



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

**Influencia del grado de tostado sobre la capacidad antioxidante y el efecto genoprotector del café soluble. Contribución de la fracción de melanoidinas.**

Raquel del Pino García

**Tesis de Máster en Seguridad y Biotecnología Alimentarias**

**Julio de 2011**



UNIVERSIDAD DE BURGOS  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Dña. Pilar Muñiz Rodríguez y Dña. M<sup>a</sup> Luisa González San José profesoras del Master Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en la Universidad de Burgos,

**INFORMAN:**

Que Doña **Raquel del Pino García** ha realizado un trabajo experimental fin de estudios en el Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, titulado “*Influencia del grado de tostado sobre la capacidad antioxidante y el efecto genoprotector del café soluble. Contribución de la fracción de melanoidinas*”

Asimismo, informan que tras revisar la realización y memoria de dicho trabajo, **consideran que cumple los requisitos y características exigidos en la normativa vigente** para ser considerado como Trabajo Experimental Fin de Estudios correspondiente a la Tesis de Master Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en la Universidad de Burgos.

Informe que, a los efectos oportunos extienden en Burgos a 18 de Julio de 2011

Fdo: Pilar Muñiz Rodríguez

Fdo: M<sup>a</sup> Luisa González San José

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	3
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	3
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	7
4.1. <u>Caracterización de las muestras de café (C, F, M, FMD y MD) con distinto grado de tostado</u> .....	9
- Evaluación del color .....	9
<i>i. Determinación de los parámetros del CIELab</i> .....	9
<i>ii. Determinación del contenido en pre-melanoidinas y compuestos resultantes de reacciones de pardeamiento no enzimático (MRPs)</i> .....	10
- Determinación cuantitativa de polifenoles totales (PPT) .....	11
4.2. <u>Análisis del perfil antioxidante de las muestras de café (C, F, M, FMD y MD) con distinto grado de tostado</u> .....	13
- Determinación de la capacidad antioxidante total (TAC) .....	13
- Determinación de la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA) .....	16
- Valoración de la inhibición de la Peroxidación Lipídica .....	17
- Valoración de la protección frente al daño oxidativo del DNA .....	18
<i>i. Inhibición del daño oxidativo al DNA en geles de agarosa</i> .....	18
<i>ii. Estudio del efecto genoprotector en células HT-29</i> .....	19
4.3. <u>Estudio de correlaciones entre los distintos ensayos de capacidad antioxidante y composición del café.</u> .....	21
<b>5. Conclusiones</b> .....	22
<b>6. Bibliografía</b> .....	22

## 1. INTRODUCCIÓN

Cada vez son más los trabajos que confirman que el consumo de alimentos y bebidas con alto contenido en compuestos antioxidantes es beneficioso para la salud, destacando su importancia en la prevención de numerosas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como cáncer, diabetes, aterosclerosis, Parkinson, Alzheimer, enfermedades inflamatorias, etc. (Moon J-K. and Shibamoto T., 2009).

El café es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, siendo muy apreciado por su aroma, sabor agradable y por sus propiedades estimulantes debidas a su contenido en cafeína (Gómez-Ruiz J.A. *et al.*, 2008). En los últimos años, las evidencias sobre los beneficios para la salud que tiene el consumo moderado de café en adultos, consecuencia de su elevado contenido en compuestos con actividad antioxidante, han contribuido al incremento de su consumo (Pérez-Martínez M. *et al.*, 2010). Son varios los componentes del café que han sido propuestos como antioxidantes, entre los cuales cabe destacar: varios compuestos fenólicos de la familia de los ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, cafeico, cumárico y ferúlico), las melanoidinas y otros productos de las reacciones de Maillard (MRPs), la cafeína y algunos de los componentes volátiles del café (Vignoli J.A. *et al.*, 2011).

Las dos variedades de café más cultivadas y de mayor importancia para el consumo son *Coffea arabica* (Arábica) y *Coffea canephora* (Robusta). Los cafetos Arábica se cultivan principalmente en los países de América central y de ellos se obtienen los granos de mayor calidad, que dan un café más fino y aromático. El principal inconveniente es la sensibilidad de estos cafetos a las condiciones ambientales, lo que encarece considerablemente su precio. La variedad Robusta se cultiva en África, Asia y Brasil y es una planta mucho más resistente, pero el café resultante es menos aromático, más áspero y más fuerte (Capel J.C. and Pérez J., 2010). Generalmente, suelen emplearse mezclas de ambas variedades para conseguir las propiedades organolépticas deseadas en el café, que varían notablemente en función de las culturas y los hábitos sociales de cada país (López-Galilea I. *et al.*, 2007). Respecto a la capacidad antioxidante, los estudios realizados parecen confirmar que los granos verdes de café Robusta presentan una mayor actividad antioxidante, probablemente como consecuencia de su mayor contenido en compuestos fenólicos y en cafeína, aunque tras el tostado del café las diferencias entre ambas variedades no son significativas (Richelle M. *et al.*, 2001; Daglia M. *et al.*, 2000). Además de la variedad de café, son varios los factores que influyen en su capacidad antioxidante, como: el origen del café (Parras P. *et al.*, 2007), el grado de tostado (Sacchetti G. *et al.*, 2009; Del Castillo M.D. *et al.*, 2002; Nicoli M.C. *et al.*, 1997), el tipo de tostado (natural o torrefacto) y sus mezclas (López-Galilea I. *et al.*, 2008), el método y las condiciones empleadas durante la preparación del café (Pérez-Martínez M. *et al.*, 2010; López-Galilea I. *et al.*, 2007), etc.

La mayoría de los estudios sobre la capacidad antioxidante del café se refieren al café tostado, ya que es la forma en que se consume. Durante el proceso de tostado al que son sometidos los granos de café verdes, se aplican altas temperaturas (200-240°C) durante 10-15 minutos, en función del grado de tostado deseado. Esto lleva a importantes cambios en la composición química y la estructura de los granos, que se deshidratan, liberan aceite, reducen su peso, toman una coloración oscura y desarrollan sus aromas y sabores característicos (Hečimović, I. *et al.*, 2011). De esta manera se obtienen cafés con una amplia gama de colores que van desde los más claros, como el café New England, hasta los más oscuros, como el café italiano o espresso (Capel J.C. and Pérez J., 2010).

La actividad antioxidante del café se ve fuertemente afectada por el proceso de tostado, ya que las altas temperaturas llevan a la pérdida de parte de los antioxidantes naturales presentes originalmente en el café, principalmente ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, cafeico, ferúlico, cumárico, etc.). Sin embargo, la capacidad antioxidante del café puede mantenerse gracias a la formación de nuevos compuestos durante este proceso que también presentan actividad antioxidante (Sacchetti G. *et al.*, 2009). Los granos de café verde son ricos en compuestos fenólicos y polisacáridos, que sufren profundos cambios moleculares

durante el tostado. La baja actividad de agua y las elevadas temperaturas favorecen el desarrollo de reacciones de Maillard (MR), con la formación de MRPs entre proteínas y carbohidratos (Borrelli R.C. *et al.*, 2002). Es probable que los compuestos fenólicos también participen en estas reacciones, especialmente los ácidos clorogénicos, formando parte de las moléculas nitrogenadas de elevado peso molecular, marrones y solubles en agua que se forman, conocidas como melanoidinas del café (Bekedam E.K., *et al.*, 2008). Las melanoidinas son las responsables del color y el aroma del café tostado. A pesar de que estos compuestos suponen más del 25% del peso seco del café, su estructura química es extremadamente compleja y todavía no se conoce con exactitud, aunque se piensa que parte de su capacidad antioxidante se deba a los compuestos de bajo peso molecular unidos no covalentemente a ellas (Rufián-Henares J.A and Morales F.J., 2007). Puesto que el desarrollo de las MR parece tener un importante papel en contrarrestar la degradación de los antioxidantes fenólicos presentes naturalmente en el café, se espera que la capacidad antioxidante global del café tostado dependa en gran medida de la extensión en que tengan lugar dichas reacciones durante el proceso de tostado (Andueza S. *et al.*, 2004).

Los efectos del grado de tostado sobre la capacidad antioxidante del café han sido investigados en numerosos estudios, pero existe bastante discrepancia en cuanto a los resultados obtenidos: i) un incremento de la actividad antioxidante en los cafés de tostado medio y un descenso en los de grado de tostado oscuro (Sacchetti G. *et al.*, 2009; Del Castillo M.D. *et al.*, 2002; Nicoli M.C. *et al.*, 1997); ii) un aumento de la capacidad antioxidante con el grado de tostado (Anese M. and Nicoli M.C., 2003; Daglia M. *et al.*, 2000); iii) un descenso de la actividad antioxidante con el grado de tostado (Hečimović, I. *et al.*, 2011; Cämmerer B. and Kroh L.W., 2006; Borrelli R.C. *et al.*, 2002; Richelle M. *et al.*, 2001). Varias pueden ser las causas que justifiquen estas diferencias: el empleo de diferentes métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante, las diferencias en el tipo de café utilizado en los experimentos, la posibilidad de llegar a un mismo grado de tostado variando las condiciones de tiempo-temperatura, la falta de una definición estándar del grado de tostado (ya que puede ser determinado por los cambios en el color, el descenso de la densidad o la pérdida de peso), etc. (Sacchetti G. *et al.*, 2009).

La mayor parte de los estudios realizados sobre la capacidad antioxidante del café hacen referencia al café molido, siendo pocos los trabajos sobre el café soluble o instantáneo, a pesar de su gran importancia económica. Para solubilizar el café, los granos tostados y triturados son sometidos a un proceso de extracción mediante una serie de filtraciones con agua a 100-180°C, lo que resulta en la selección de los sólidos solubles del café, que son deshidratados por atomización. Las altas temperaturas utilizadas durante la extracción pueden inducir variaciones en la composición química y las características del café soluble. Respecto a la variedad de café utilizada en la elaboración del café instantáneo, aunque es muy común encontrarlo como mezclas de café Robusta y Arábica, suele preferirse el café Robusta, ya que a pesar de sus peores características organolépticas, permite una mayor extracción de sólidos solubles y resulta más económico (Vignoli J.A. *et al.*, 2011). Aunque las propiedades sensoriales del café instantáneo suelen ser peores que las del café molido, su mayor facilidad de preparación promueve que su consumo esté aumentando considerablemente en los últimos años (Anese M. and Nicoli M.C., 2003).

Dada la gran importancia del café como uno de los principales contribuyentes a la ingesta de antioxidantes en la dieta, y a la vista de la falta de acuerdo sobre la influencia del proceso de tostado en su capacidad antioxidante, se consideró de gran interés realizar un estudio dirigido a evaluar la actividad antioxidante del café en función del grado de tostado. Concretamente, el estudio se llevó a cabo con café soluble, puesto que su capacidad antioxidante hasta el momento ha sido poco evaluada, a pesar de que representa una parte importante del café consumido en España. Además, se trató de elucidar la contribución de los distintos componentes del café tostado a su capacidad antioxidante global, para lo cual se procedió a una separación del café en fracciones y se trató de determinar la actividad biológica potencial de las melanoidinas y de los compuestos unidos no covalentemente a ellas simulando su digestión gastrointestinal.

## 2. OBJETIVOS

1. Estudiar la influencia del grado de tostado y de la digestión gastrointestinal del café soluble sobre su composición en polifenoles totales y melanoidinas.
2. Realizar un estudio comparativo en función del grado de tostado de la capacidad antioxidante y del efecto sobre biomarcadores de estrés oxidativo del café soluble y sus distintas fracciones obtenidas por digestión gastrointestinal.
3. Valorar mediante ensayos *ex vivo* en cultivos celulares la influencia del grado de tostado y de la digestión gastrointestinal sobre el efecto genoprotector del café soluble.
4. Establecer correlaciones entre los diferentes ensayos realizados sobre la composición y la capacidad antioxidante del café soluble.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### Equipos y Aparatos

Agitador de tubos vórtex, agitador magnético (con y sin calefacción), balanzas (analítica y de precisión), baños termostatzados de temperatura regulable (con y sin agitación), campana de flujo laminar, célula de ultrafiltración Amicon, centrifugas (de tubos, de épendorf y ultracentrifuga), congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , cubeta de electroforesis, colorímetro triestímulo modelo HunterLab D25-9, espectrofotómetro, estufas, incubador de  $\text{CO}_2$ , liofilizador, microscopio de campo invertido, microscopio de fluorescencia, pH-metro, transiluminador de luz UV.

### Reactivos

ABAP (2,2'-azobis-2-amidinopropano), ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), acetato de sodio, ácido acético, L-ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido clorhídrico (HCl), ácido gálico, ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), agarosa Low Melting, agarosa Normal Melting, azul de bromofenol, azul de coomassie, azul de tripano, n-butanol, carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), carbonato de sodio hidratado ( $\text{NaHCO}_3$ ), catalasa, cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), desoxirribosa, dimetilsulfóxido (DMSO), DNA de timo de ternera, DPPH' (2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo), EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético), etanol, FCS (Fetal calf serum), fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato sódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), glicerina, hidróxido sódico (NaOH), N-laurilsarcosina de sodio, medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con penicilina (50U/mL)-estreptomocina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), menadiona, metanol, pancreatina, PBS, pepsina, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), persulfato potásico ( $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ), pirofosfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), reactivo de Folin-Ciocalteu, sacarosa, sales biliares, seroalbúmina bovina (BSA), sulfato de cobre (II) hidratado ( $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de hierro (II) ( $\text{FeSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ), TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-tiazina), tripsina, TRIS, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxílico), Triton X-100 Roth.

