es decir, entre mayor número de polifenoles presentes en el extracto mayor es su capacidad antioxidante y entre menor contenido de compuestos fenólicos, menor es la propiedad antioxidante. Se comprueba en el análisis mostrado en la tabla 21 y en la figura 44 en donde se observa que la broza de café de la zona de los Santos presentó un mayor contenido de polifenoles totales y por ende mayor capacidad antioxidante que la proporción fenoles totales y capacidad antioxidante de broza del café de Tres Ríos de Cartago.

En el siguiente apartado se mostrarán y analizarán los datos obtenidos mediante el método de ORAC, se retomaron y analizaron los resultados del contenido de polifenoles totales y su relación con su capacidad antioxidante.

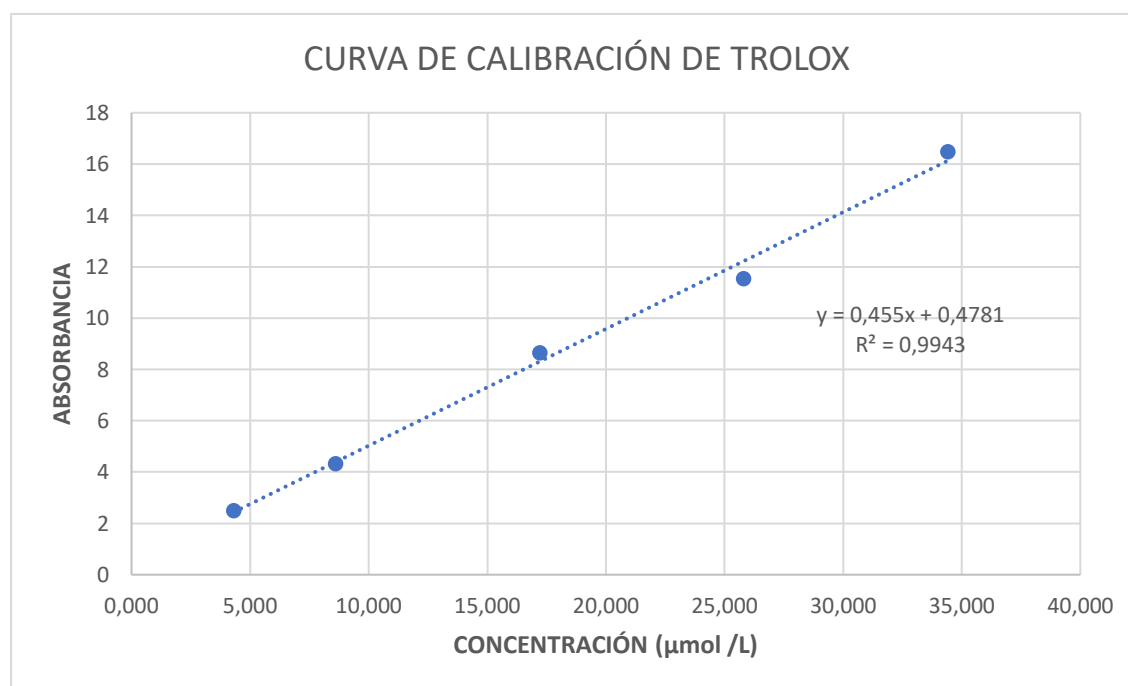
**Valoración de la capacidad antioxidante del extracto de la broza de microlote al 8% de humedad del café (*Coffea arabica*) mediante el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno)**

El método de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) permite la determinación de la capacidad antioxidante de una muestra, mediante el mantenimiento de la coloración de una sonda fluorescente en donde el mantenimiento de dicha coloración es directamente proporcional a la capacidad antioxidante. Inicialmente se preparó una curva de calibración con Trolox, para así poder interpolar en la curva la concentración de las muestras de estudio dicha curva, las absorbancias y concentraciones obtenidas mediante el reactivo de Trolox se muestran en la tabla 22 y la curva de calibración en la figura 45.

**Tabla 22. Valores de la Curva de Calibración de Trolox**

Absorbancia	Cn Trolox ( $\mu\text{mol/L}$ )
2,5015	4,301
4,3125	8,603
8,651	17,205
11,5345	25,808
16,486	34,410

Nota. CITA, 2018

**Figura 45. Curva de Calibración de Trolox**

Nota. CITA, 2018

Seguidamente se preparó la muestra y se tuvo que pasar por un filtro de Watman #41, esto con el fin de eliminar cualquier partícula que pudiera interferir en el análisis, se elaboraron distintas disoluciones de los amortiguadores (fosfatos), de Trolox, de la fluoresceína y del radical libre AAPH, seguidamente se realizó la dilución de los extractos de las muestras y se buscó la ideal, se acondicionó el espectrofotómetro Biotex, el cual ofrece un excelente rendimiento para mediciones

en el rango UV-visible en microplacas, el mismo realiza los respectivos análisis de datos para encontrar las 6 disoluciones más apropiadas, el software efectuó directamente los cálculos y se eligió la AUC net que estaba dentro del ámbito de AUC net de los patrones de Trolox, finalmente se determinó la capacidad antioxidante de la muestra con las disoluciones patrón y la disolución con el AUC net escogida (CITA,2018).

