



## QUANTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN COFFEA ARABICA SHELL IN BOLIVIA

## CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CÁSCARA DE COFFEA ARABICA EN BOLIVIA

Received 11 07 2018  
Accepted 12 20 2018  
Published 12 30 2018

Vol. 35, No.5, pp. 123-132, Nov./Dic. 2018  
Revista Boliviana de Química

35(5), 123-132, Nov./Dec. 2018  
Bolivian Journal of Chemistry



Full original article

Peer-reviewed

Teresa M. Pacheco, Sergio Torrez Álvarez, Giovanna R. Almanza\*

Laboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas IIQ, Carrera de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales FCPN, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, phone +59122792238, La Paz, www.iiq.umsa.bo

Keywords: Protocatechuic acid, Caffeine, Chlorogenic acid, Coffea arabica, Coffee husk, coffee silverskin, La Paz, Bolivia.

### ABSTRACT

In this study, we established the content of protocatechuic acid (AP), chlorogenic acid (ACG) and caffeine (CAF) in 11 samples of coffee husks obtained from several coffee companies from northern La Paz in Bolivia. The content of these compounds was quantified by an HPLC-DAD method using an external standard in each case. The results showed that the content of AP varies between 0.32 and 9.25 mg/g of husks, the content of CAF between 0.55 and 35.68 mg/g of husks, and the content of ACG between 0.04 and 17.06 mg/g of husks. The sample with the highest AP concentration came from the company Villa Oriente with 9.25 mg/g of dry husks; the highest concentration of CAF was from the company Chulumani Café with 35.68 mg/g of dry husks, and the sample with the highest concentration of ACG was from the company Chulumani Café with 17.06 mg/g of dry husks, high values in AP and CAF in comparison to others reported for coffee husks. In addition, we determined an effective method to obtain extracts enriched in phenolic compounds (ERCF) and in caffeine (ERC), using only solid-liquid and liquid-liquid extraction processes. ACG and the AP were quantified in the ERCF whereas CAF was quantified in ERC coming from samples of coffee husk from every company surveyed. Concentration values ranged up to 99.19 mg/g for the content of AP (Villa Oriente Company), 66.22 mg/g of ACG of the ERCF and a concentration of 850.69 mg/g of CAF of the ERC (Chulumani Café Company).

\*Corresponding author: [giovyalmanza@gmail.com](mailto:giovyalmanza@gmail.com), [galmanza3@umsa.bo](mailto:galmanza3@umsa.bo)



## RESUMEN

En este estudio se analizó el contenido de ácido protocatéquico (AP), ácido clorogénico (ACG) y cafeína (CAF) en 11 muestras de cáscaras de café obtenidas de diversas empresas productoras de café del Norte de La Paz, Bolivia. El contenido de estos compuestos se cuantificó por un método de HPLC-DAD utilizando un patrón externo de referencia en cada caso. Los resultados mostraron que el contenido de AP varía entre 0,32 y 9,25 mg/g de cáscara, la CAF entre 0,55 y 35,68 mg/g de cáscara, y el ACG entre 0,04 y 17,06 mg/g de cáscara. La muestra con mayor concentración de AP fue de la empresa Villa Oriente con 9,25 mg/g de cáscara seca; la de mayor concentración de CAF fue de la empresa Chulumani Café con 35,68 mg/g de cáscara seca, y la muestra con mayor concentración de ACG fue de la empresa Chulumani Café con 17,06 mg/g de cáscara seca, valores altos en AP y CAF en relación a otros en cáscaras de café reportados. Además, se determinó un método efectivo de obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos (ERCF) y ricos en cafeína (ERC), empleando solamente procesos de extracción sólido-líquido y líquido-líquido. En los ERCF se cuantificó el ACG y el AP, mientras que en el caso de los ERC se cuantificó la CAF, determinándose una concentración de hasta 99,19 mg/g de AP de ERCF de la empresa Villa Oriente, una concentración de hasta 66,22 mg/g de ACG de ERCF de la empresa Chulumani Café y una concentración de hasta 850,69 mg/g de CAF de ERC de la empresa Chulumani Café.