### Selección del café

El estudio se llevó a cabo partiendo de muestras de café soluble en polvo de tres grados de tostado diferentes (claro, medio y oscuro) determinados por el % de pérdida de peso: 14,5%, 16,2% y 18,9%, respectivamente. Estas muestras, procedentes de la misma mezcla de café Robusta y Arábica, fueron suministradas por el Centro de Investigación de Nestlé (Lausanne, CH), donde se nombraron en función del grado de tostado con las iniciales CTn (Color Test number) seguido de un número: claro (CTn 110), medio (CTn 85) y oscuro (CTn 60), terminología que he mantenido en este estudio.

## **Preparación de las muestras de café (C, F, M, FMD y MD)**

A partir de estos tres cafés en polvo se prepararon las respectivas muestras de café (C 110, C 85 y C 60) de acuerdo al procedimiento seguido por Delgado-Andrade *et al.* (2005). Se resuspendió 1 g de cada café en 100 mL de agua mili-Q a 55°C y se mantuvo bajo agitación continua durante 3 minutos. Los cafés obtenidos se filtraron a través de papel de filtro Whatman y se guardaron a 4°C en oscuridad (un máximo de 3 días) hasta su utilización en los ensayos.

Para obtener la fracción enriquecida en melanoidinas se preparó un café más concentrado (2 g en 50 mL de agua mili-Q) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y se procedió a su ultrafiltración en una célula de presión Amicon equipada con una membrana de exclusión molecular de 10.000 Da. El retenido se resuspendió en 30 mL de agua y se volvió a ultrafiltrar hasta los 20 mL de retenido (enriquecido en melanoidinas). Las fracciones recogidas de cada café fueron congeladas a -20°C 24 h y liofilizadas para la obtención de los extractos liofilizados de filtrado (F) y retenido (M), que se pesaron y guardados a -80°C hasta su utilización. Las muestras resultantes con las que se realizaron los ensayos son: F 110, F 85 y F 60; M 110, M 85 y M 60.

A partir de 400 mg de las muestras M de los cafés se llevó a cabo una simulación de digestión gastrointestinal, siguiendo el procedimiento descrito por Rufián-Henares y Morales (2007), con alguna modificación. Se resuspendió el extracto liofilizado en 8 mL de agua mili-Q y se ajustó el pH a 2 con HCl 6 N. Se añadió 125 µL de pepsina (0,16 g/mL en HCl 0,1M) a cada muestra y se incubó a 37°C en agitación (110 v/minuto) durante 3 h. A continuación se llevó el pH a 7 con NaHCO<sub>3</sub> 1M, se añadió a cada muestra 2 mL de una mezcla de pancreatina y sales biliares (0,004 g pancreatina y 0,025 g sales biliares / mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M) y se incubó a 37°C en agitación durante 1 h. Se inactivaron las enzimas por calor durante 4 min en un baño a 100°C. Tras la digestión, las muestras se sometieron a ultrafiltración, llevándolas a 50 mL con agua mili-Q y siguiendo el mismo procedimiento descrito para las muestras de café hasta obtener los extractos liofilizados de las fracciones de filtrado (FMD) y retenido (MD), que se pesaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización. Estas muestras se denominaron: FMD 110, FMD 85 y FMD 60; MD 110, MD 85 y MD 60.

## **Caracterización de las muestras (C, F, M, FMD y MD)**

### **Evaluación del color**

La medida del color de las muestras (diluidas a 0,25 mg/mL en agua mili-Q) se realizó mediante métodos espectrofotométricos, determinándose: los parámetros del CIELab (L, a\* y b\*) en un colorímetro triestímulo modelo HunterLab D25-9, estandarizando previamente el equipo frente a un blanco (López-Galilea I. *et al.*, 2006); y el contenido en pre-melanoidinas y compuestos resultantes de reacciones de pardeamiento no enzimático (MRPs) en un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a las longitudes de onda características de su color (360 nm y 420 nm, respectivamente) (Adams A. *et al.*, 2005).

### **Determinación cuantitativa de polifenoles totales (PPT)**

Se siguió el método de Folin-Ciocalteu (Singleton V.L. and Rossi J.A., 1965), basado en la oxidación de los grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos en medio básico mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezcló 100 µL de las muestras (diluidas a 0,5 mg/mL en agua mili-Q) con 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:10) y 400 µL de carbonato de sodio (75 g/L), y se dejó reposar 40 min. Finalmente se evaluó la absorbancia de las muestras a 750 nm frente a un blanco y los resultados se cuantificaron con una recta de calibrado, expresándose en equivalentes de µg de ácido gálico/mg de muestra y µg de ácido gálico/mg de café.

## **Determinación de la capacidad antioxidante total (TAC)**

### **Método ABTS<sup>•+</sup>**

Mediante este método se determina el efecto estabilizador del catión radical ABTS<sup>•+</sup> debido a la capacidad reductora de las muestras, lo que provoca la decoloración del radical (Miller N.J. and Rice-Evans C.A., 1997). El reactivo se preparó mezclando ABTS 7mM con persulfato potásico 2,45 mM (1:1), manteniéndolo 16 h en oscuridad antes de su utilización. El ABTS<sup>•+</sup> formado se diluyó con agua mili-Q hasta conseguir una absorbancia a 734nm de  $0,7 \pm 0,02$  (Abs<sub>0</sub>). Para llevar a cabo el ensayo, se mezcló 980  $\mu$ L del reactivo ABTS<sup>•+</sup> con 20  $\mu$ L de las muestras (diluidas a 0,5 mg/mL en agua mili-Q), se incubó 20 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm, restándole el valor obtenido para un blanco de cada muestra (sustituyendo el reactivo por agua mili-Q). Los resultados se dieron como la diferencia de absorbancias entre la inicial y la de cada muestra y se cuantificaron con una recta de calibrado, expresándose en equivalentes de  $\mu$ g de Trolox/mg de muestra y  $\mu$ g de Trolox/mg de café.

### **Método DPPH<sup>•</sup>**

Este ensayo permite determinar la actividad antioxidante de las muestras al ser capaces de reducir el radical DPPH<sup>•</sup>, provocando su decoloración (Brand-Williams W. *et al.*, 1995). Se preparó una solución madre de reactivo (DPPH<sup>•</sup> 0,15mM en metanol) que se diluyó hasta una absorbancia a 517nm de  $0,7 \pm 0,02$  (Abs<sub>0</sub>) y se mezcló 980  $\mu$ L del reactivo con 20  $\mu$ L de las muestras (diluidas a 0,5 mg/mL en agua mili-Q). Tras 2 h de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 517nm, restándole el valor obtenido para el blanco de cada muestra (sustituyendo el DPPH<sup>•</sup> por metanol). Los resultados se dieron como la diferencia de absorbancias entre la inicial y la de cada muestra y se cuantificaron con una recta de calibrado, expresándose en equivalentes de  $\mu$ g de Trolox/mg de muestra y  $\mu$ g de Trolox/mg de café.

### **Método FRAP**

Mediante esta técnica se evalúa el poder reductor de las muestras, basándose en su capacidad de reducir el Fe(III) a Fe(II), que unido al TPTZ da un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm (Benzie I.F.F. and Strain J.J., 1996). El reactivo TPTZ se preparó mezclando 25 ml de tampón acetato sódico 0,3M (pH 3,6), 2,5 ml de FeCl<sub>3</sub> 20mM, 2,5 ml de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 3 ml de agua mili-Q. Se mezcló 970  $\mu$ L del reactivo con 30  $\mu$ L de las muestras (diluidas a 0,5 mg/mL en agua mili-Q), se incubó 30 min a 37°C y finalmente se midió la absorbancia a 593 nm. Los resultados se dieron como la diferencia de absorbancias entre la de cada muestra y un blanco (reactivo TPTZ sin añadir muestra) y se cuantificaron con una recta de calibrado, expresándose en equivalentes de mM Fe (II)/mg de muestra y mM Fe (II)/mg de café.

## **Determinación de la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA)**

Por este método se determina la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) de determinadas sustancias que compiten con la desoxirribosa por dichos radicales, evitando su oxidación. La desoxirribosa oxidada, tras la adición de ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido y mediante calentamiento, genera malonaldehído (MDA), el cual tiene un máximo de absorbancia a 532nm (Halliwell B. *et al.*, 1987). El ensayo se realizó mezclando 10  $\mu$ L de desoxirribosa 100mM, ácido ascórbico 10 mM, peróxido de hidrógeno 1mM, cloruro férrico 10 mM y EDTA 10mM, en ausencia (control oxidado) y en presencia de 100  $\mu$ L de las muestras (diluidas a 10 mg/mL en agua mili-Q) y llevándolo a 1 mL con tampón fosfato sódico 24 mM en NaCl 15 mM (pH 7,4). También se prepararon controles de las muestras con desoxirribosa sin someterlas a oxidación y un control de desoxirribosa sin oxidar. Se dejó incubar a 37°C durante 1 h, se añadió 1,5 mL de TCA al 28% (p/v) y 1 mL de TBA al 1%



(p/v) en NaOH 0,05M, se incubó a 100°C 15 min y se leyó la absorbancia a 532 nm. Los resultados se expresaron como % de inhibición en relación al control oxidado, en aproximación absoluta (por mg de muestra) y relativa (por mg de café).

### **Valoración de la inhibición de la Peroxidación Lipídica**

Para llevar a cabo este ensayo se procede a la extracción de microsomas de hepatocitos de rata, aislándolos posteriormente por centrifugación diferencial y determinando el contenido de proteínas por el método de Bradford. A continuación se induce una peroxidación mediada por ABAP, que es evaluada por la medida del MDA generado en presencia de TBA. De esta manera puede determinarse la presencia de sustancias antioxidantes en las muestras que produzcan una inhibición de la peroxidación (Kessler M. *et al.*, 2003). A una fracción de microsomas (1 mg/mL) se le añadió 10 µL de ABAP 0,5M, en ausencia (control oxidado) y en presencia de 20 µL de las muestras (diluidas a 0,5 mg/mL en agua mili-Q), y se llevó a 500 µL con tampón TRIS-HCl 50mM (pH 7). También se prepararon controles de las muestras junto con microsomas sin someterlos a oxidación y un control de los microsomas sin oxidar. Se incubó a 37°C durante 90 min. A continuación se añadió 750 µL de TCA al 2,8% (p/v) y 500 µL de TBA al 1% (p/v) en NaOH 0,05M y se incubó a 100°C durante 15 min. Se realizó una extracción de 750 µL de las muestras con un volumen de butanol, se centrifugó a 3000 rpm 10 min y se midió la absorbancia a 532 nm de la fase superior. Los resultados se expresaron como % de inhibición en relación al control oxidado, en aproximación absoluta (por 10 µg de muestra) y relativa (por µg de café).

### **Valoración de la protección frente al daño oxidativo del DNA**

#### **- Inhibición del daño oxidativo al DNA. Determinación en geles de agarosa.**

Se evaluó la inhibición del daño oxidativo al DNA induciendo la generación de radicales hidroxilo (OH<sup>·</sup>), que provocan la ruptura de la cadena por acción sobre el enlace fosfato. Los fragmentos resultantes son separados por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa (Rivero D. *et al.*, 2005). El ensayo se llevó a cabo mezclando 100 µL de DNA de timo de ternera (1 mg/mL) con 300 µL de las muestras (diluidas a 10 mg/mL en agua mili-Q), 45 µL de tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,4), 50 µL de ácido ascórbico 10 mM y 5 µL de sulfato de cobre (II) hidratado 10mM. También se realizaron controles oxidado y sin oxidar (sin muestras), y controles prooxidantes de las muestras (sin añadir ninguno de los agentes oxidantes y omitiendo sólo uno de ellos). Se incubó durante 1 h a 37°C. Se preparó un gel de agarosa al 1% (p/v) con 1 µg/mL de bromuro de etidio. Tras la incubación se mezcló 50 µL de cada muestra con 10 µL de tampón de muestra (20% glicerina, 0,1% azul de bromofenol en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,4)). Se cargaron 40 µL en cada pocillo del gel y 2 µL del tampón de pesos moleculares ( $\lambda$ Hind III) y se sometió a electroforesis (fuente de alimentación de BioRad) en condiciones de 100V, 400 mA y 100W durante 45 min. Finalmente los geles se observaron en un transiluminador bajo luz UV y fueron fotografiados.