Inicialmente los análisis se elaboraron por duplicado y a cada muestra se les denominó muestra 1911-1,1 y 1911-1,2, para cada una se realizaron seis replicas y el equipo arrojó los resultados correspondientes de la concentración para cada una, finalmente se obtuvo el promedio. En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos mediante el método de ORAC.

**Tabla 23. Resultados Obtenidos Mediante el Método de ORAC**

Muestra	Réplica	Promedio	Capacidad antioxidante final
1911-1,1	8236,7	8045,8	8044±449 (μmol Trolox/100g de extracto)
	8187,7		
	7962,9		
	7830,0		
	9287,3		
	6770,3		
1911-1,2	7568,4	8042,2	
	7045,2		
	9350,6		
	8603,6		
	7983,3		
	7702,3		

Nota. CITA, 2018

De acuerdo con el análisis del contenido de polifenoles totales, composición y capacidad antioxidante presente en el extracto de la broza del café, se determinó que la cáscara del café presenta entre un alto e intermedio contenido de fenoles totales al igual que su capacidad antioxidante, lo que favorece su posible utilización y beneficio para la salud del ser humano, por tal razón se realizó este análisis ORAC, con la intención de obtener un ensayo que refuerce que los extractos de la broza del café (*Coffea arabica*) obtenidos poseen capacidad antioxidante.

Se tomó como referencia el estudio realizado por Zapata, Piedrahita y Rojano (2014) sobre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de distintos frutos con un alto

potencial nutricional y terapéutico y se compararon con los resultados obtenidos en el extracto de la broza del café, con el fin de determinar y comparar mediante una base de datos en que proporción; alto, intermedio y bajo era el contenido de fenoles totales expresados en (mg de ácido gálico/100 gramos) y así su capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol Trolox}/100$  gramos), dichos métodos realizados por Folin Ciocalteu y ORAC, respectivamente, del extracto obtenido de la broza del café (*Coffea arabica*) de esta investigación, dicha comparación se muestra en la tabla 24.

**Tabla 24. Contenido de Fenoles Totales y Valores ORAC de Frutas Colombianas**

Nivel de fenoles totales y capacidad antioxidante	Nombre del fruto	Fenoles totales mg ácido gálico/ 100g	ORAC μmol Trolox/ 100g
<b>Alto</b>	Curuba	10584 ±260,6	207850,4 ±2906,5
	Mora	1864,4 ±44,0	12759 ± 1002,1
	Fresa	1638 ±9,2	35841,7 ±2566,3
	Mortiño	1237 ±46,0	34825,6 ±819,7
	Guayaba	1192,2 ±27,8	11988,2 ± 872,7
	Carambola	863,3 ±31,6	26979,8 ±1320,3
	Guayaba manzana	805,1 ±22,4	18069,0 ± 851,9
	Granadilla	664,8 ± 20,4	8667, 9 ± 798,5
<b>Intermedio</b>	Manzana roja	426,7 ±4,1	19008,1 ± 600,3
	Ciruela morada	376,5 ±5,6	8238,7 ± 125,8
	Uva	290, 6 ± 12,0	5537, 9 ±310,2
	Piña	268,6 ± 5,4	4404,5 ± 166,2
	Mandarina	242,6 ±3,1	8998 ± 294,6
	Tomatillo de palo	226,0 ±8,2	4836, 0 ±155,3
	Kiwi	199,3 ± 4,9	4651 ±384,8
	Papaya	134,1 ± 4,7	1385, 5 ± 102,9
	Pera	124,7 ± 3,2	2996,1 ± 193,2
<b>Bajo</b>	Banano	84,8 ± 1,9	2572, 7 ± 136,0
	Mango	78,3 ± 2,5	685,7 ±38,3
	Maracuyá	39,1 ± 1,9	2154,5 ± 74,3
	Durazno	30, 5 ± 1,4	5257,0 ± 133,9

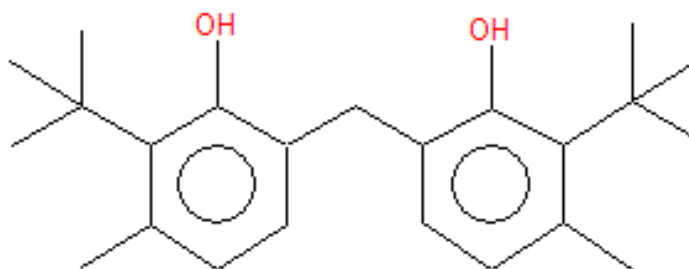
Nota. Zapata, Piedrahita y Rojano (2014)

En dicha tabla se pudo observar que el fruto con mayor contenido de polifenoles totales y por ende de capacidad antioxidante fue la curuba con un contenido de fenoles de  $10584 \pm 260,6$  mg ácido gálico/ 100 gramos y una propiedad antirradical de  $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos}$ , seguido así por la mora, fresa, mortiño, guayaba, carambola, guayaba de manzana y por último la granadilla en donde fueron clasificadas con un alto contenido de fenoles totales y su capacidad antioxidante, entre los valores intermedios se encontraban la manzana roja, ciruela morada, uva, piña, mandarina, tomatillo de palo, kiwi, papaya y la pera y por último se encontró que el banano, mango, maracuyá y durazno se clasificaron como un bajo contenido de estas sustancias y en consecuencia así su capacidad antioxidante.