## INTRODUCCIÓN

Los cafetos son arbustos tropicales de hojas verdes que producen frutos carnosos rojos o púrpuras, llamados cerezas de café, presentan dos núcleos que contienen cada uno un grano o semilla de café de color verde, y pertenecen al género *Coffea* (Rubiaceae), que engloba a más de un centenar de especies, de las cuales dos son las más cultivadas y comercializadas: *Coffea arabica* en sus variedades Typica y Bourbon (Arábica) y *Coffea canephora* (Robusta) [1].

Bolivia es el quinto exportador de café en América Latina, según datos oficiales entre 2012 y 2016, los volúmenes de exportación del café boliviano fueron de 32.144 a 16.072 toneladas, respectivamente [2]. En general en Bolivia el 95% de *Coffea arabica* es de la variedad Typica y el 5% del resto de las variedades [2].

Los cultivos de café en Bolivia se concentran sobre todo en las provincias yungueñas del departamento de La Paz. El proceso de beneficiado para obtener los granos de café verde, genera grandes cantidades de un residuo conocido como cascarilla o pergamino (12% en peso seco), además de la cáscara de café como tal, la cual en Bolivia es conocida como sultana o café de los pobres (29% en peso seco) [3]. Ambos residuos son poco o nada utilizados, y en este estudio, se estableció su contenido en ácido protocatéquico, cafeína y ácido clorogénico [4,5].

El ácido protocatéquico (AP) es un ácido dihidroxibenzoico con diversas actividades farmacológicas y es el metabolito mayoritario del contenido total de polifenoles antioxidantes del té verde [5]. El AP es antioxidante y anti-inflamatorio [6], inhibe la generación de radicales libres, influyendo en las fases 1 y 2 del metabolismo de ciertos carcinógenos, bloqueando directamente el sitio de unión con moléculas de ADN. Tiene actividad citoprotectora en úlceras y fortalece la mucosa gástrica mejorando la defensa de la mucosa [7]. Aumenta la actividad del glutatión peroxidasa y de la catalasa, y disminuye el nivel de malondialdehído, y es antifibrótico. Además, es antiviral, regulando la secreción de HBsAg y disminuyendo la liberación del ADN del VHB a partir de HepG2. Es antiarterosclerótico en el modelo animal, porque inhibe la adhesión de monocitos a células endoteliales aórticas en ratones, activadas por TNF- VCAM-1, expresión de ICAM-1 y reduce la actividad de unión de NF- $\kappa$ B. Es antibacteriano disminuyendo los niveles de oxidación lipídica y tiene un efecto neurológico [8].

Los ácidos clorogénicos (ACG) son ésteres del ácido cafeico, de los cuales el más abundante es el ácido 5-cafeoilquínico o ácido clorogénico como tal. La cantidad de ácidos clorogénicos varía con el grado de maduración de la especie [9] y otros factores asociados a la calidad del café como la altura y la presencia o ausencia de sombra, inclusive se la relaciona con la resistencia de la planta a algunas enfermedades [10]. Estos ácidos son precursores de los responsables del sabor y de los pigmentos del café tostado [11], lo cual aunado a su gran solubilidad en agua da como resultado un buen candidato para la evaluación química de la calidad del café [12]. Los ácidos clorogénicos, que contienen el núcleo fenólico, se relacionan con la prevención de enfermedades por estrés oxidativo por sus efectos antioxidantes y anticancerígenos [13]. También, son utilizados para la prevención sanitaria de los dientes [14], formando una película protectora contra las bacterias [14,15]. Además, se les atribuye un efecto de prevención de ciertas drogadicciones, como el efecto observado opioide-antagonista [16].

La cafeína (CAF) es un alcaloide que está presente en más de 60 especies de plantas [17]. Su estructura molecular pertenece al grupo de bases purínicas o púricas y corresponde a la 1,3,7-trimetilxantina íntimamente relacionada con la teobromina (3,7-dimetilxantina, presente en el cacao) y la teofilina (1,3-dimetilxantina, presente en el té) [18]. El efecto biológico de la cafeína parece ser el resultado de la acción en diversos objetivos moleculares, a



saber: receptores de adenosina, fosfodiesterasas, canales de calcio, receptores GABAA y otros [18,19]. La cafeína es un estimulante: tomar una taza de café o mate ayuda a vencer el cansancio, ya que la cafeína estimula el organismo en general. Es analgésica: relaja la musculatura, elevando el grado de tolerancia a dolores musculares, de espalda, y dolores de cabeza. Es antisomnolencia: prolonga el estado de vigilia sin mayor esfuerzo del organismo. Es antioxidante: inhibe radicales libres que causan enfermedades degenerativas, como el cáncer. Es digestiva: en dosis bajas, la cafeína incrementa los jugos digestivos y biliares ayudando a mejorar la digestión. Es diurética evitando la retención de líquidos, causa entre otras de los problemas de obesidad [20,21].