#### **- Estudio del efecto genoprotector en células HT-29. Ensayo cometa.**

##### *Cultivos celulares y crecimiento celular.*

Se utilizó una línea celular HT-29 (Human colon carcinoma cell line), crecidas en medio de cultivo DMEN suplementado con 10% de FCS. Se trabajó con una densidad celular de 150.000 céls./placa (30.000 céls./mL), calculada contando las células con una cámara Neubauer y azul de tripano. En cada placa se añadieron 5 mL del cultivo celular y se incubaron durante 48 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### *Incubación de los cultivos celulares con las muestras y tratamiento con menadiona.*

Se cambió el medio de cultivo de las placas por DMEN suplementado en el que se añadió 50 µL de las muestras diluidas a 1 mg/mL (excepto en los controles oxidado y sin oxidar) y 15 µL de catalasa (100U/mL). Las células fueron incubadas en presencia de las muestras durante 24 h a 37°C. A continuación, se añadió 50 µL de menadiona (20 µM) disuelta en DMEN (excepto en el control sin oxidar) y se incubaron las células a 37°C durante 1 h. Finalmente, se recogieron las diferentes suspensiones celulares para el ensayo cometa.

### *Ensayo cometa (viabilidad celular)*

Se siguió el método propuesto por Tice R. *et al.* (2000). Este ensayo, también conocido como electroforesis alcalina de una sola célula (SCGE), detecta el daño producido al DNA a nivel de una célula. Los detergentes y las altas concentraciones salinas inducen la lisis celular. Realizando una electroforesis alcalina en gel de agarosa, el DNA de las células dañadas sufre una migración hacia el ánodo, adquiriendo una forma característica de cometa, lo que permite evaluar la protección de las muestras frente al daño oxidativo del DNA en cada célula (efecto genoprotector). Se centrifugó 60 µL de las suspensiones celulares a 2000 rpm, 10 min y 5°C, se retiró el sobrenadante, se añadió 60 µL de agarosa LM (low melting) al 0,8% y se dispuso sobre portaobjetos preparados previamente con 60 µL de agarosa NM (normal melting). Se puso los portaobjetos en contacto con buffer de lisis durante una noche a 5°C. Se realizó la electroforesis en frío con buffer de electroforesis a condiciones de 25V, 500 mA y 150 W durante 40 min y posteriormente se lavó los portaobjetos con buffer neutral. Se añadió 35 µL de bromuro de etidio (0,2 mg/mL) y se observaron al microscopio de fluorescencia, fotografiando las imágenes del microscopio, que fueron analizadas con el programa *CometScore*<sup>TM</sup>. La migración del DNA fue evaluada por la longitud de la cola del cometa (n = 60 para cada muestra), expresando los resultados como % de longitud relativa del cometa en relación al control oxidado ([T/C2]%), desde la aproximación absoluta (por 50 µg de muestra).

### **Tratamiento estadístico de los datos**

Todos los datos son presentados como la media ± desviación estándar de tres ensayos con tres réplicas cada uno. Con el programa "Statgraphics" se realizó un análisis comparativo de varianzas ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre las muestras a un nivel de significancia de  $p < 0,05$ , comparando la misma muestra de los distintos cafés (diferencias significativas representadas con letras latinas) y las diferentes muestras obtenidas a partir de un mismo café (diferencias significativas representadas con letras griegas), tanto desde una perspectiva absoluta como relativa. También se realizó un análisis de correlaciones entre los resultados obtenidos por los distintos ensayos mediante regresión simple multivariante.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este trabajo se estudió la influencia del grado de tostado y de la digestión gastrointestinal sobre la capacidad antioxidante del café soluble. Para ello se seleccionaron tres cafés, obtenidos de una misma mezcla pero con diferentes grados de tostado: claro (CTn 110), medio (CTn 85) y oscuro (CTn 60), a partir de los cuales se prepararon las muestras de café (C). También se obtuvieron los extractos liofilizados del filtrado y del retenido tras ultrafiltrar los cafés (muestras F y M, respectivamente) y tras ultrafiltrar las muestras M después de simular su digestión gastrointestinal (muestras FMD y MD). Una vez caracterizadas las distintas muestras evaluando el color y la composición en polifenoles totales, se determinó la actividad antioxidante total mediante tres métodos (ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> y FRAP), la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo, el efecto sobre biomarcadores de estrés oxidativo (lípidos y DNA) y el efecto genoprotector mediante ensayos *ex vivo* en cultivos celulares.

Al igual que observaron otros autores (Anese M. and Nicoli M.C., 2003), se comprobó que la capacidad antioxidante de las muestras de café, aún en condiciones anaerobias, se veía disminuida con el tiempo de almacenamiento (datos no incluidos), por lo que una vez preparados los cafés (muestras C), nunca se sobrepasó los 3 días de almacenamiento antes de su utilización en los ensayos. El resto de muestras (F, M, FMD y MD) se elaboraron a partir de diluciones de extractos liofilizados pesados el mismo día de su empleo.

A la hora de analizar los datos obtenidos para los ensayos de capacidad antioxidante, se realizó dos tipos de aproximaciones, la absoluta y la relativa, ya que se trabajó con soluciones de café y con extractos liofilizados obtenidos tras ultrafiltrar las muestras de café y las muestras M digeridas. Los ensayos se llevaron a cabo con diluciones que contenían la misma cantidad de cada muestra (C, F, M, FMD y MD de cada café), lo que permitió comparar directamente la actividad antioxidante absoluta de todas las muestras, sin tener en cuenta su concentración en el café, expresando los resultados en relación a 1 mg de cada muestra. Por otra parte, como se pesó la cantidad de extracto liofilizado obtenido de las muestras F, M, FMD y MD, fue posible hacer una aproximación relativa y conocer la contribución de cada fracción a la capacidad antioxidante global del café, expresando los resultados en relación a 1 mg de cada café.

En la Tabla 1 se muestran los gramos de extracto liofilizado de las muestras F, M, FMD y MD obtenidos por gramo de café. En las muestras FMD y MD también se han indicado los rendimientos obtenidos para estas fracciones expresados por gramo de muestra M.

**Tabla 1. Cantidad de muestras F (Filtrado), M (Melanoidinas), FMD (Filtrado de las melanoidinas digeridas) y MD (Melanoidinas digeridas purificadas) obtenidas por gramo de café o de muestra M. Valores presentados como la media  $\pm$  desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada muestra (F, M, FMD o MD) en función del grado de tostado.**

Muestra	g muestra/g café	Muestra	g muestra/g café	g muestra/g M
F 110	0,560 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	FMD 110	0,217 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	0,567 $\pm$ 0,012 <sup>c</sup>
F 85	0,553 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	FMD 85	0,199 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,504 $\pm$ 0,013 <sup>b</sup>
F 60	0,545 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	FMD 60	0,180 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,446 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>
M 110	0,383 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	MD 110	0,157 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,409 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>
M 85	0,394 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	MD 85	0,182 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>	0,461 $\pm$ 0,015 <sup>b</sup>
M 60	0,404 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	MD 60	0,206 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,510 $\pm$ 0,010 <sup>c</sup>

Las muestras F, M, FMD y MD se obtuvieron por ultrafiltración con una membrana de exclusión molecular de 10.000 Da, de manera que la muestra M se corresponde con la fracción enriquecida en melanoidinas, puesto que son compuestos de elevado peso molecular. Por otro lado, la digestión gastrointestinal de las muestras M dio lugar a las muestras MD, correspondiente a las melanoidinas purificadas, tras conseguir separar parte de los compuestos de bajo peso molecular unidos a ellas (compuestos fenólicos y MRPs de menor peso molecular que las melanoidinas), que quedarían en la fracción FMD (Rufián-Henares J.A. and Morales F.J., 2007). Los resultados indican que, a medida que aumenta el grado de tostado, la cantidad de muestra obtenida en las fracciones correspondientes a los filtrados (F y FMD) disminuyó de manera significativa ( $p < 0,05$ ), mientras que en las fracciones de retenido (M y MD) se obtuvo más cantidad de muestra al aumentar el grado de tostado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros estudios, donde observaron que las melanoidinas representaban entorno al 38-40% del café tostado (Rufián-Henares J.A. and Morales F.J., 2007; Delgado-Andrade C. and Morales F.J., 2005), aunque estos autores obtuvieron una mayor cantidad de muestras MD y menor de FMD que en este estudio. Por otra parte, se observó que la cantidad de compuestos de peso molecular menor a 10.000 Da (muestras F) fue mayor en todos los cafés que los compuestos presentes en las muestras M, aunque las diferencias fueron menores una vez digeridas las muestras M, siendo incluso mayor la cantidad de muestra MD que de FMD recogida para el café oscuro.

#### 4.1. Caracterización de las muestras de café (C, F, M, FMD y MD) con distinto grado de tostado.

Es importante conocer la composición y características físico-químicas del café, ya que el proceso de tostado al que son sometidos los granos induce importantes cambios en su composición química, produciéndose la degradación parcial de los compuestos fenólicos presentes originalmente en el café verde a la vez que se forman nuevos compuestos como resultado de las reacciones de Maillard, entre ellos las melanoidinas del café (Sacchetti G. *et al.*, 2009). Por ello, el primero de los objetivos de este estudio fue llevar a cabo una caracterización de las muestras (C, F, M, FMD y MD) obtenidas a partir de los tres cafés solubles con diferente grado de tostado, tratando de evaluar su color y de determinar su composición en melanoidinas y polifenoles totales.

##### Evaluación del color

Una de las modificaciones más importantes que tiene lugar en los granos de café durante su tostado es el cambio de color, desarrollando un característico color marrón a consecuencia de las reacciones de pardeamiento no enzimático que tienen lugar durante el proceso, como las reacciones de Maillard o la caramelización (Sacchetti G. *et al.*, 2009). Por lo tanto, el color de los granos de café, y del café soluble que se obtiene a partir de ellos, varía notablemente en función del grado de tostado al que son sometidos los granos verdes, pudiéndose evaluar estos cambios de color espectrofotométricamente mediante la determinación de los parámetros del CIELab (López-Galilea I. *et al.*, 2006; Summa C.A. *et al.*, 2007) y evaluando los cambios en la absorbancia a las longitudes de onda características de los compuestos que se desarrollan durante las reacciones que tienen lugar en el proceso de tostado del café (Adams A. *et al.*, 2005).

##### Determinación de los parámetros del CIELab

En 1986, la Comisión Internationale de L'Eclairage (CIE) estableció uno de los métodos de evaluación del color de más amplio uso en alimentos, conocido como CIELab, basándose en la determinación de valores triestímulo que permiten definir cada color a partir de unas coordenadas denominadas L\*, a\* y b\*. El eje vertical L\* es una medida de la luminosidad, y varía desde completamente opaco (valor 0) a completamente transparente (valor 100). En los ejes de tonalidad, a\* es una medida de la intensidad de color rojo (+) o verde (-), y b\* de la intensidad del color amarillo (+) o azul (-) (C.I.E., 1986).

**Tabla 2. Valores de los parámetros L\*, a\* y b\* del CIELab.** Resultados presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

Muestras	L*	a*	b*
C 110	97,44 $\pm$ 0,29 <sup>b/γ</sup>	-0,733 $\pm$ 0,06 <sup>a/β</sup>	8,82 $\pm$ 0,23 <sup>a/β</sup>
C 85	96,88 $\pm$ 0,17 <sup>b/γ</sup>	-0,58 $\pm$ 0,07 <sup>b/β</sup>	9,92 $\pm$ 0,57 <sup>b/γ</sup>
C 60	96,12 $\pm$ 0,48 <sup>a/γ</sup>	-0,47 $\pm$ 0,02 <sup>c/β</sup>	11,47 $\pm$ 0,13 <sup>c/γ</sup>
F 110	98,75 $\pm$ 0,31 <sup>a/δ</sup>	-0,82 $\pm$ 0,05 <sup>a/β</sup>	5,16 $\pm$ 0,23 <sup>a/α</sup>
F 85	98,58 $\pm$ 0,33 <sup>a/δ</sup>	-0,76 $\pm$ 0,02 <sup>a/α</sup>	5,55 $\pm$ 0,15 <sup>ab/α</sup>
F 60	98,36 $\pm$ 0,23 <sup>a/δ</sup>	-0,68 $\pm$ 0,03 <sup>b/α</sup>	6,09 $\pm$ 0,44 <sup>b/α</sup>
M 110	96,14 $\pm$ 0,13 <sup>c/β</sup>	-0,51 $\pm$ 0,02 <sup>a/γ</sup>	11,73 $\pm$ 0,46 <sup>a/γ</sup>
M 85	94,96 $\pm$ 0,52 <sup>b/β</sup>	-0,28 $\pm$ 0,03 <sup>b/γ</sup>	13,76 $\pm$ 0,62 <sup>b/δ</sup>
M 60	93,56 $\pm$ 0,18 <sup>a/β</sup>	-0,03 $\pm$ 0,03 <sup>c/γ</sup>	16,80 $\pm$ 0,89 <sup>c/δ</sup>
FMD 110	97,07 $\pm$ 0,12 <sup>a/γ</sup>	-1,07 $\pm$ 0,12 <sup>a/α</sup>	8,77 $\pm$ 0,32 <sup>a/β</sup>
FMD 85	96,73 $\pm$ 0,36 <sup>a/γ</sup>	-0,86 $\pm$ 0,07 <sup>a/α</sup>	9,08 $\pm$ 0,09 <sup>ab/β</sup>
FMD 60	96,42 $\pm$ 0,66 <sup>a/γ</sup>	-0,62 $\pm$ 0,14 <sup>b/α</sup>	9,47 $\pm$ 0,29 <sup>b/β</sup>
MD 110	91,01 $\pm$ 0,55 <sup>c/α</sup>	0,79 $\pm$ 0,08 <sup>a/δ</sup>	18,65 $\pm$ 0,56 <sup>a/δ</sup>
MD 85	89,39 $\pm$ 0,52 <sup>b/α</sup>	1,52 $\pm$ 0,11 <sup>b/δ</sup>	21,40 $\pm$ 0,23 <sup>b/ε</sup>
MD 60	87,49 $\pm$ 0,71 <sup>a/α</sup>	2,04 $\pm$ 0,23 <sup>c/δ</sup>	23,13 $\pm$ 0,25 <sup>c/ε</sup>