Con respecto a lo descrito y con los resultados obtenidos de  $622 \pm 16$  mg ácido gálico/ 100 gramos de fenoles totales y  $8044 \pm 449$   $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos}$  de capacidad antioxidante del extracto de la broza del café de este estudio se puede deducir que dicho extracto se encontraba en el grupo con un alto contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, ya que dichos resultados se asemejan con los obtenidos con la granadilla los cuales fueron de  $664,8 \pm 20,4$  mg ácido gálico/ 100 gramos de fenoles totales y  $8667,9 \pm 798,5$   $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos}$  de capacidad antioxidante, por lo que la broza del café se posicionó al final de los valores que se clasificaban como altos, es decir por debajo de la granadilla, (Zapata, Piedrahita y Rojano, 2014). Destaca que el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante generalmente es proporcional; sin embargo, se pueden presentar correlaciones bajas o moderadas entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, esto debido a la posible presencia de otros compuestos no fenólicos que presenten propiedades antioxidantes.

De acuerdo con la tabla 24, la broza del café del presente análisis presenta un alto contenido de sustancia o sustancias polifenólicas y por ende una alta capacidad antioxidante, de esta manera, se concuerda con Puertas, Villegas y Rojano (2013), que los subproductos; en este caso la broza del café sí presentan un elevado contenido de estas sustancias polifenólicas y capacidad antioxidante; sin embargo, y como se observó en el análisis realizado por cromatografía de gases acoplada a masas, la muestra de la broza del café solo presentó un tipo de polifenol específicamente el Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl-

**Figura 46. Estructura del Único Fenol Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl- Encontrado en el Extracto de la Broza del Café**



Nota. Autor

La eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos aumenta cuando los grupos t-butilo se encuentran en las posiciones 2,4,6 del anillo aromático. Agüero, M., Segura, C. y Parra, J. (2013), como en el presente caso, por tal razón los resultados obtenidos mediante ORAC y Folin Ciocalteu, demuestran que dicho contenido de fenoles y su capacidad antioxidante fueron suficientes para poder considerar a la broza del café como una fuente potencial de sustancias con capacidad antirradical.

#### **Posible formulación cosmética a base del extracto de la broza del café (*Coffea arabica*)**

Debido a la alta capacidad antioxidante y contenido de polifenoles presentes en el extracto de la broza del café de este estudio, es posible realizar una forma farmacéutica que contenga dichas sustancias para proporcionar una fuente externa de estos compuestos con el fin de restablecer y equilibrar sus valores en el tejido de la piel del organismo humano. Rodríguez (2017) y Castillo, Ibáñez, Amigo y Herrero (2013) revelan que es posible emplear las sustancias antioxidantes provenientes de materiales vegetales en productos farmacológicos, alimenticios y dermocosméticos, ya que esta propiedad resulta ser altamente beneficiosa en la piel del ser humano, y al utilizar estas sustancias antioxidantes se logra retrasar el envejecimiento de la piel, el cual es causado mayoritariamente por los radicales libres y el estrés oxidativo que se generan por los rayos ultravioleta.

Con respecto a lo descrito y según menciona y comprueba Castillo, Ibáñez, Amigo y Herrero (2013), el extracto de broza de café puede ejercer varios roles importantes en la

composición cosmética, tales como conservante, aromatizante, antioxidante y por ende antienvjecimiento de la piel, pudiéndose así aplicar en dicho tejido, además que la cafeína presente en ella se asocia a tener un efecto anticelulítico. En los análisis realizados por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS), se comprobó que la cafeína es uno de los componentes principales presentes en el extracto de la broza del café, por tal razón también puede presentar y ofrecer un beneficios cosmético adicional.

El emplear compuestos polifenólicos en cosméticos es una opción factible y más si son provenientes de muestras vegetales, de esta manera lo demuestra la línea francesa cosmética Caudalíe Paris ®, la cual ha elaborado productos cosméticos a base de pepitas (semillas de uva) que poseen polifenoles de alta capacidad antioxidante neutralizando así los radicales libres causantes del 80 % del envejecimiento cutáneo. Este beneficio de las sustancias polifenólicas lo comprueban y aseguran debido a los 7 años de estudio y múltiples pruebas que han realizado, dicha línea francesa aprovecha las semillas, evitando su desecho, generando productos altamente beneficiosos para la piel, los cuales son de prestigio y altamente reconocidos en muchas partes del mundo Caudalíe, (2018). En la figura 47, se muestran los productos Caudalíe Paris ®, elaborados a base de polifenoles de la uva.