En el presente trabajo se realizó la cuantificación de ácido protocatéuico, cafeína y ácido clorogénico (ácido-5-O-cafeoilquínico) en extractos hidroalcohólicos (EHA), en extractos ricos en compuestos fenólicos (ERCF) y extractos ricos en cafeína (ERC), de 11 muestras de cáscaras de café, proporcionadas por diferentes empresas cafetaleras del Norte de La Paz. El objetivo es valorizar los productos de desecho del beneficiado del café con vistas a su eventual empleo en alimentos funcionales o suplementos para la salud que incluyan en su composición estos compuestos (AP, CAF, ACG).



Figura 1. Productos del beneficiado del Café (a) Cáscara de café, (b) Pergamino de café.

## RESULTADOS, DISCUSIÓN

Las muestras de cáscaras de café (sultana) fueron proporcionadas por diversas empresas (ver Tabla 1), además se obtuvo una muestra de sultana del Mercado Rodríguez zona San Pedro, ciudad de La Paz para comparación (Tabla 1). La muestra de cascarrilla (pergamino) de café fue proporcionada solo por la empresa Munaipata Café de Altura S.A (Tabla 1).

El proceso de extracción por maceración con EtOH 96°/H<sub>2</sub>O (80:20) fue de 24 horas a temperatura ambiente, obteniéndose los extractos hidro-alcohólicos (EHA). Los extractos EHA fueron sometidos a un tratamiento para obtener extractos enriquecidos en compuestos fenólicos (ERCF) y extractos ricos en cafeína (ERC). El contenido de ácido protocatéuico, cafeína y ácido clorogénico en los extractos se cuantificó usando un método HPLC-DAD con patrón externo, en base a un método reportado por Clifford & Ramírez [22]. Las curvas de calibración se realizaron utilizando un patrón comercial el ácido 5-O-cafeoilquínico (Sigma-Aldrich), y compuestos aislados de cáscaras de café identificados como ácido protocatéuico y cafeína. Se obtuvieron las siguientes ecuaciones: ácido protocatéuico,  $y = 9,43x + 15,0$ ,  $R^2 = 0,999$ ; cafeína,  $y = 7,36x + 10,6$ ,  $R^2 = 0,998$ ; ácido 5-O-cafeoilquínico,  $y = 4,31x + 0,02$ ,  $R^2 = 0,999$ . El análisis dio coeficientes de correlación de  $R^2 > 0,99$  lo que demuestra linealidad.

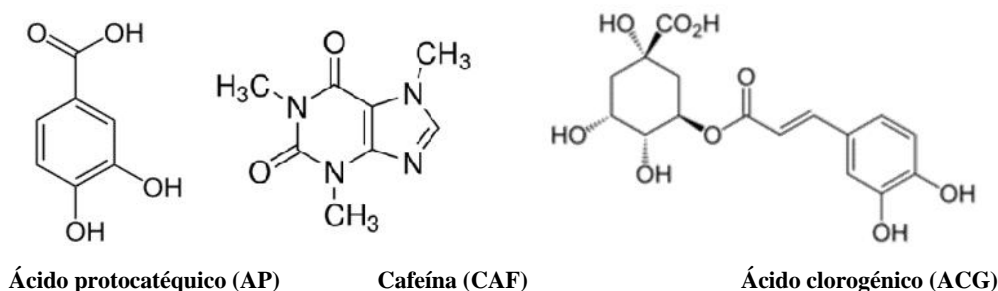


Figura 2. Compuestos cuantificados en los subproductos de beneficiado del café.