Los valores de los parámetros del CIELab se presentan en la Tabla 2. Se observó que, a medida que aumentaba el grado de tostado de las muestras, el valor de  $L^*$  disminuyó (las muestras eran menos luminosas) y los valores  $a^*$  y  $b^*$  aumentaron (las muestras tendían hacia colores más rojos y amarillos en los ejes de tonalidad). Los datos obtenidos se compararon con la bibliografía existente en la que se habla de los efectos del tostado sobre el color del café (Sacchetti G. *et al.*, 2009; Summa C.A. *et al.*, 2007; López-Galilea I. *et al.*, 2006). Todos los autores coinciden con los resultados obtenidos en cuanto a la pérdida de luminosidad del café con el tostado. Si comparamos las muestras obtenidas a partir de un mismo café, en los tres casos (CTn 110, CTn 85 y CTn 60) se observó que había diferencias significativas entre los valores obtenidos para las distintas muestras (C, F, M, FMD y MD), comportándose de una manera muy similar para los tres tipos de café: los valores más altos de luminosidad se obtuvieron para las muestras de las fracciones filtradas (F y FMD), mientras que para los retenidos (M y MD) se obtuvieron los valores de  $L^*$  más bajos, especialmente para la muestra MD. Los parámetros  $a^*$  (eje rojo (+)/verde (-)) y  $b^*$  (eje amarillo (+)/azul (-)) dieron los valores más bajos para los filtrados, mientras que los más altos correspondieron a los retenidos, destacando especialmente las muestras enriquecidas en melanoidinas tras la digestión (MD).

#### Determinación del contenido en pre-melanoidinas y compuestos resultantes de reacciones de pardeamiento no enzimático (MRPs).

En los últimos años, las melanoidinas han sido muy estudiadas por sus implicaciones nutricionales y sobre la salud. Puesto que son productos que se forman de manera natural durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, se han convertido en objeto de interés creciente por parte de la comunidad científica, como así lo demuestra la creación de la “Co-operation in Science and Technology (COST) action” titulada “Melanoidins in Food and Health” (COST, 1998). En el caso de las melanoidinas del café, se generan principalmente durante las reacciones que tienen lugar a consecuencia de las altas temperaturas empleadas en el proceso de tostado, y han despertado especial interés por su implicación en la capacidad antioxidante global del café, siendo numerosos los estudios realizados al respecto (Vignoli J.A. *et al.*, 2011; Rufián-Henares J.A. and Morales F.J., 2007; Delgado-Andrade C and Morales J.F., 2005; Borrelli R.C. *et al.*, 2002).

La evaluación de la absorbancia a 420 nm es un método empleado habitualmente como indicador del desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático, como las reacciones de Maillard o la caramelización que ocurren durante el tostado, ya que los productos resultantes tienen una coloración marrón y absorben de manera característica a esta longitud de onda (López-Galilea I. *et al.*, 2007). Estos productos se conocen como MRPs, y entre ellos destacan las melanoidinas. Además, es posible valorar la presencia de los compuestos que se van formando durante los pasos intermedios de las reacciones de Maillard (pre-melanoidinas), evaluando la absorbancia de las muestras a 360 nm (Adams A. *et al.*, 2005).

A la vista de los resultados obtenidos (Tabla 3), en todas las muestras (C, F, M, FMD y MD) se obtuvo más cantidad de pre-melanoidinas en el café claro (CTn110), observándose un descenso de estos compuestos al aumentar el grado de tostado. En cambio, la mayor cantidad de MRPs se obtuvo en el café más tostado (CTn 60). Estos resultados concuerdan con lo descrito anteriormente por otros autores (Bekedam E.K. *et al.*, 2008; Del Castillo M.D. *et al.*, 2002), confirmando que la formación de melanoidinas ocurre de manera continuada durante el tostado.

Por otra parte, analizando las diferentes fracciones obtenidas de cada café y teniendo en cuenta que se trata de una determinación absoluta (evaluando el color para una misma cantidad de mg de muestra/mL), se observó que en los tres casos (CTn 110, CTn 85 y CTn 60) el mayor contenido en pre-melanoidinas y MRPs se correspondió con las muestras del retenido obtenido tras la digestión de las melanoidinas (muestras MD), y el menor con las

muestras del filtrado obtenido a partir del café (muestras F). Estas diferencias fueron mucho más destacables en el caso de la absorbancia a 420 nm, lo que indica que las variaciones entre filtrados y retenidos en cuanto al color se debieron principalmente al mayor contenido de MRPs de los retenidos. Los valores obtenidos para las muestras C se encuentran generalmente entre medias de los alcanzados por los filtrados y los retenidos (con excepción de la muestra FMD 110 en la absorbancia a 360 nm, que da valores superiores a los de C 110). Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta que los compuestos que más contribuyen a la coloración oscura del café son los MRPs de elevado peso molecular (Bekedam E.K. *et al.*, 2008; Adams A. *et al.*, 2005).

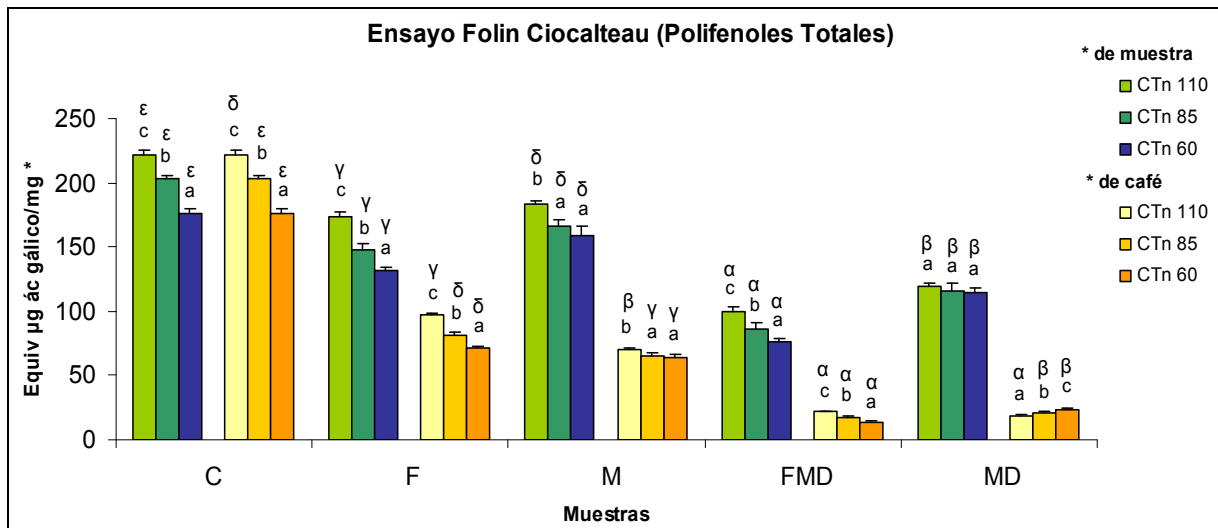
**Tabla 3. Valores de la absorbancia de las muestras a 360 y 420 nm.** Resultados presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

Muestras	Pre-melanoidinas (Abs 360 nm)	MRPs (Abs 420 nm)
C 110	0,793 $\pm$ 0,033 <sup>c / <math>\beta</math> <math>\gamma</math></sup>	0,169 $\pm$ 0,018 <sup>a / <math>\beta</math></sup>
C 85	0,708 $\pm$ 0,015 <sup>b / <math>\beta</math></sup>	0,205 $\pm$ 0,009 <sup>b / <math>\gamma</math></sup>
C 60	0,664 $\pm$ 0,011 <sup>a / <math>\gamma</math></sup>	0,247 $\pm$ 0,013 <sup>c / <math>\gamma</math></sup>
F 110	0,633 $\pm$ 0,014 <sup>c / <math>\alpha</math></sup>	0,086 $\pm$ 0,015 <sup>a / <math>\alpha</math></sup>
F 85	0,574 $\pm$ 0,026 <sup>b / <math>\alpha</math></sup>	0,119 $\pm$ 0,009 <sup>b / <math>\alpha</math></sup>
F 60	0,509 $\pm$ 0,019 <sup>a / <math>\alpha</math></sup>	0,143 $\pm$ 0,009 <sup>c / <math>\alpha</math></sup>
M 110	0,761 $\pm$ 0,013 <sup>c / <math>\beta</math></sup>	0,202 $\pm$ 0,011 <sup>a / <math>\gamma</math></sup>
M 85	0,723 $\pm$ 0,016 <sup>b / <math>\beta</math></sup>	0,234 $\pm$ 0,008 <sup>b / <math>\delta</math></sup>
M 60	0,693 $\pm$ 0,005 <sup>a / <math>\gamma</math></sup>	0,281 $\pm$ 0,024 <sup>c / <math>\delta</math></sup>
FMD 110	0,835 $\pm$ 0,048 <sup>c / <math>\gamma</math></sup>	0,159 $\pm$ 0,007 <sup>a / <math>\beta</math></sup>
FMD 85	0,689 $\pm$ 0,019 <sup>b / <math>\beta</math></sup>	0,177 $\pm$ 0,009 <sup>a / <math>\beta</math></sup>
FMD 60	0,585 $\pm$ 0,042 <sup>a / <math>\beta</math></sup>	0,202 $\pm$ 0,011 <sup>b / <math>\beta</math></sup>
MD 110	0,987 $\pm$ 0,019 <sup>c / <math>\delta</math></sup>	0,396 $\pm$ 0,023 <sup>a / <math>\delta</math></sup>
MD 85	0,918 $\pm$ 0,036 <sup>b / <math>\gamma</math></sup>	0,445 $\pm$ 0,010 <sup>b / <math>\epsilon</math></sup>
MD 60	0,849 $\pm$ 0,025 <sup>a / <math>\delta</math></sup>	0,477 $\pm$ 0,007 <sup>c / <math>\epsilon</math></sup>

### **Determinación cuantitativa de polifenoles totales (PPT)**

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, presentes principalmente en las semillas y las hojas, sintetizados como mecanismo de defensa frente al daño oxidativo. Dada su actividad antioxidante, los alimentos y bebidas ricos en compuestos fenólicos despiertan gran interés por su potencial contribución a disminuir el riesgo de sufrir enfermedades relacionadas con el daño oxidativo (Fukushima Y. *et al.*, 2009). El café es una de las bebidas con mayor contenido en compuestos fenólicos, entre 200-550 mg por taza de café (Parras P. *et al.*, 2007), suponiendo aproximadamente el 16% de los sólidos totales en el café soluble, aunque este contenido varía en función del grado de tostado (Fukushima Y. *et al.*, 2009). Los ácidos clorogénicos son los principales polifenoles del café, entre los que destaca el ácido 5-O-cafeoil-quinico. Durante el proceso de tostado, las altas temperaturas inducen la lactonización y polimerización de los ácidos clorogénicos, dando lugar a nuevas estructuras (algunas de las cuales colaboran en la formación de melanoidinas) o a la degradación de los polifenoles presentes inicialmente en el café (Fukushima Y. *et al.*, 2009).

La cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra puede hacerse mediante HPLC, método que permite determinar exactamente cada especie molecular de polifenoles. Sin embargo, dada la gran diversidad de compuestos fenólicos existentes, para la cuantificación de los polifenoles totales (PPT) se prefiere el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, que es un ensayo mucho más simple, aunque presenta como inconveniente la dificultad de eliminar la interferencia de ciertos compuestos no polifenólicos que absorban también a 750 nm (Fukushima Y. *et al.*, 2009).