**Figura 47. Productos Caudalíe Paris**



Nota. Caudalíe, 2018

## **Elaboración de una crema cosmética a base del extracto de la broza del café con propiedades antioxidantes**

El extracto de la broza de café presentó un alto contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, por lo que es posible generar una forma farmacéutica con estas sustancias proporcionando una fuente externa de estos compuestos permitiendo restablecer y promover un equilibrio oxidativo en el plasma sanguíneo y los tejidos corporales. Zapata, Piedrahita y Rojano (2014) indican que el consumo diario oral aconsejable de productos con capacidad antioxidante es de 3000 a 5000  $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos}$ ; sin embargo, el valor mínimo y máximo diario requerido de esta capacidad antirradical en la piel no está establecido en la literatura.

Al igual que la capacidad antioxidante no existe evidencia de cuál es la cantidad mínima y máxima requerida de los polifenoles en la piel; sin embargo, Valencia, Figueroa, Sosa, Bartolomé, Martínez y García (2017), establecen que el consumo diario oral habitual del ser humano de polifenoles debe ser de aproximadamente entre 25 mg y 1g por día y que esta ingesta puede alcanzar concentraciones tóxicas de polifenoles en el organismo si se encuentra entre el 1 y 5 % de la dieta diaria, ocasionando una interferencia en la absorción del hierro consumido en los alimentos y provocando así una anemia.

Un estudio elaborado por Castillo, Ibáñez, Amigo, Herrero, Plaza y Ullate (2013, p.7), indica que una crema cosmética con una capacidad antioxidante de 470  $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos}$  de crema, es considerada de excelente calidad para ser aplicada en la piel y así cumplir con el propósito de proveer el equilibrio oxidativo en este tejido, retrasando el envejecimiento cutáneo.

Lo antes mencionado permitió poder establecer que cantidad de extracto de la broza del café era necesario para elaborar la crema cosmética, valorando así tener en ella una capacidad antioxidante y contenido de polifenoles aceptable. Por esta razón para elaboración de la crema cosmética de esta investigación se buscó agregar una cantidad de extracto de broza de café a la formulación que tuviera un equivalente de capacidad antioxidante aproximado de 470  $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos}$  de crema, para ello se realizaron los siguientes cálculos.

### **Gramos de extracto de la broza del café requeridos para obtener una capacidad antioxidante aproximada de 470 $\mu\text{mol}$ de Trolox/100 gramos de la preparación**

Inicialmente se determinó que 8044  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalían a 100 gramos de extracto de la broza del café, por lo que mediante una regla de tres se estableció cuanta cantidad del extracto era necesaria para obtener una capacidad antioxidante de 470  $\mu\text{mol}$  de Trolox.

#### **Capacidad antioxidante.**

#### **Fórmula**

$$\text{Gramos de extracto requeridos} = \frac{\mu\text{mol de Trolox requerido} \times 100 \text{ gramos de extracto}}{8044 \mu\text{mol de Trolox}}$$

#### **Cálculos**

$$5,8 \text{ gramos de extracto requeridos} = \frac{470 \mu\text{mol de Trolox} \times 100 \text{ gramos de extracto}}{8044 \mu\text{mol de Trolox}}$$

#### **Polifenoles totales.**

Con la cantidad de gramos requeridos para obtener la capacidad antioxidante de 470  $\mu\text{mol}$  de Trolox, se determinó el contenido de polifenoles totales en esa muestra, calculando así mediante una regla de tres cual era el contenido de polifenoles totales en 5,8g de extracto si 100 gramos de este equivalían a 622mg de ácido gálico.

#### **Fórmula**

*Polifenoles totales en la formulación*

$$= \text{gramos de extracto agregados a la formulación} \times \frac{\text{mg de ácido gálico}}{\text{gramos de extracto}}$$

## Cálculos

$$\frac{36,076 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ gramos de crema}} = 5,8 \text{ gr} \times \frac{622 \text{ mg de ácido gálico}}{100 \text{ gr de extracto}}$$

Como se observan en los cálculos anteriores, para obtener la capacidad antioxidante deseada de 470  $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos de crema}$  cosmética se requieren de 5,8 g del extracto de la broza del café con una capacidad antioxidante de 8044  $\mu\text{mol Trolox/ 100 gramos de extracto}$ , dichos 5,8 gr del extracto equivalen también a una cantidad de polifenoles totales de 36,076 mg de ácido gálico /100 gramos de crema cosmética, dicho valor de polifenoles y como lo mencionó Valencia, (2017) no provocaría problemas de toxicidad por fenoles. Estos datos de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales en la crema cosmética elaborada, no se pudieron corroborar debido a la duración y costo económico de los análisis de ORAC (capacidad antioxidante) y de Folin Ciocalteu (polifenoles totales).