Para la cuantificación de AP, CAF y ACG, los extractos secos se disolvieron con agua ultrapurificada y se analizaron por triplicado a 254 nm para el AP (tiempo de retención 4,5 min), a 274 nm para la CAF (tiempo de retención 5,5 min) y 326 nm para el ACG (tiempo de retención 4,9 min), (Figura 3). Las fueron seleccionadas de acuerdo a los  $\lambda_{max}$  observados en sus respectivos espectros de barrido UV (Figura 3). Adicionalmente, se determinó el límite de detección (LOD), como la concentración de la muestra que dio un pico con una altura tres veces mayor que el nivel de ruido de referencia y el límite de cuantificación (LOQ) como 10 veces superior al nivel de ruido base. Así calculamos lo siguiente: para el AP, un LOD de 8,85 ppm y LOQ de 26,82 ppm; para la CAF, un LOD de 7,88 ppm y un LOQ de 23,89 ppm y para el ACG, un LOD de 5,76 ppm y un LOQ de 7,44 ppm.

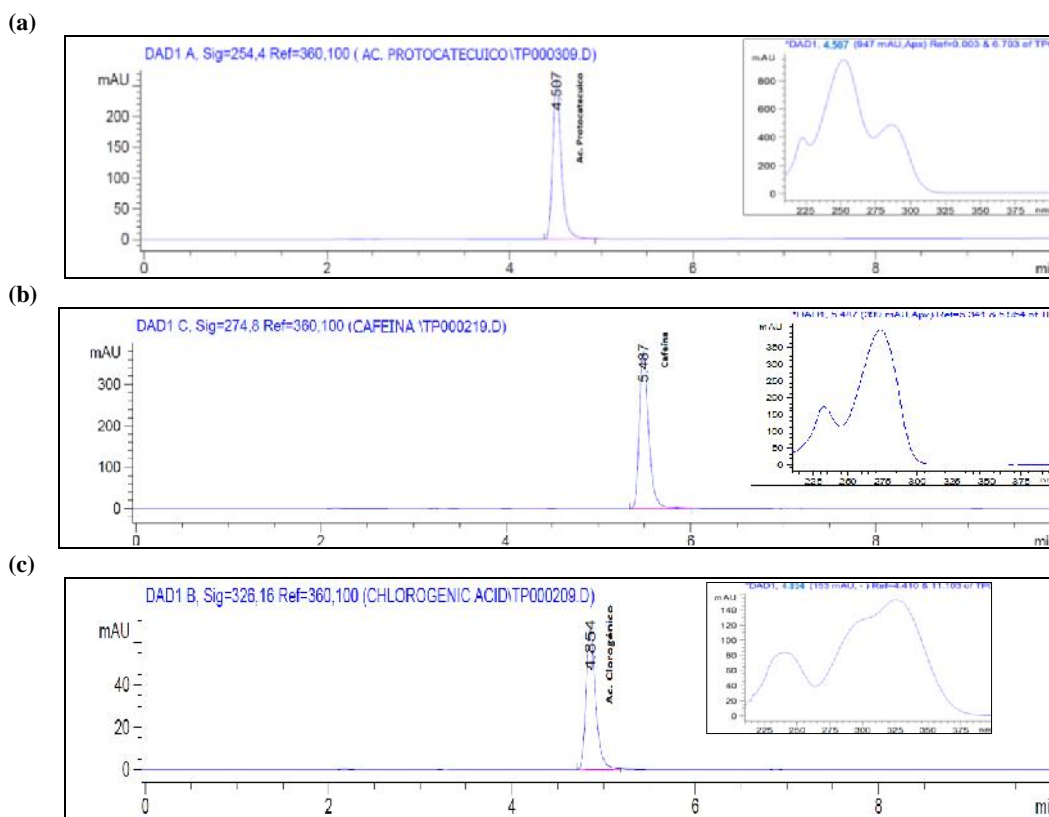


Figura 3. Cromatograma HPLC y espectros UV de los patrones: a) Ácido protocatecuico AP (25ppm), b) Cafeína CAF (50ppm) y c) Ácido clorogénico ACG (15ppm).

La Tabla 1 muestra los datos de cada muestra brindada por las diferentes empresas productoras de café, la mayor parte de las empresas manejan mezclas de variedades de café, todas pertenecen a la especie *Coffea arabica*, pero mezclan las variedades Typica, Caturra, Catuai y Catimor, aunque la mayoritaria es la variedad Typica. Las muestras fueron recolectadas principalmente del Norte de La Paz, tradicional región cafetalera de Bolivia.