**Figura 1. Cuantificación de los polifenoles totales de las muestras mediante el ensayo de Folin Ciocalteu.** Resultados expresados como equivalentes de µg de ácido gálico/mg de muestra (aproximación absoluta) o mg de café (aproximación relativa). Valores presentados como la media ± desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

Los resultados de la cuantificación de los PPT de las diferentes muestras de café mediante el método de Folin-Ciocalteu se resumen en la Figura 1, presentando los resultados obtenidos en la aproximación absoluta (por mg de muestra) y la relativa (por mg de café). Se observó que el contenido en polifenoles descendió de manera significativa en la muestras C al incrementar el grado de tostado, resultados que apoyan que el proceso de tostado induce una disminución en la concentración de PPT en el café (Sacchetti G. *et al.*, 2009). En el análisis absoluto de los resultados, esta tendencia se mantuvo también en el resto de muestras (F, M, FMD y MD), especialmente en las correspondientes a los filtrados (F y FMD), ya que en las muestras de retenido (M y MD) las diferencias no siempre resultaron significativas. Se cuantificaron más polifenoles totales en las muestras M y MD que en las respectivas muestras F y FMD, lo cual podría explicarse por la hipótesis de que estos compuestos pasen a formar parte de la estructura de las melanoidinas formadas durante el tostado (Bekedam E.K., *et al.*, 2008, Delgado-Andrade C and Morales F.J., 2005) o bien porque haya otros compuestos presentes en los retenidos que interfieran en el ensayo de Folin-Ciocalteu (Fukushima Y. *et al.*, 2009). Por otra parte, se obtuvo siempre un descenso significativo de los PTT obtenidos en las muestras de los extractos liofilizados respecto a sus correspondientes muestras de partida, seguramente a consecuencia de la degradación adicional de los compuestos fenólicos que causó el proceso de liofilización. El análisis de los resultados en aproximación relativa muestra la disminución de PPT al aumentar el grado de tostado, excepto en la muestra MD, donde ocurre lo contrario. Puesto que las muestras F tienen un mayor peso en la composición global del café que las muestras M, se puede decir que se obtuvo una mayor cantidad de PPT en el filtrado obtenido a partir del café que en el retenido. Respecto a las muestra FMD y MD, para el café claro (CTn 110) no se encontró más polifenoles en el filtrado que en el retenido, mientras que en el café medio (CTn 85) y el oscuro (CTn 60) el contenido de PPT en las muestras MD fue algo mayor que en los correspondientes filtrados.

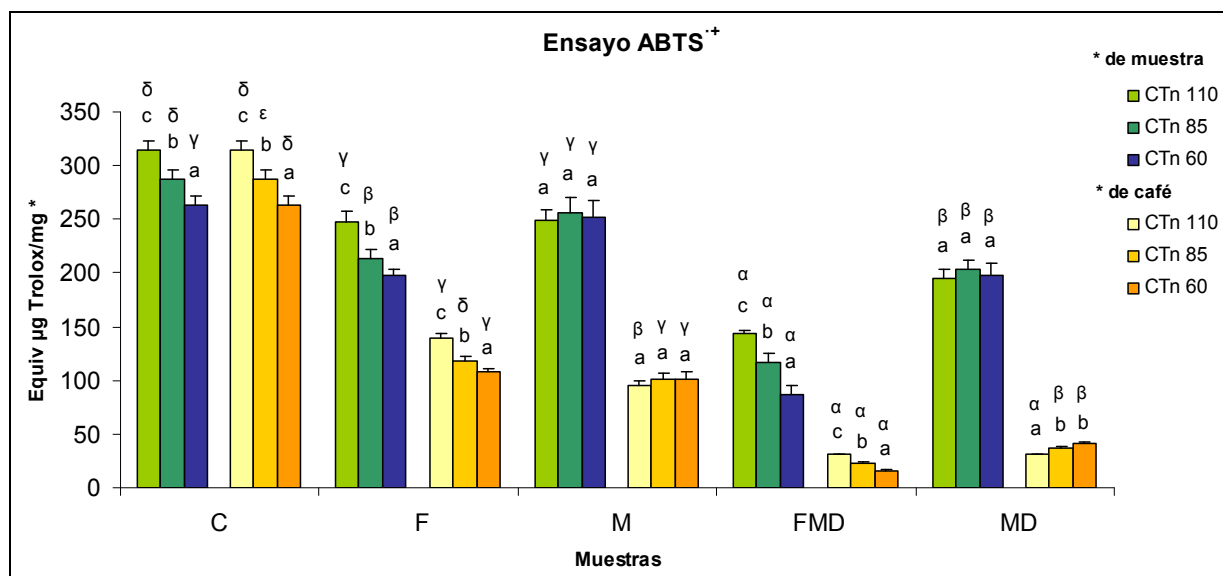


## 4.2. Análisis del perfil antioxidante de las muestras de café (C, F, M, FMD y MD) con distinto grado de tostado.

Una vez caracterizada la composición de las muestras en cuanto a su contenido en compuestos fenólicos y melanoidinas, el siguiente de los objetivos fue la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras mediante varios de los métodos empleados habitualmente en este tipo de análisis.

### Determinación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante del café se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y de melanoidinas, pero dependiendo de la intensidad del proceso de tostado de los granos de café, la influencia de uno u otro grupo en la capacidad antioxidante total es diferente, existiendo una gran discrepancia en cuanto a los resultados descritos por diferentes autores de los efectos del tostado sobre la capacidad antioxidante del café (Sacchetti G. *et al.*, 2009). Se ha sugerido que, mientras que los compuestos fenólicos son más importantes bajo condiciones de tostado suaves o intermedias, los tratamientos más intensos provocan un descenso de estos compuestos, y los MRPs, especialmente las melanoidinas, pasarían a ser los que contribuirían principalmente a la actividad antioxidante del café (Sacchetti G. *et al.*, 2009; Del Castillo M.D. *et al.*, 2002; Nicoli M.C. *et al.*, 1997). Entre las técnicas más empleados para determinar la capacidad antioxidantes total *in vitro* destacan los métodos ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>·</sup> y FRAP. Los métodos ABTS<sup>+</sup> y DPPH<sup>·</sup> miden la capacidad de la muestra para estabilizar los respectivos radicales químicos, el primero en medio acuoso y el segundo en medio orgánico (metanol). El método FRAP permite determinar la capacidad reductora de las muestras (Vignoli J.A. *et al.*, 2011).

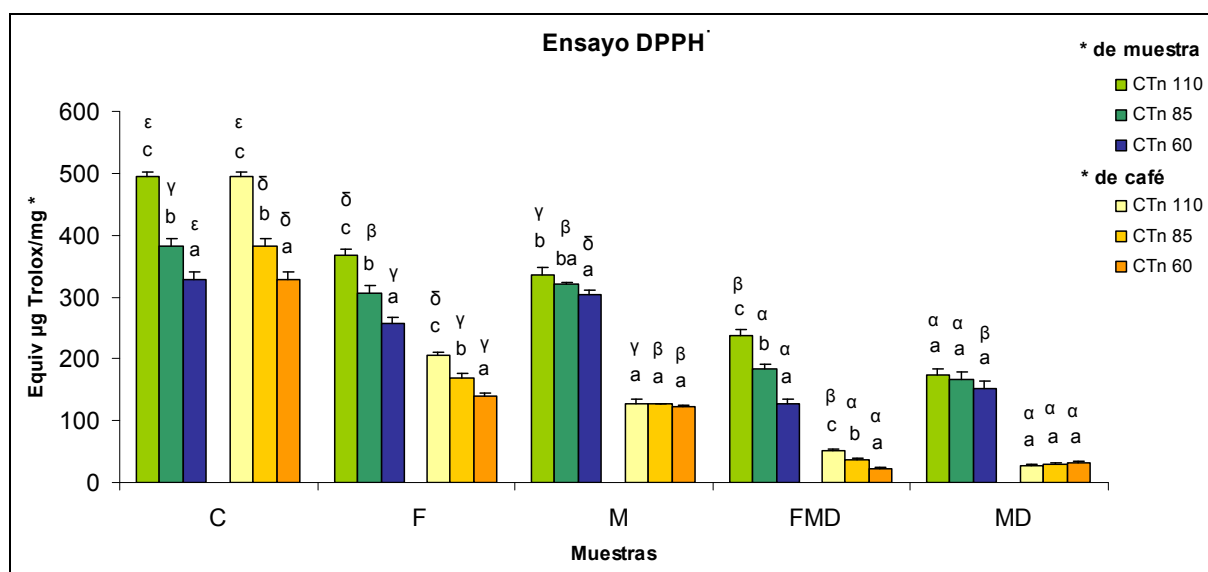


**Figura 2. Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método ABTS<sup>+</sup>.** Resultados expresados como equivalentes de µg de Trolox/mg de muestra (aproximación absoluta) o mg de café (aproximación relativa). Valores presentados como la media ± desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

En la Figura 2 están representados los resultados obtenidos mediante el método ABTS<sup>+</sup>. Se observó que la mayor capacidad antioxidante total de las muestras C determinada por este ensayo corresponde al café claro (CTn 110), y dicha capacidad va disminuyendo de manera significativa al incrementar el grado de tostado. Varios autores han obtenido conclusiones similares al analizar la actividad antioxidante total del café mediante este método (Cämmerer B. and Kroh L.W., 2006; Borrelli R.C. *et al.*, 2002; Richelle M. *et al.*, 2001), justificando los resultados por la pérdida de polifenoles de bajo peso molecular con



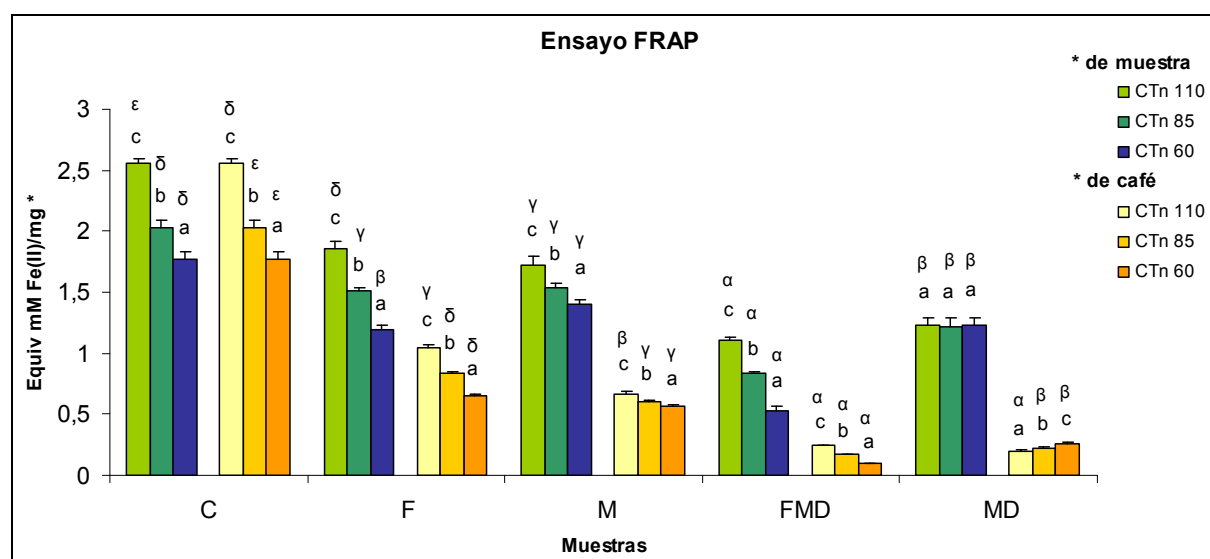
elevada capacidad antioxidante durante el proceso de tostado. Los resultados de este estudio parecen confirmar dicha hipótesis, ya que en la aproximación absoluta (por mg de muestra), las muestras de los retenidos obtenidas antes (M) y tras la digestión (MD) presentaron una capacidad antioxidante bastante similar, mientras que en las muestras de los filtrados (F y FMD) la actividad antioxidante disminuye al aumentar el grado de tostado del café. Además puede observarse que en el café claro (CTn 110), las muestras F y M presentaron una capacidad antioxidante similar, mientras que tras la digestión de las muestras M la actividad antioxidante del filtrado (FMD) fue marcadamente inferior a la del retenido (MD). En los otros cafés (CTn 85 y CTn 110), las muestras de los retenidos (M y MD) presentaron siempre una mayor actividad antioxidante que las muestras de los filtrados (F y FMD, respectivamente). Estos datos indican que las melanoidinas contribuyen en gran medida a la actividad antirradicalaria del café (Borrelli R.C. *et al.*, 2002), resultados que no se corresponden con los obtenidos en un estudio anterior sobre los efectos de la digestión en la capacidad antioxidante de las melanoidinas, donde concluyeron que eran los compuestos de bajo peso molecular unidos no covalentemente a las melanoidinas los que contribuían en mayor medida en su capacidad antioxidante (Rufián-Henares J.A. and Morales F.J., 2007). Sin embargo, si se analizan los datos desde la aproximación relativa, vemos que la contribución de los compuestos presentes en las muestras F a la capacidad antioxidante global por mg de café fue mayor que la de las muestras M para el café claro y el de tostado medio, sin haber diferencias significativas en el café oscuro. Tras la digestión de las melanoidinas, las muestras FMD y MD del café claro dieron valores similares, pero en los cafés medio y oscuro las fracciones MD tuvieron mayor peso en la contribución a la capacidad antioxidante del café.