Una vez determinado el valor de extracto de la broza del café requerido para obtener la capacidad antioxidante deseada en la formulación cosmética, se procedió a elaborar 100g de la crema, para ello se pesaron todos los ingredientes por separado, después se mezclaron y derritieron los compuestos de la fase acuosa en un beaker a 80 ° C y los de la fase oleosa en otro beaker a una temperatura de 75 ° C, es importante destacar que el extracto de la broza del café fue añadido a la fase acuosa, debido a su solubilidad y características fisicoquímicas que lo hacían afín a esta fase, ambas mezclas se agitaron por 30 minutos, seguidamente se procedió a añadir la fase oleosa a la acuosa, se retiraron del calor y se mezclaron hasta que enfriaron, seguidamente se envaso en recipientes de 30 ml.

**Tabla 25. Porcentajes de los Reactivos Necesarios para la Elaboración de la Crema**

<b>Reactivo</b>	<b>% de reactivo utilizado para elaborar 100 gramos de crema cosmética</b>	<b>Fase a la que pertenece cada reactivo</b>
<b>Alcohol cetílico</b>	2 %	Fase oleosa
<b>Ácido esteárico</b>	9 %	Fase oleosa
<b>Glicerina</b>	8 %	Fase acuosa
<b>Metilparabenos</b>	0,15%	Fase acuosa
<b>Propilparabenos</b>	0,05%	Fase oleosa
<b>Aceite mineral liviano</b>	20 %	Fase oleosa
<b>Trietanolamina</b>	2%	Fase acuosa
<b>Agua destilada 100 %csp</b>	53%	Fase acuosa
<b>Extracto de la broza de café</b>	5,8%	Fase acuosa

Nota. Autor

**Tabla 26. Características de la Crema Elaborada a Base de Extracto de la Broza de Café**

<b>Características</b>	<b>Resultados</b>
Color	Café claro
Olor	Aroma dulce de café
Viscosidad	Ligeramente viscoso

Nota. Autor

**Figura 48. Apariencia de la Crema a Base del Extracto de la Broza del Café**



Nota. Autor

**Figura 49. Producto Envasado**



Nota. Autor

**Figura 50. Producto Terminado y Debidamente etiquetado**



Nota. Autor

## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se recopilan las conclusiones, después de la revisión de los datos obtenidos y se expresan las recomendaciones, están basadas respecto a las deficiencias que surgieron a lo largo de esta investigación

### Conclusiones

En esta investigación se determinó que el método de extracción más eficaz y con mayor rendimiento fue el de Soxhlet, en comparación con el método por arrastre por vapor, porque se obtuvo una utilidad superior al 31 % del extracto, tanto para la broza de café de microlote, como para la de café convencional.

El método de extracción por arrastre de vapor no resultó eficiente para la obtención de este extracto vegetal, ya que su rendimiento fue sumamente bajo, dando un volumen insignificativo y difícil de medir.

La espectroscopia IR y la prueba de identificación de cloruro férrico, detectaron la presencia de grupos funcionales correspondientes a fenoles.

Mediante la cromatografía de gases acoplada a masas se obtuvo la presencia un compuesto fenólico el Phenol 2 2'-methylenebis 6-(1 1-dimethylethyl)-4-methyl-, además de cafeína y dietil ftalato.

La presencia de la sustancia polifenólica, cafeína y dietil ftalato detectadas por la cromatografía de gases acoplada a masas, variaron en proporción entre la broza del café de microlote y la del café convencional debido a los procesos de beneficiado a los cuales fueron sometidos cada muestra.

La cantidad de polifenoles totales obtenidos en el extracto de la broza del café fue de  $622 \pm 16$  mg ácido gálico/ 100 gramos demostrando de esta manera un alto contenido de ellos.

El extracto de la broza del café demostró tener una capacidad antioxidante de  $8044 \pm 449$   $\mu$ mol Trolox/100 gramos, la cual comparada con otros frutos es considerada como una capacidad antirradical alta.

Los datos obtenidos en este estudio demostraron que es posible generar un valor agregado a la broza del café, evitando así su desecho y contaminación del medio ambiente.

Se elaboró una crema a base del extracto de la broza del café, con propiedades organolépticas apropiadas para ser aplicada en la piel del ser humano.

Se estimula el análisis y estudio sobre la posibilidad de generar distintas formas farmacéuticas con las propiedades antioxidantes de la broza del café.

Esta investigación genera un gran aporte a los productores de café y a la industria farmacéutica, porque llena el vacío existente con respecto a la no utilización y aprovechamiento de la broza del café.

Se incentiva a la investigación de las propiedades de otros subproductos del café, debido a que se demostró que uno de ellos, en este caso la broza del café presentó cualidades antioxidantes.

### **Recomendaciones**

A partir del análisis de la presente investigación se establecen las siguientes recomendaciones, con el fin de brindar sugerencias y posibles soluciones a las limitaciones encontradas:

Analizar y comparar el contenido de compuestos, polifenoles totales y capacidad antioxidante de la broza del café de otras variedades, especies y regiones, con el fin de determinar las cualidades comparativas que permitan establecer cuáles se adaptan mejor a la consecución de los objetivos.