En la Tabla 2 y Figura 4, se aprecian las cantidades en miligramos de AP, CAF y ACG por gramo de extracto EHA y su valor extrapolado en miligramos de AP, CAF y ACG por gramo de cáscara de las once muestras, observándose que las muestras de cáscaras y su correspondiente EHA con mayor concentración de AP fueron las provenientes de: 8. Villa Oriente ( $9,25 \pm 0,24$  mg/g de cáscara seca;  $18,73 \pm 0,49$  mg/g EHA), 9. Chulumani Café ( $3,76 \pm 0,13$  mg/g de cáscara seca;  $7,52 \pm 0,26$  mg/g EHA) y 6 y 7. Café Origen de la APCERL (WCS) ( $3,07 \pm 0,12$  mg/g de cáscara fresca;  $5,62 \pm 0,22$  mg/g extracto de cáscara fresca). Estos datos son superiores a los reportados en la literatura (0,1 a 3,1 mg de AP por g de cáscara seca [4]), diferencia debida probablemente a las condiciones de altura, la variedad y el proceso de beneficiado. Por otra parte, las muestras con mayor concentración de cafeína fueron: 9. Chulumani Café ( $35,68 \pm 1,57$  mg/g de cáscara seca;  $71,29 \pm 3,13$  mg/g extracto) y 6 y 7. Café Origen de la APCERL (WCS) ( $23,00 \pm 1,10$  mg/g de cáscara fresca;  $42,05 \pm 2,01$  mg/g extracto de cáscaras frescas y  $17,01 \pm 0,06$  mg/g extracto de cáscara seca;  $32,60 \pm 0,11$  mg/g), comparando con datos bibliográficos (0,22 a 12 mg de CAF



por g de cáscara seca [4,23]), las muestras locales son superiores en contenido de cafeína, muy adecuadas para el desarrollo de productos con valor agregado. Finalmente, las muestras con mayor concentración de ácido 5-O-cafeoilquinico (ACG) fueron: 9. Chulumani Café S.A (17,06 ± 0,41 mg/g de cáscara seca; 34,09 ± 0,82 mg/g extracto), 7. WCS (10,44 ± 0,53 mg/g de cáscara fresca; 19,09 ± 0,97 mg/g extracto de cáscara fresca) y 1. Munaipata Café con la variedad típica (8,41 ± 0,46 mg/g de cáscara seca; 14,97 ± 0,82 mg/g extracto). Los valores registrados son bajos, en relación a los reportados en la literatura (128,9 mg ACG por g de cáscara seca [4,23]) probablemente debido a que solo reportamos el contenido del ácido 5-O-cafeoilquinico, cuando normalmente se reporta el contenido de los ACG totales (alrededor de 34 ACG en granos de café verde [24] y alrededor de 7 en cáscaras de café [22]).

Es importante mencionar que en el caso de los EHA se reporta un buen rendimiento de cafeína del pergamino de la empresa 5. Munaipata Café con 51,94 ± 1,41 mg/g extracto, sin embargo, el extracto tiene un rendimiento bajo, en consecuencia, la cafeína se encuentra en poca cantidad en la cascarilla en sí, sin embargo, aun teniendo un porcentaje de rendimiento bajo resulta interesante, ya que este subproducto no es utilizado y se generan toneladas en el beneficiado del café, que podrían ser utilizadas para la obtención de extractos ricos en CAF que luego sirvan para bebidas o jarabes estimulantes anti-somnolencia [4].

*Tabla 1. Datos de las muestras colectadas en diferentes empresas productoras de café del Norte de La Paz*