**Figura 3. Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método DPPH.** Resultados expresados como equivalentes de µg de Trolox/mg de muestra (aproximación absoluta) o mg de café (aproximación relativa). Valores presentados como la media ± desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

El siguiente de los métodos ensayados para determinar la capacidad antioxidante total fue el DPPH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. Analizando las muestras C se observó una significativa mayor capacidad antioxidante en la muestra C 110 que en C 85 y C 60, disminuyendo la actividad antirradicalaria al aumentar el grado de tostado. Estos resultados no se corresponden con los obtenidos en alguno de los estudios realizados previamente, donde dicha actividad aumentaba ligeramente con el grado de tostado (Anese M. and Nicoli M.C., 2003). Al evaluar la capacidad antioxidante de manera absoluta, se obtuvieron valores superiores en todas las muestras correspondientes al café menos tostado (CTn 110), que disminuyeron de manera significativa en todos los casos excepto en las muestras MD. Mientras que para el café CTn 110 los filtrados (F y FMD) tenían una mayor

actividad antirradicalaria que los respectivos retenidos (M y MD), en el café CTn 85 se obtuvieron valores similares, y en el café CTn 60 fueron las muestras de retenido las que conservaron una mayor actividad. Al analizar los datos de manera relativa, tan sólo las muestras C, F y FMD presentaron diferencias significativas en función del grado de tostado, contribuyendo de una manera similar todas las muestras obtenidas para cada retenido (M o MD), independientemente del café de partida. En este caso, las muestras F de todos los cafés contribuyeron en mayor medida a la capacidad antioxidante global del café que sus respectivos retenidos (M). En las muestras obtenidas tras la digestión de la fracción M, tan sólo se apreciaron diferencias significativas en el café CTn 110, donde FMD presentó mayor actividad antirradicalaria que MD. Otros autores que investigaron la capacidad antioxidante de las melanoidinas tras su digestión (Rufián-Henares J.A. and Morales F.J., 2007) encontraron una actividad de la fracción FMD bastante superior. Teniendo en cuenta la composición de las distintas muestras, determinada anteriormente en este estudio (Apartado 4.1), cabe suponer que son los compuestos fenólicos presentes en las muestras los que tienen un mayor peso en la estabilización del radical DPPH' en medio lipofílico.



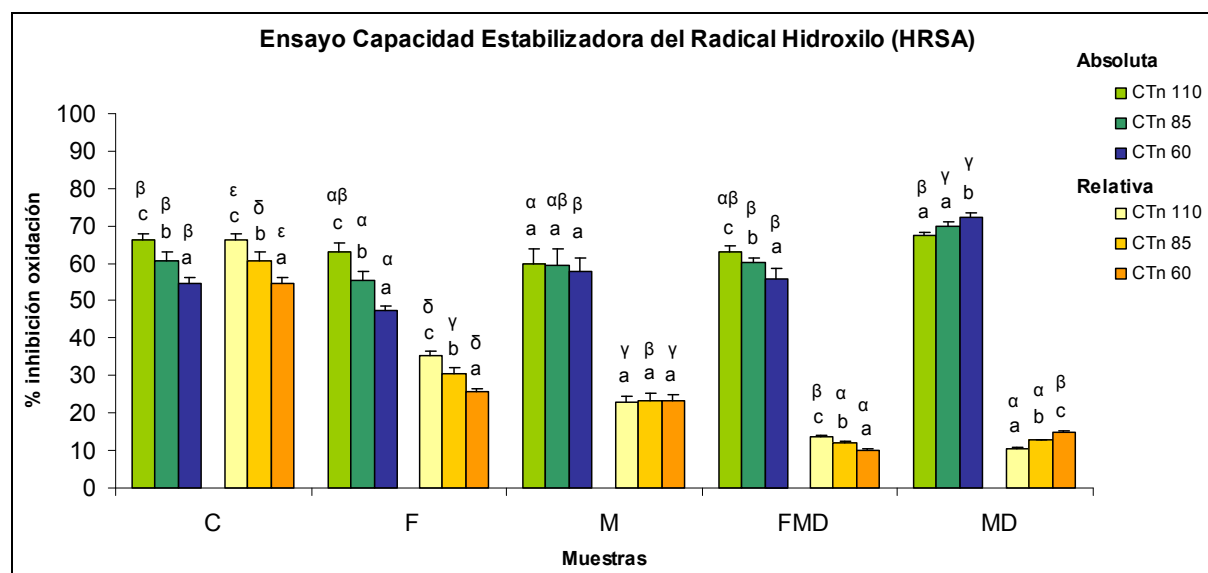
**Figura 4. Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método FRAP.** Resultados expresados como equivalentes de mM de Fe(II)/mg de muestra (aproximación absoluta) o mg de café (aproximación relativa). Valores presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

La figura 4 recoge los resultados obtenidos en el ensayo FRAP, donde los resultados para las muestras C, F y FMD fueron muy similares a los encontrados en los ensayos ABTS<sup>•+</sup> y DPPH', de manera que las muestras correspondientes al café de menor grado de tostado (CTn 110) presentaron una mayor capacidad reductora del Fe(III) a Fe(II), coincidiendo con los resultados descritos en otro estudio reciente (Hečimović, I. *et al.*, 2011). La principal diferencia con el método DPPH' fue que, en el ensayo FRAP, la capacidad reductora de las muestras de retenido tras la digestión de las muestras M (muestras MD) fue bastante más elevada y en todos los casos superior a la de las muestras de filtrado (FMD), siendo estas diferencias más marcadas al aumentar el grado de tostado. La elevada capacidad reductora de las melanoidinas y otros MRPs ya había sido determinada previamente por varios autores (Rufián-Henares J.A. and Morales F.J., 2007, Delgado-Andrade C. and Morales F.J., 2005), así como la de los compuestos fenólicos (Hečimović, I. *et al.*, 2011), de manera que puede observarse como la contribución a la capacidad antioxidante global del café (aproximación relativa) es superior en las muestras F del café CTn 110 y CTn 85 respecto a las respectivas muestras M (en el café C 60 las diferencias no son significativas), mientras que en las muestras obtenidas tras la digestión de las muestras M, excepto en el café CTn 110 donde FMD y MD tienen una contribución similar, las muestras MD de los cafés CTn 85 y CTn 60 contribuyen en mayor medida que las FMD en la capacidad reductora global del café.

Por lo tanto, como conclusiones generales sobre la capacidad antioxidante total de las distintas muestras, cabe destacar que todos los cafés presentaron una elevada capacidad antioxidante. Esta actividad antioxidante fue disminuyendo al aumentar el grado de tostado, como consecuencia principalmente de la contribución de los compuestos de menor peso molecular presentes, donde siempre se obtuvo una pérdida de su capacidad antioxidante al incrementar el grado de tostado. Las diferencias en función del tostado en las muestras enriquecidas en melanoidinas (M) fueron menores, aunque tras su digestión gastrointestinal y separación en fracciones se observó que, en las correspondientes a los compuestos de bajo peso molecular no covalentemente unidos a las melanoidinas (FMD) la actividad antioxidante disminuía con el grado de tostado, mientras que en las muestras enriquecidas en melanoidinas puras (MD) no había grandes diferencias. Sin embargo, como las muestras MD tienen un mayor peso en el café más tostado, su contribución a la capacidad antioxidante global del café fue mayor al incrementar el grado de tostado.

### **Determinación de la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA)**

Determinada la capacidad antioxidante total, se decidió valorar la actividad antioxidante de las muestras frente a radicales libres concretos, como es el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>), una de las especies oxigénicas más reactivas y dañinas para los tejidos biológicos. Estos radicales pueden generarse bajo condiciones fisiológicas en el cuerpo humano donde son capaces de reaccionar con las proteínas, los ácidos grasos insaturados, el DNA y prácticamente con cualquier membrana biológica (Parras P. *et al.*, 2007).



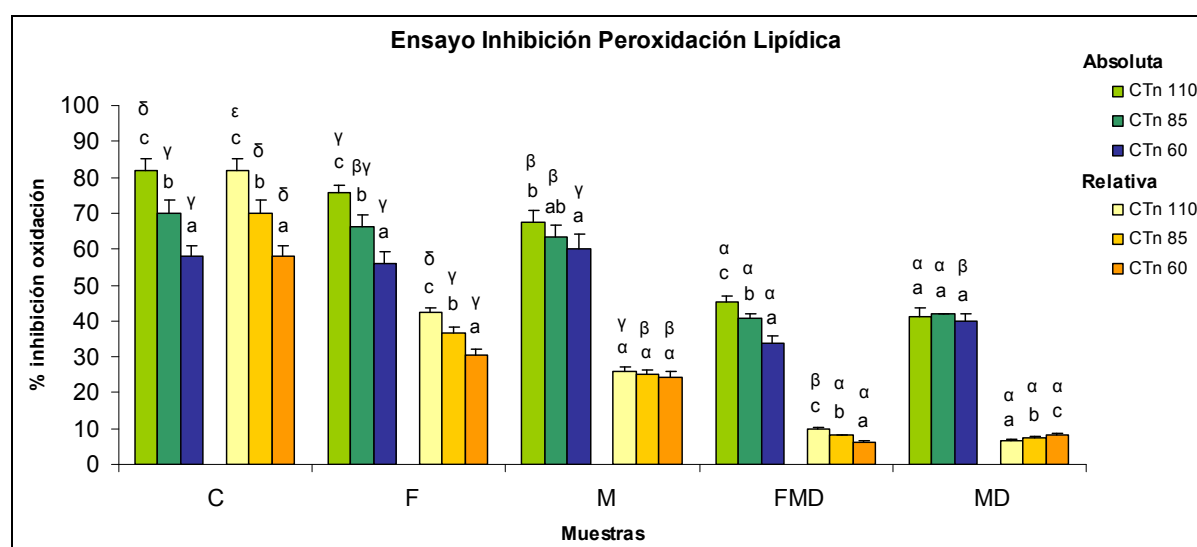
**Figura 5. Determinación de la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA).** Resultados expresados como % de inhibición en relación al control oxidado, en aproximación absoluta (por mg de muestra) y relativa (por mg de café). Valores presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

La actividad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA) de las muestras de café se determinó *in vitro* mediante el ensayo de la desoxirribosa, donde los radicales OH<sup>·</sup> son generados por una mezcla de ácido ascórbico y FeCl<sub>3</sub> (en presencia de EDTA). Este ensayo no ha sido muy utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante del café, no habiéndose encontrado en la bibliografía resultados en cuanto a los efectos del tostado o de la digestión sobre la HRSA, aunque sí que se ha determinado que el café es capaz de inhibir la oxidación inducida por el radical hidroxilo, actuando como antioxidante secundario al impedir la generación de estos radicales (Parras P. *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el ensayo (Figura 5) se han presentado como % de inhibición de la oxidación al usar 100  $\mu$ L de las muestras diluidas a 10 mg/mL, de manera que aquellas con mayor capacidad antioxidante darán valores más elevados de % de inhibición.

Los resultados de la HRSA de las muestras C fueron similares a los obtenidos en el estudio de la capacidad antioxidante total, observándose una disminución al incrementar el grado de tostado, pasando de un 66,2% a un 60,7% y a un 54,7% para el café claro (CTn 110), medio (CTn 85) y oscuro (CTn 60), respectivamente. Analizando las muestras según su capacidad estabilizadora absoluta, las muestras de los filtrados (F y FMD) presentaron la misma tendencia que las muestras C, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las muestras M, y en el caso de las muestras MD, se obtuvo mayor protección al aumentar el grado de tostado. Se observó que en el café CTn 110 todas las muestras (C, F, M, FMD y MD) dieron valores bastante similares, aunque la de menor efecto HRSA fue la muestra M (60%) y la de mayor efecto estabilizador la muestra MD (67,4%). En los cafés CTn 85 y CTn 60 las muestras F dieron los valores más bajos, correspondiendo la mayor HRSA de nuevo a las muestras MD. Las diferencias más marcadas entre las distintas muestras se observaron en el café oscuro (CTn 60). Al analizar los resultados desde la perspectiva relativa, se mantuvo la tendencia descrita anteriormente en la determinación absoluta en cuanto al efecto del tostado sobre la capacidad estabilizadora del radical hidroxilo de las distintas fracciones, aunque la contribución de las muestras F fue superior que la de los respectivos retenidos (M). La contribución de las muestras FMD y MD a la HRSA fue dependiente del grado de tostado: en el café menos tostado (CTn 110) FMD contribuyó en mayor medida, en el café de tostado medio (CTn 85) ambas fracciones por igual, y en el café más tostado (CTn 60) MD proporcionó mayor % de inhibición.