Investigar otras posibles utilidades que se pueda dar tanto a la broza del café como a los otros subproductos que se obtienen mediante el beneficiado de este fruto, para así reducir su desecho y contaminación ambiental.

Es conveniente efectuar análisis de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales a la formulación cosmética, con el fin de garantizar la conservación de estas propiedades.

Se sugiere la necesidad de profundizar mediante estudios experimentales sobre el beneficio que puede tener el aplicar sobre la piel productos cosméticos con propiedades antioxidantes elaborados a base de la broza del café.

Indagar sobre otras novedosas formas farmacéuticas en las cuales se pueda proporcionar al ser humano los polifenoles con capacidad antioxidante provenientes de la broza del café.

A los productores de café se les recomienda analizar la posibilidad de darle otro uso a la broza del café, de tal manera que puedan incursionar en un mercado paralelo al principal, con el fin de aumentar sus ingresos.

Impulsar a la población en general sobre la investigación y utilización de las propiedades beneficiosas de la broza del café y otros subproductos, esto con el fin de que generen su propio emprendimiento empresarial.

Dar a conocer los alcances de este estudio a entidades responsables del café, en la Zona de los Santos, con el fin de ampliar la investigación y propiciar el aprovechamiento de la broza.

Se recomienda a las cooperativas, beneficios e institutos de café incentivar a los investigadores para que se amplíen y divulguen los resultados de estos estudios.

Es importante que la Universidad Internacional de las Américas (UIA) brinde los recursos necesarios en cuanto equipos de laboratorio, reactivos e instrumentación a los estudiantes de farmacia, esto con el fin de que se apoye y promueva la investigación científica y por ende los trabajos universitarios.

## REFERENCIAS

- Agüero, M., Segura, C. y Parra, J. (2013). Análisis comparativo de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de cuatro marcas de tisanas de *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) comercializadas en Costa Rica: *Revista Uniciencia. Costa Rica*. 28 (1), 1-7. Recuperado de <http://www.redalyc.org/home.oa>
- Albarracín, G. y Gallo, S. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper Aduncum cordoncillo procedente de la zona cafetera*. (Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Alves, R., Castro, E y Trelles, M. (2013). Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el envejecimiento cutáneo: *Revista de Cirugía plástica Ibero-Latinoamericana*. Portugal, 39 (1), 90-102. Recuperado de: <http://scielo.isciii.es/pdf/cpil/v39n1/original13.pdf>.
- Amalaya, L y Portillo, C. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible*. (Tesis para optar por el grado de licencia en Química y Farmacia). Universidad de el Salvador, El Salvador.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas: *Revista Serie de Fisiología Vegetal*. España. 2 (3), 119-143. Recuperado de: <http://eprints.ucm.es/>.
- Balcazar, Y y Suarez, S. (2011). *Extracción del aroma de café, por arrastre de vapor utilizando destilación*. (Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico). Universidad de Guayaquil.
- Barret, F. (2006). Análisis avanzado de la piel. Recuperado de: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/biblioui/reader.action?docID=3222486&query=PIEL>
- Bejarano, M. (27 de julio de 2018). *Caficultores preocupados por bajos precios del café*. El Nuevo Diario, párr. 2.
- Bonilla, J. y Pazos, L. (2010). *Plantas medicinales, su uso a través de la historia*. Costa Rica: Editorial UCR

- Brasileiro, S., Farnese, S., Velez, R., Orduz, J., Lima, A., Paulino, C y Magalhaes, J. (agosto, 2018). Brasil y Colombia alertan sobre escenario depredador en el mercado mundial del café. Recuperado de: <https://www.federaciondecafeteros.org/>.
- Bravo, L. (2003). *Farmacognosia especial*. España: Editorial Elsevier.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de farmacognosia*. España: Editorial: Acribia S, A.
- Calle, D. y Mendoza, J. (2017). *Extracción de taninos de la borra de café mediante lixiviación*. (Trabajo de titulación). Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Calvo, G. y López, D. (2012). Ejercicio físico y radicales libres, ¿Es necesaria una suplementación con antioxidantes? *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y del Deporte*. España. 46 (12), 1-21. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/home.oa>
- Camapaza, E. (2017). *Determinación de ácido caféico, evaluación de la actividad antioxidante y contenido polifenólico en Brácteas secas de Cynara scolymus*. (Tesis para optar por el título de Ingeniera Biotecnóloga). Universidad Católica de Santa María, Perú.
- Carey y Giuliano. (2014). *Química Orgánica*. México: McGraw-Hill.
- Castellar., Cely, M., Cardozo, B. y Leroi, C. (2017). Aprovechamiento de la borra de café para la producción de carbón activado y su evaluación en la adsorción del colorante azul marino directo. *Revista de memorias III Seminario Internacional de Ciencias Ambientales SUE-Caribe*. Colombia, 43-45. Recuperado de: <http://revistas.unicordoba.edu.co>.
- Cea, R. (setiembre,2013). Fitofármacos. Ministerio de Economía de El Salvador. Recuperado de: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar>.
- Concepción, A., Peña, R., Acosta, J y Gonzales, A. (2007). Algunas características de la piel, fotoenvejecimiento y cremas antifotoenvejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 26(2) Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002007000200009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002007000200009&lng=es&tlng=es).

- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vásquez, M y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de nutrición*. 42 (2), 207-211. Doi: S0717-75182015000200014.
- Criado, C y Moya, M. (2011). *Vitaminas y Antioxidantes*. Departamento de medicina. España: Editorial Saned.
- Delgado, L., Betanzos, G y Sumaya, M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Revista de Investigación y Ciencia*. 50 (18), 10-14. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67415744003>.
- Doroteo, V., Terry, C., Diaz, C., Vaisberg, A y Rojas, R. (2012). Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y fotoprotectora *invitro* de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. Perú. 78 (4), 254-263. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937629005>.
- Drago, M., López, M. y Sainz, T. (2007). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 37 (4), 58-69. Recuperado de: <http://www.redalyc.org>
- Fierro, N., Contreras, O., González, O., Rosas, E. y Morales, V. (2018). Caracterización química y nutrimental de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.): *Revista Agro Productividad*. 11 (4), 9-13. Recuperado de: <http://web.a.ebscohost.com>
- Fonseca, L., Calderón, L. y Rivera, M. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia): *Revista de la facultad de química farmacéutica*. Colombia. 21 (3), 228-235. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>
- García, E, Fernández, I y López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>.
- Gómez, G. (2010). Cultivo y beneficio del café: *Revista de Geografía Agrícola*. México. (45), 3-92. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/home.oa>.
- Guala, M., Pérez, G., Barducco, L., Marsó, A. y Elder, H. (2012). Obtención de fracciones enriquecidas durante la extracción de aceites esenciales crudos: *Revista de Avances en ciencias e ingeniería*. Chile. 3 (1), 1-8. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/home.oa>

- Gutiérrez, M y Droguet, M. (2012). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexte*, 35-41.
- Honorato, J. (2009). Los procesos de glicación y oxidación en el envejecimiento de la piel: *Medicina cutánea*. Madrid, 38 (2), 101-104. Recuperado de: <http://www.medcutan-ila.org/>.
- Huet, C. (2017). *Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas*. (Trabajo de fin de grado). Universidad Complutense.
- Hugo, V., Terry, C., Diaz, C., Vaisberg, A. y Rojas, R. (2012). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia aspinosa* (tara). *Revista de sociedad química de Perú*. Perú. 78 (4), 1-11. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/home.oa>
- Ira, S. (2008). *Fisiología humana*. Madrid, España: Mc GRAW-HILL
- Jiménez, E. (2017). *Caracterización de la composición fitoquímica y la naturaleza de los principios activos de las hojas y frutos del árbol Anacardium occidentale (marañón) de Costa Rica para su aplicación en la industria farmacéutica*. (Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.
- Jimenez, J. (2016). *Valoración de la pulpa del café (Coffea arabica) mediante la extracción de ácidos hidroxinámicos y clorogénicos*. (Proyecto para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos). Universidad de Costa Rica.
- La Cafeografa. (agosto,2018). *El futuro de los microbeneficios: investigar y diversificarse*: Recuperado de: <https://lacafeografa.com/>.
- Londoño, H. (2017). *Aprovechamiento de pulpa de café para la producción de biogás en un reactor flujo pistón*. (Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Naturales y Matemáticas- Profundización en Química). Universidad Pontificia Bolivariana, Colombia.
- López, T. (1970). *Atlas ilustrado de plantas medicinales y curativas*. España: Editorial Susaeta.
- Marks, R y Motley, R. (2012). *Dermatología*. Bogotá, Colombia: El Manual Moderno S.A.
- McMurry, J. (2008). *Química Orgánica*. México: Cengage Learning Editores, S.A.
- Melgarejo, N., Alvarez, G. y Abad, A. (2008). *Plantas Medicinales*. Argentina: Editorial Corpus.

- Mercado, G., de la Rosa, L., Wall, A., López, J y Alvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición parenteral*. España. 28 (1), 36-46. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/3092/309226055005.pdf>
- Montero, X. (2009). *Proceso de extracción a partir del Lycopersicum esculentum con la obtención de oleorresina con alto contenido de licopeno y análisis cuali-cuantitativo de los grupos farmacológicos y metabolitos secundarios e incorporación del licopeno a una forma farmacéutica con propiedades antioxidantes, emolientes, antiinflamatorias y cicatrizantes*. (Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.
- Muñoz, A y Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista oficial de la Facultad de Medicina Humana*. 7 (1), 23-31. Recuperado de: <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe>
- Naranjo, M., Velez, L y Rojano, B. (2011). Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades: *Revista Cubana de plantas medicinales*. Cuba. 16 (2), 164-173. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>.
- Núñez, A. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades: *Revista cubana de salud pública*. Cuba. 37 (5), 1-10. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>
- Palomino, L y Luiz, V. (2015). Capacidad antioxidante en los residuos de la industria del café. *Brazilian Journal of Food Technology*. 18 (4), 307-313.
- Palomino, L. y Del Bianchi, V. (2015). Capacidad antioxidante de los residuos de la industria del café. *Revista brasileña de tecnología de alimentos*. 18 (4), 308-312. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/>
- Pérez, A. (2017). *Economía cafetera y desarrollo económico en Colombia*. Recuperado de: <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/>.
- Pérez, N. y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro: *Revista científica de Biotecnología vegetal*. Cuba. 11 (4), 196-206. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu>