N°	Muestra	Variedad	Empresa	Lugar	Altura m.s.n.m	Exposición al sol
1	Cáscara seca	Typica	Munaipata Café de Altura S.A	Coroico	1700-1880	no
2	Cáscara seca	Catuai	Munaipata Café de Altura S.A	Coroico	1700-1880	no
3	Cáscara fresca	Typica	Munaipata Café de Altura S.A	Coroico	1700-1880	no
4	Cáscara fresca	Catuai	Munaipata Café de Altura S.A	Coroico	1700-1880	no
5	Pergamino seco	Catuai y Typica	Munaipata Café de Altura S.A	Coroico	1700-1880	no
6	Cáscara de café seca	Typica, Caturra, Catuai y Catimor	Origen Café (APCERL, WCS)	Apolo	1100-1600	no
7	Cáscara fresca	Typica, Caturra, Catuai y Catimor	Origen Café (APCERL, WCS)	Apolo	1100-1600	no
8	Cáscara seca	Typica, Caturra, Catuai, Catimor	Villa Oriente (Coop. Agrícola)	Caranavi	1100-1650	si
9	Cáscara seca	Typica, Caturra, Catuai, Catimor	Chulumani Café S.A	Chulumani (Libertad)	1700-1800	si
10	Cáscara seca	Typica, Catuai, Catimor	Asociación de Caficultores Taypiplaya ASOCAFE	Taypiplaya	800-1000	si
11	Cáscara seca	-	Mercado Rodríguez	-	-	si

Los extractos ricos en compuestos fenólicos (ERCF, Tabla 3, Figura 5) presentan los contenidos siguientes: la mayor concentración de AP: Villa Oriente con 99,19 ± 2,90 mg/g de extracto, Munaipata Café con la variedad típica con 67,18 ± 3,84 mg/g de extracto y WCS con 65,22 ± 3,54 mg/g de extracto. La mayor concentración en ACG: Chulumani Café S.A con 66,22 ± 2,31 mg/g de extracto, Munaipata Café de Altura S.A con la variedad típica con 31,77 ± 2,71 mg/g de extracto y WCS con 23,27 ± 2,54 mg/g de extracto. La cantidad de cafeína en estos extractos fue prácticamente no detectada (n.d.) debido al proceso de descafeinado previo del que fueron objeto. Esta información permite explicar el elevado porcentaje en compuestos fenólicos de los extractos. Los altos contenidos en fenólicos dejan prever eventuales aplicaciones de los extractos para su uso en nutracéuticos de actividad antioxidante.

Para el caso de los extractos ricos en cafeína (ERC), los residuos con mayor concentración de cafeína (Tabla 4, Figura 5) fueron: Chulumani Café con 850,69 ± 18,42 mg/g de extracto, Munaipata Café con el residuo de cascarilla con 607,73 ± 13,15 mg/g de extracto y Munaipata Café con la variedad Catuai con 560,46 ± 20,54 mg/g de extracto. La cantidad de compuestos fenólicos en estos extractos fue prácticamente despreciable.

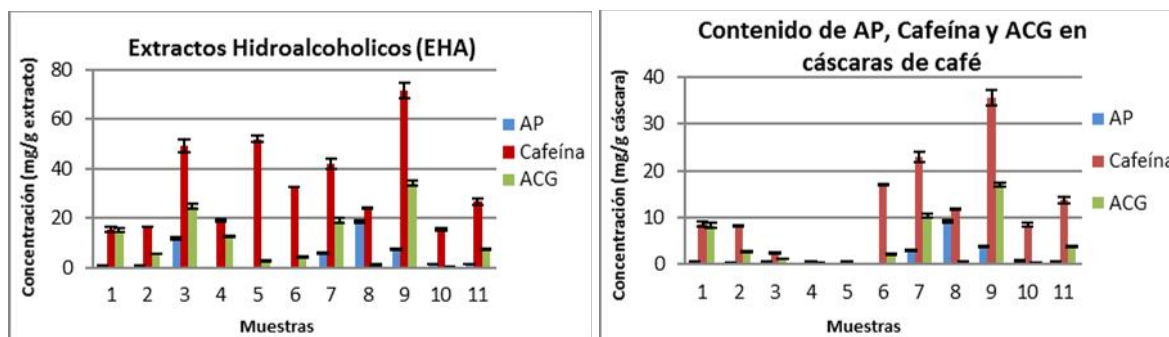




**Tabla 2.** Contenido de ácido protocatéutico, cafeína y ácido clorogénico en cáscaras de café y sus extractos hidroalcohólicos (EHA), de las diferentes empresas beneficiadoras de café