### **Valoración de la inhibición de la Peroxidación Lipídica**

Como biomarcador del estrés oxidativo a lípidos, se evaluó la inhibición de la peroxidación lipídica, determinando la capacidad de las muestras para estabilizar los radicales peroxilos (LOO<sup>·</sup>) generados durante la reacción en cadena que lleva a la oxidación de los microsomas. Los estudios realizados respecto a la capacidad estabilizadora de radicales peroxilo sugieren que los compuestos fenólicos del café presentan una elevada actividad (Parras P. *et al.*, 2007), así como la fracción correspondiente a las melanoidinas, aunque la formación de melanoidinas con dicha capacidad sólo ocurre en determinadas fases del tostado, de manera que los MRPs formados durante los pasos intermedios de las reacciones de Maillard son los que poseen la mayor capacidad estabilizadora de radicales peroxilo, siendo probable que estos productos se pierdan o se transformen en otros compuestos de menor capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica en los pasos avanzados de estas reacciones (Del Castillo M.D. *et al.*, 2002; Nicoli M.C. *et al.*, 1997).



**Figura 6. Determinación de la capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica.** Resultados expresados como % de inhibición en relación al control oxidado, en aproximación absoluta (por 10 µg de muestra) y relativa (por 10 µg de café). Valores presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

La Figura 6 recoge los resultados del ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica, expresados como % de inhibición de la oxidación. Se observó que en las muestras C existieron diferencias significativas entre los diferentes cafés en función del grado de tostado, correspondiendo la mayor protección al café claro (C 110 = 81,8% de inhibición) y la menor al café más tostado (C 60 = 57,9% de inhibición). Dada la composición de las muestras de café en cuanto a polifenoles totales, pre-melanoidinas y MRPs, estos resultados concuerdan con las hipótesis propuestas anteriormente sobre la importancia de los polifenoles en la inhibición de la peroxidación y la mayor contribución de los productos de pasos intermedios de las reacciones de Maillard que los productos finales en la capacidad estabilizadora de radicales LOO<sup>·</sup> (Parras P. *et al.*, 2007; Del Castillo M.D. *et al.*, 2002; Nicoli M.C. *et al.*, 1997). Desde la perspectiva absoluta, la disminución de la capacidad inhibidora de la peroxidación con el tostado se observó también en las muestras de filtrados (F y FMD), aunque, respecto a las muestras C, fue aproximadamente un 5% inferior en las muestras F (en todos los grados de tostado) y un 35% (FMD 110) - 25% (FMD 60) inferior en las muestras tras la digestión de las melanoidinas. En las muestras M también se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras en función del tostado, aunque en menor medida, estando su capacidad antioxidante en el mismo orden que la de las muestras F (algo inferior para el café CTn 110). Las muestras MD no presentaron diferencias significativas entre sí, presentando todas en torno al 40 % de inhibición de la oxidación. Los valores de las muestras FMD y MD no fueron muy diferentes entre sí, excepto en el café más tostado, donde FMD 60 proporcionó menor inhibición que MD 60, resultados que no coinciden con las observaciones hechas en otro estudio (Del Castillo M.D. *et al.*, 2002), donde se determinó que eran las fracciones de bajo e intermedio peso molecular de los MRPs las que presentaban mayor capacidad antioxidante que la fracción de elevado peso molecular para todos los grados de tostado (claro, medio y oscuro). Al analizar los resultados desde la aproximación relativa, se obtuvo una mayor contribución de las muestras F que las M en todos los cafés, disminuyendo en ambas muestras la inhibición de la peroxidación al aumentar el grado de tostado, aunque no de forma significativa para los retenidos (M). Las muestras tras la digestión contribuyeron de forma bastante similar, pero en las muestras FMD la protección frente a la oxidación fue menor al aumentar el grado de tostado, mientras que en las muestras MD se observó lo contrario.

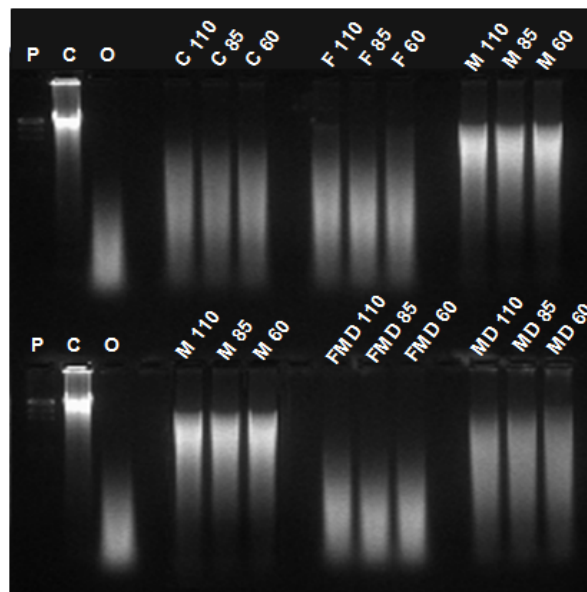
### **Valoración de la protección frente al daño oxidativo del DNA**

El último de los biomarcadores de estrés oxidativo que se evaluó en este estudio fue la protección frente al daño oxidativo del DNA. El estrés oxidativo puede inducir daños en el DNA provocando mutaciones de bases, rupturas en las cadenas (de una o de las dos cadenas del DNA), recombinación del DNA y rupturas o reorganizaciones en los cromosomas (Rivero D. *et al.*, 2005). Para valorar la protección frente a la oxidación del DNA se llevó a cabo dos determinaciones: una *in vitro* (directamente sobre DNA) en geles de agarosa, y otra *ex vivo* (en cultivos celulares) para poder valorar también el efecto genoprotector del café.

#### **- Inhibición del daño oxidativo al DNA en geles de agarosa**

Los radicales hidroxilo (OH<sup>·</sup>) provocan la ruptura de las cadenas del DNA por su acción sobre el enlace fosfato, generando fragmentos más pequeños de DNA que pueden ser separados mediante electroforesis en geles de agarosa. Las muestras podrán inhibir el daño oxidativo al DNA: bien por sus propiedades estabilizadoras de radicales libres, por su capacidad quelante del cobre (II) evitando que se generen los radicales hidroxilo en presencia de ácido ascórbico, o por la protección directa del DNA al interactuar con él alguno de los compuestos presentes en las muestras (Rivero D. *et al.*, 2005).

La Figura 7 corresponde a una de las fotografías de los geles de agarosa obtenidos al evaluar la protección de las muestras de café frente al daño oxidativo del DNA provocado por los radicales OH<sup>·</sup>. Esta protección se consiguió incubando el DNA de timo de ternera en presencia de 300 µL de las muestras diluidas a 10 mg/mL. Por tanto, se trata de una valoración absoluta de la inhibición del daño oxidativo de las muestras, sin tener en cuenta su concentración en el café. Se preparó un control de DNA sin oxidar y el otro de DNA oxidado, para poder determinar la protección de las muestras frente a la oxidación al analizar las bandas de DNA en el gel. Respecto a la influencia del grado de tostado del café, se observó una ligera mayor protección del café CTn 110 en las muestras C, F y FMD, mientras que las muestras M protegieron de manera similar al DNA y en las muestras MD se apreció un ligero incremento de la inhibición del daño oxidativo al aumentar el grado de tostado del



**Figura 7. Protección de las muestras frente a la oxidación del DNA.** Separación en geles de agarosa del DNA de timo de ternera sometido a estrés oxidativo e incubado con las muestras de café. P: patrón de pesos moleculares de 23,1 Kb a 125 pb, C: DNA control, O: DNA oxidado.

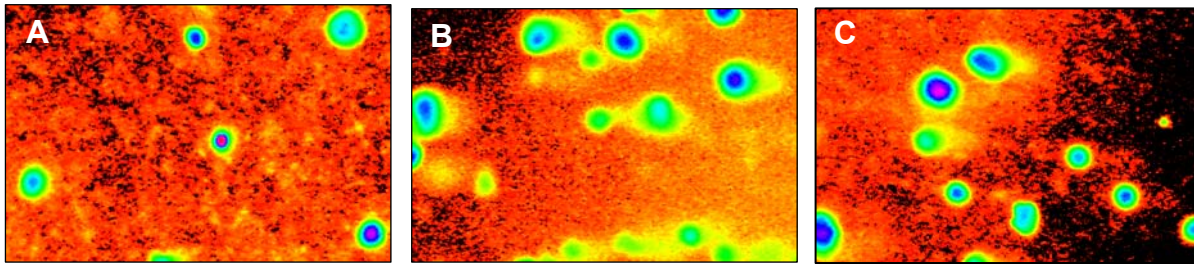
café de partida. En relación a la protección conseguida por las diferentes muestras (C, F, M, FMD y MD), en las pertenecientes a los filtrados (F y FMD) se observó una protección bastante menor que en el resto, especialmente en las muestras FMD. Las muestras correspondientes a los retenidos (M y MD) fueron las que protegieron en mayor medida al DNA de la oxidación. No se ha encontrado en la bibliografía ningún ensayo de este tipo en muestras de café, de manera que no fue posible comparar los resultados obtenidos. Sin embargo, puesto que en el ensayo de estabilización del radical hidroxilo (HRSA) no se obtuvieron diferencias tan grandes entre las distintas muestras, es posible que, además de la protección conseguida al estabilizar los radicales OH<sup>·</sup> o al impedir su generación (en este caso por quelación del cobre(II) en lugar del Fe(III) que se emplea en el ensayo HRSA), los compuestos de mayor peso molecular presentes en el café (muestras M y MD) puedan interaccionar con el DNA y protegerlo frente a la oxidación. Este efecto protector también puede ser debido a que las melanoidinas sean quelantes muy eficientes del cobre (II) y por ello, en este ensayo, las muestras enriquecidas en estos compuestos muestren esta elevada protección frente al daño oxidativo del DNA.

#### - Estudio del efecto genoprotector en células HT-29

El tercero de los objetivos de este estudio fue evaluar la protección del café sobre el DNA en cultivos celulares, ya que el resto de los ensayos realizados fueron métodos *in vitro*, que aportan valiosa información sobre la capacidad antioxidante de las muestras, pero no permiten determinar exactamente lo que ocurre en los sistemas biológicos. Los cultivos celulares se usan habitualmente como modelo experimental para conocer los efectos de los compuestos bioactivos sobre la homeostasis celular, así como su efecto genoprotector (Daglia M. *et al.*, 2004).

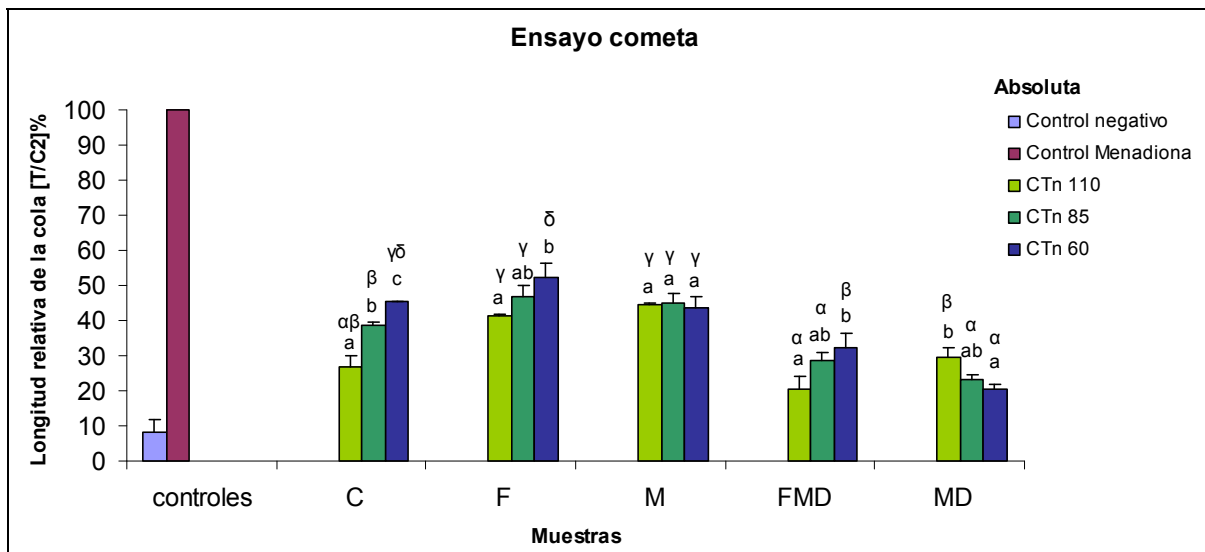
La ruptura de las cadenas de DNA puede ensayarse *ex vivo*, en cultivos celulares, mediante el denominado “ensayo cometa”, que permite el análisis del daño oxidativo al DNA en ausencia y en presencia de las muestras con los compuestos bioactivos, aportando información sobre el efecto genoprotector, ya que dichos compuestos deberán de llegar hasta el DNA del núcleo de las células y protegerlo frente a la oxidación provocada por la menadiona, compuesto bien caracterizado para su uso como inductor de daño oxidativo celular (Tice R. *et al.*, 2000).