- Poggio, M. (2012). *Consumo de antioxidantes naturales en personas con dislipidemias*. (Trabajo de tesis para la obtención del título de grado de licenciatura en nutrición). Universidad Abierta Interamericana, Argentina.
- PubMed Health. (28, julio, 2016). ¿Cómo funciona la piel? Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072439/>
- Puertas, M., Rivera, F., Villegas, P., Rojano, B. y Peláez, C. (2012). Comparación entre el estado de maduración del fruto de café (Coffee arábica L.), el contenido de antocianinas y su capacidad antioxidante: *Revista cubana de plantas medicinales*. Colombia. 17 (4), 1-2. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>
- Puertas, M., Villegas, P. y Rojano, B. (2013). Borra de café colombiano (coffea arábica) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres in vitro: *Revista cubana de plantas medicinales*. Colombia. 18 (3), 1-8. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>
- Rodríguez, J. (2017). *Determinación de polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticologensa y elaboración de una formula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de Eisenia cokeri M.A. Howe*. (Tesis para optar el grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Rodríguez, N. (2000). *Manejo de residuos en la industria cafetera*. Recuperado de: <http://infocafes.com/portal/>
- Rosales, R. y Rodríguez, I. (2018). *Utilización de pectinas del café (biomasa) para generar geles de usos cosmoceútico*. (Trabajo de investigación para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad de Iberoamericana.
- Ruiz, M y Morales, M. (2015). Aproximación al tratamiento del envejecimiento cutáneo: *Ars Pharmaceutica*. España. 56 (4), 183-191. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>
- Silver, L. (2011). Práctica de la prevención, productos de cuidado del bebé: *Collaborative on Health and the Environment*. Estados Unidos
- Sotomayor, D. (2017). Modelo de indicadores de valor agregado de plantas medicinales para elevar el potencial exportador: *Revista Gestión en el tercer milenio*. Perú. 40 (20), 1-3. Recuperado de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe>

- Stashenko, E. (2009). *Aceites esenciales*. Recuperado de <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/>
- Stashenko, E., Martínez, J. y Castrillón, J. (2014). Aplicación del método de dispersión de matriz en fase sólida al aislamiento de hidrocarburos de rocas bituminosas. *Boletín de Geología*, 36 (1), 29-35.
- Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. (Tesis para optar por el título de Químico Industrial). Universidad Tecnológica de Pereira
- USP 38 N-33. (2015). (vols. 1). Estados Unidos.
- Valencia, E., Figueroa, I., Sosa, E., Bartolomé, M., Martínez, H, y García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 16 (1), 15-24.
- Valverde, J. (2010). *Elaboración de una forma farmacéutica tópica, a partir de la extracción de: Chaptalia Mutans (L) pol, Caléndula Officinalis linn y Thymus Vulgaris (L) con propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y antisépticas*. (Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.
- Vargas, A. (2014). *Prefactibilidad técnica y financiera sobre la producción y comercialización de bebida fermentada de broza de café para el beneficio de Coopetarrazú*. (Proyecto de graduación sometido a consideración de la escuela de ingeniería química como requisito final para optar al grado de licenciatura en ingeniería química). Ciudad Universitaria Rodrigo Facio.
- Vargas, D. (2017). *Efecto de la aplicación de Lecanicullium lecanii sobre la incidencia y severidad de la roya (Hemileia vastatrix) en el cultivo del café (coffea arábica)*. (Práctica dirigida para optar por el grado de profesional de ingeniero agrónomo con el grado de licenciado en agronomía). Universidad de Costa Rica.
- Vega, J. (2006). *Estrés oxidativo en medicina: un acercamiento al tema*. Recuperado de: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliouiasp/reader.action?docID=3183107&query=estres+oxidativo>.
- Viada, E., Gómez, L y Campaña, I. (2017). Estrés oxidativo: *Correo Científico Médico de Holguín*. Cuba, 1 (1), 171-186. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/>.

Wagner, R. (2000). *Historia del café de Guatemala*. Recuperado de: <https://books.google.es>.

Zamora, J. (2015). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud: *Revista Chilena Nutricional*. 34 (1), 17-26. Doi: S0717-75182007000100002.

Zapata, S., Piedrahita, A y Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*, 16 (1), 25-35.