Nº de muestra	Rend ext (%)	mg AP/g extracto	mg AP/g cáscaras	mg CAF/g extracto	mg CAF/g cáscaras	mg ACG/g extracto	mg ACG/g cáscaras
1	56,19	0,94 ± 0,06	0,53 ± 0,04	15,38 ± 0,89	8,64 ± 0,50	14,97 ± 0,82	8,41 ± 0,46
2	50,05	0,64 ± 0,04	0,32 ± 0,02	16,55 ± 0,09	8,28 ± 0,05	5,43 ± 0,16	2,72 ± 0,08
3	4,92	11,83 ± 0,58	0,58 ± 0,03	49,07 ± 2,50	2,41 ± 0,12	24,80 ± 0,98	1,22 ± 0,05
4	2,88	n.d	n.d	18,96 ± 0,36	0,55 ± 0,01	12,73 ± 0,24	0,37 ± 0,01
5	1,47	n.d	n.d	51,94 ± 1,41	0,76 ± 0,02	2,62 ± 0,13	0,04 ± 0,01
6	52,19	n.d	n.d	32,60 ± 0,11	17,01 ± 0,06	4,24 ± 0,24	2,21 ± 0,13
7	54,69	5,62 ± 0,22	3,07 ± 0,12	42,05 ± 2,01	23,00 ± 1,10	19,09 ± 0,97	10,44 ± 0,53
8	49,40	18,73 ± 0,49	9,25 ± 0,24	23,96 ± 0,26	11,84 ± 0,13	1,05 ± 0,12	0,52 ± 0,06
9	50,05	7,52 ± 0,26	3,76 ± 0,13	71,29 ± 3,13	35,68 ± 1,57	34,09 ± 0,82	17,06 ± 0,41
10	55,65	1,45 ± 0,09	0,81 ± 0,05	15,30 ± 0,68	8,51 ± 0,38	0,49 ± 0,01	0,27 ± 0,01
11	51,75	1,44 ± 0,03	0,74 ± 0,01	26,61 ± 1,19	13,77 ± 0,62	7,38 ± 0,32	3,82 ± 0,17

Cada resultado representa la media ± SD para promedio n=3 experimentos independientes; n.d = no detectado



Cada barra representa la media ± SD para promedio n=3 experimentos independientes

**Figura 4.** Contenido de ácido protocatéutico, cafeína y ácido clorogénico en extractos y cáscaras de café de las diferentes empresas productoras de café.

**Tabla 3.** Contenido de ácido protocatéutico, cafeína y ácido clorogénico en extractos ricos en compuestos fenólicos (ERCF), de las diferentes empresas beneficiadoras de café

Nº	ERCF (%)	mg AP/g extracto	mg Caf/g extracto	Mg ACG/g extracto
1	3,96	67,18 ± 3,84	n.d	31,77 ± 2,71
2	3,03	59,78 ± 2,28	n.d	17,15 ± 0,37
3	0,30	25,73 ± 0,98	12,96 ± 0,26	0,50 ± 0,05
4	4,86	65,22 ± 3,54	10,76 ± 0,41	23,27 ± 2,54
5	4,00	99,19 ± 2,90	n.d	1,34 ± 0,07
6	3,89	24,59 ± 0,92	4,56 ± 0,08	66,22 ± 2,31
7	3,80	18,59 ± 1,01	n.d	6,98 ± 0,76
8	3,76	19,07 ± 0,23	n.d	8,72 ± 0,25

Cada resultado representa la media ± SD para promedio n=3 experimentos independientes; n.d = no detectado

**Tabla 4.** Contenido de cafeína en extractos ricos en cafeína (ERC), de las diferentes empresas beneficiadoras de café

Nº	ERC (%)	mg Caf/g extracto
1	4,37	443,49 ± 3,99
2	3,50	560,46 ± 20,54
3	1,01	607,73 ± 13,15
4	4,86	229,72 ± 5,86
5	5,00	531,67 ± 50,46
6	4,11	850,69 ± 18,42
7	3,89	22,55 ± 0,67
8	4,50	169,15 ± 5,04

Cada resultado representa la media ± SD para promedio n=3 experimentos independientes