**Figura 8. Ensayo cometa en células HT-29.** A) Control sin oxidar, B) Control oxidado (células tratadas con menadiona), C) Células incubadas con 50 µg de la muestra C 110 y tratadas con menadiona. Imágenes de las fotografías analizadas con el programa *CometScore*<sup>TM</sup>.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo ilustrativo de las fotografías obtenidas en el ensayo cometa al ser analizadas por el programa *CometScore*<sup>TM</sup>. En ellas puede apreciarse el efecto genoprotector, al comparar los controles sin oxidar y oxidado (tratado con menadiona) con las células incubadas en presencia de una de las muestras y sometidas posteriormente a estrés oxidativo. En la Figura 9 se han recogido los resultados de la inhibición de la degradación del DNA obtenidos por las diferentes muestras, así como para el control sin oxidar (control negativo) y el oxidado (control Menadiona). Para este ensayo sólo se han representado los resultados desde la aproximación absoluta, presentándolos en % como longitud de la cola relativa respecto al control oxidado, al que se ha dado el valor del 100% ([T/C2] %). Cuanto más dañado se encuentre el DNA, la longitud de la cola del cometa será mayor al poder migrar más distancia los fragmentos de DNA más pequeños. Por ello, cuanto más daño oxidativo haya sufrido el DNA de las células, se obtendrá un mayor % de longitud relativa de la cola.



**Figura 9. Ensayo cometa.** Migración del DNA evaluada por la longitud de la cola del cometa (n = 60 para cada muestra). Resultados expresados en [% [T/C2]] = % de longitud relativa de la cola respecto al control oxidado (100 %), en aproximación absoluta (por 50 µg de muestra). Valores presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las letras latinas indican diferencias significativas en función del grado de tostado (CTn 110, CTn 85, CTn 60) entre los valores obtenidos para cada muestra (C, F, M, FMD o MD). Las letras griegas hacen referencia a diferencias significativas entre las muestras (C, F, M, FMD o MD) obtenidas a partir de cada café de un mismo grado de tostado (CTn 110, CTn 85 o CTn 60).

Se observó claramente que todas las muestras protegían al DNA de la oxidación, evitando que resultara tan dañado como en el control oxidado. No se ha encontrado en la bibliografía estudios en los que se haya analizado la capacidad antioxidante del café mediante el ensayo cometa, pero sí que se ha comprobado su efecto protector *ex vivo* mediante el ensayo MTT, donde se analiza la viabilidad celular tras la inducción de estrés oxidativo (Daglia M. *et al.*, 2004). En relación al efecto del tostado sobre la capacidad inhibidora del daño oxidativo al DNA del café, en las muestras C pudo observarse que el café CTn 110 protegió en mayor medida de la oxidación ([T/C2] = 26,9%), siendo menor la

protección conseguida por el café CTn 85 ([T/C2] = 38,5%) y por el CTn 60 ([T/C2] = 45,3%), existiendo diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ). La misma tendencia se obtuvo en las muestras de filtrado (F y FMD), mientras que las muestras M no presentaron diferencias significativas entre ellas, y en las muestras MD, fue la procedente del café más tostado (MD 60) la que presentó una mayor protección, observándose que el efecto genoprotector aumentaba de manera significativa en estas muestras con el grado de tostado. A diferencia de lo observado en ensayos anteriores, las muestras FMD y MD mostraron un mayor efecto genoprotector que las muestras de café C y que sus ultrafiltrados (F y M), con excepción del café CTn 110, donde C se situó entre FMD y MD. En este café, la muestra FMD evitó en mayor medida el daño oxidativo que MD, mientras que en el café CTn 60 ocurrió al contrario, siendo la muestra MD la que presentó el mayor efecto protector. A la vista de estos resultados y comparándolos con los obtenidos en los geles de agarosa, cabe suponer que la digestión de las melanoidinas del café provoque modificaciones en la estructura de los compuestos que las forman, tanto en los de bajo peso molecular no covalentemente unidos (FMD) como en los que constituyen la estructura central de las melanoidinas (MD). Esto puede resultar en un aumento de su biodisponibilidad por las células, de su capacidad de interactuar con el DNA, o de su capacidad de inhibir el estrés oxidativo inducido por la menadiona al estabilizar las especies reactivas generadas en la célula, ejerciendo así su efecto genoprotector.

#### **4.3. Estudio de correlaciones entre los distintos ensayos de capacidad antioxidante y composición del café.**

El último de los objetivos de este estudio sobre la capacidad antioxidante del café fue evaluar la existencia de correlaciones entre los diferentes ensayos realizados. Para ello se realizó un análisis multivariado de los datos obtenidos para cada ensayo, incluyendo todas las muestras, encontrándose numerosas correlaciones generales ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar:

- Correlaciones entre el color y la composición: Se observaron correlaciones positivas entre los parámetros del CIELab  $a^*$  y  $b^*$  con el contenido en pre-melanoidinas ( $R=0,6240$  y  $R= 0,7216$ , respectivamente) y en mayor medida con el contenido en MRPs ( $R=0,9487$  y  $R=0,9731$ ). En cambio, el parámetro  $L^*$  presentó correlaciones negativas con la composición en pre-melanoidinas ( $R=-0,7127$ ) y MRPs ( $R=-0,9757$ ), siendo positiva la correlación entre  $L^*$  y el contenido en polifenoles totales (PTT), aunque no muy elevada ( $R=0,3004$ ). Es destacable que se obtuvo una correlación positiva entre el contenido en pre-melanoidinas y el de MRPs ( $R=0,7084$ ), ya que en las muestras con más pre-melanoidinas también había más MRPs, pero si se analizan parcialmente los datos, comparando cada una de las distintas muestras en función del tostado, la correlación entre pre-melanoidinas y MRPs fue siempre negativa, ya que en todas las muestras (C, F, M, FMD y MD) al aumentar el grado de tostado disminuía el contenido en pre-melanoidinas y aumentaba el de MRPs.

- Correlaciones entre los ensayos de capacidad antioxidante: Se obtuvieron correlaciones positivas de los tres ensayos de capacidad antioxidante total entre sí ( $ABTS^+/DPPH^+ \rightarrow R=0,8388$ ;  $ABTS^+/FRAP \rightarrow R= 0,9311$ ;  $DPPH^+/FRAP \rightarrow R=0,9219$ ) y también entre éstos y el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica ( $R=0,8330$  con  $ABTS^+$ ;  $R=0,9528$  con  $DPPH^+$ ;  $R=0,8833$  con  $FRAP$ ). Por otra parte, se observó también una correlación positiva entre el ensayo HRSA y el ensayo cometa ( $R=0,8218$ ).

- Correlaciones entre la composición y los ensayos de capacidad antioxidante: El contenido en PPT se correlacionó positivamente con los ensayos de capacidad antioxidante total ( $R=0,9465$  con  $ABTS^+$ ;  $R=0,9335$  con  $DPPH^+$ ;  $R=0,9553$  con  $FRAP$ ) y con el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación ( $R=0,9124$ ). En cambio, el contenido en pre-melanoidinas presentó una correlación positiva bastante alta con el ensayo HRSA ( $R=0,8107$ ) y con el ensayo cometa ( $R=0,7142$ ).



## 5. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio sobre los efectos del tostado en la capacidad antioxidante, biomarcadores y el efecto genoprotector del café y sus distintas fracciones dio lugar a las siguientes conclusiones:

1) El contenido de polifenoles y pre-melanoidinas disminuye, a la vez que se incrementa el contenido de MRPs, al aumentar el grado de tostado de las muestras de café soluble, como consecuencia de que los compuestos fenólicos presentes originalmente en el café pasan a formar parte de las melanoidinas que se generan durante el proceso de tostado.

2) Todos los cafés analizados presentan una elevada capacidad antioxidante total y un elevado efecto protector sobre biomarcadores concretos de estrés oxidativo (lípidos y DNA), aunque dicha capacidad disminuye con el grado de tostado. La principal causa es la menor actividad antioxidante y contribución de los compuestos de bajo peso molecular del café al aumentar el grado de tostado.

3) Independientemente del grado de tostado, la actividad antioxidante de la fracción enriquecida en melanoidinas es similar para los distintos cafés, contribuyendo notablemente en su capacidad antioxidante global. De las fracciones obtenidas por digestión gastrointestinal, en el café menos tostado los compuestos unidos no covalentemente a las melanoidinas son los que contribuyen en mayor medida a su capacidad antioxidante, al contrario de lo observado en el café más tostado, donde la contribución se debe principalmente a la fracción de melanoidinas purificadas.

4) La digestión gastrointestinal de las melanoidinas resulta en un extracto con una elevada capacidad de inhibir el daño oxidativo al DNA en cultivos celulares.

5) Los compuestos fenólicos presentes en el café contribuyen en mayor medida que las melanoidinas sobre la capacidad antioxidante total del café y en su capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica. En cambio, la estabilización de radicales OH<sup>·</sup> y la protección del DNA frente al daño oxidativo, están determinadas mayormente por el contenido en pre-melanoidinas y melanoidinas del café.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

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

**Andueza S., Cid C. and Nicoli M.C. (2004).** Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and "Torrefacto" coffee. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 37, 893-897.

**Anese M. and Nicoli M.C. (2003).** Antioxidant Properties of Ready-to-Drink Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* 51, 942-946.

**Bekedam E.K., Loots M.J., Schols H.A., Van-Boekel M.A.J.S. and Smit G. (2008).** Roasting Effects on Formation Mechanisms of Coffee Brew Melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7138-7145.

**Benzie I.F.F. and Strain J.J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of 'antioxidant power': the Frap assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.

**Borrelli R.C., Visconti A., Mennella C., Anese M. and Fogliano V. (2002).** Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6527-6533.

**Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food Science and Technology* 28, 25-30

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

**Capel J.C. and Pérez J. (2010).** Café y estilo de vida saludable. Café, placer y salud. EDIMSA, ISBN: 978-B4-7714-350-5, 15-32.

**C.I.E. (1986).** Colorimetry, 2nd ed. Publ. 15, 2. Wien: Central Bureaux of the Commission Internationale de l'Eclairage, 1-83.

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

**Daglia M., Papetti A., Gregotti C., Bertè F. and Gazzani G. (2000).** In Vitro Antioxidant and ex Vivo Protective Activities of Green and Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1449-1454.

**Del Castillo M.D., Ames J.M. and Gordon M.H. (2002).** Effect of Roasting on the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3698-3703.

**Delgado-Andrade C. and Morales F.J. (2005).** Unraveling the Contribution of Melanoidins to the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1403-1407.

**Delgado-Andrade C., Rufián-Henares J.A. and Morales F.J. (2005).** Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7832-7836.

**Fukushima Y., Ohie T., Yokenawa Y., Yonemoto K. et al. (2009).** Coffee and Green Tea As a Large Source of Antioxidant Polyphenols in the Japanese Population. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1253-1259.

**Gómez-Ruiz J.A., Ames J.M. and Leake D.S. (2008).** Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1017-1024.

**Halliwell B., Gutteridge J.M.C. and Aruoma O.I. (1987).** The deoxyribose Method: A Simple 'test-tube' assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 165, 215-219.

**Hečimović I., Belš čak-Cvitanović A., Horžić D. and Komes D. (2011).** Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.059

**Kessler M., Ubeaud G. and Jung L. (2003).** Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. and Pharmacol.* 55, 131-142.

**López-Galilea I., De Peña M.P. and Cid C. (2008).** Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 141-149.

**López-Galilea I., De Peña M.P. and Cid C. (2007).** Correlation of Selected Constituents with the Total Antioxidant Capacity of Coffee Beverages: Influence of the Brewing Procedure. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6110-6117.

- Miller N.J. and Rice-Evans C.A. (1997).** Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS<sup>•+</sup> Radical Cation Assay. *Free Rad. Res.* 26, 195-199.
- Moon J-K. and Shibamoto T. (2009).** Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1655-1666.
- Nicoli M.C., Anesse M., Manzocco L. and Lericci C.R. (1997).** Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 30, 282-297.
- Parras P., Martínez-Tomé M., Jiménez A.M. and Murcia M.A. (2007).** Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry* 102, 582-592.
- Pérez-Martínez M., Caemmerer B., De Peña M.P., Cid C. and Kroh L.W. (2010).** Influence of Brewing Method and Acidity Regulators on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2958-2965.
- Richelle M., Tavazzi I. and Offord E. (2001).** Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa and Tea) Prepared per Cup Serving. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3438-3442.
- Rivero D., Pérez-Magariño S., González-SanJosé M.L., Valls-Belles V. and Muñoz P. (2005).** Inhibition of Induced DNA Oxidative Damage by Beers: Correlation with the Content of Polyphenols and Melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3637-3642.
- Rufián-Henares J.A. and Morales F.J. (2007).** Effect of in Vitro Enzymatic Digestion on Antioxidant Activity of Coffee Melanoidins and Fractions. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10016-10021
- Sacchetti G., Di Mattia C. Pittia P. and Mastrocola D. (2009).** Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* 90, 74-80.
- Singleton V.L. and Rossi J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- Summa C.A., De la Calle B., Brohee M., Stadler R.H. and Anklam E. (2007).** Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT* 40, 1849-1854.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B. et al. (2000).** Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Vignoli J.A., Bassoli D.G. and Benassi M.T. (2011).** Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry* 124, 863-868.