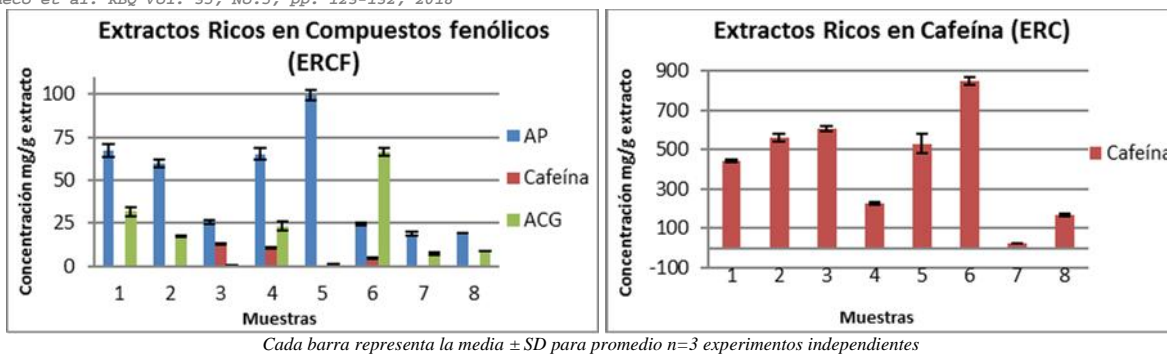


Figura 5. Contenido de ácido protocatéuico, cafeína y ácido clorogénico en extractos ricos en compuestos fenólicos y extractos ricos en cafeína.

En conclusión, se desarrolló un método adecuado para obtener extractos ricos en compuestos fenólicos y extractos ricos en cafeína. Se sugiere a los productores trabajar con las variedades por separado y tener mayor cuidado con el tratamiento de residuos, no desechar la cascarilla y secar la cáscara al abrigo de la luz. Es importante divulgar más las propiedades de la sultana, para el consumo en mates o tés o para la utilización en otros productos de valor agregado. Finalmente recomendamos realizar mayores estudios de la segunda cascarilla o pergamino, para el desarrollo de un producto nutracéutico rico en cafeína.

## EXPERIMENTAL

### Material vegetal

Las muestras de cáscaras de café fueron proporcionadas por las empresas: Munaipata Café de Altura, Origen Café de la Asociación de Productores de Café Ecológico Regional Larecaja (APCERL) Wildlife Conservation Society (WCS), Villa Oriente (Coop. Agrícola), Chulumani Café S.A, Taipiplaya ASOCAFE, a través de acuerdos de colaboración con el Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés (IIQ, UMSA), además de una muestra adquirida en el Mercado Rodríguez en la ciudad de La Paz..

La coleta de muestras se realizó entre 2015 y 2017 en las áreas productoras de café dentro el Departamento de La Paz mostradas en la Tabla 1. Una vez colectadas, las muestras se secaron a temperatura ambiente al exterior y se almacenaron. La empresa Munaipata Café de Altura realiza el secado al abrigo de la luz en tinglados techados. Munaipata Café de Altura y de la WCS proporcionaron muestras frescas provenientes del pelado de las cerezas.

La identificación de los tipos de variedades de las muestras y los lugares de colecta estuvo a cargo de las empresas (Tabla 1). El secado a temperatura ambiente en las condiciones adecuadas en el laboratorio se prolongó por un mes. Las muestras fueron trituradas manualmente para su extracción sólido-líquido.

### Extracción

#### Obtención de Extractos Hidroalcohólicos (EHA)

110 g de cada muestra fueron macerados en etanol-agua 80:20 en la relación masa/volumen de 1:8 por 24 horas a temperatura ambiente. Se filtró por gravedad Whatman #4 y se concentró a presión reducida en rotavapor hasta eliminación del etanol del solvente. El extracto acuoso remanente fue liofilizado por 72 horas, se calculó el rendimiento de extracto respecto del material de partida seco.

#### Obtención de Extractos Ricos en Compuestos Fenólicos (ERCF) y Extractos Ricos en Cafeína (ERC)

Cada EHA liofilizado fue disuelto en agua y extraído contra diclorometano (X3) en embudo de separación. La cafeína pasa a la fase orgánica, rotaevaporada posteriormente dio el ERC de cada muestra. La fase acuosa fue extraída contra acetato de etilo/metanol (98:2) (X3). La fase orgánica fue rotaevaporada para dar el ERCF. Cada uno de estos pasos fue monitoreado cuantificando el AP, ACG y la CAF por HPLC-DAD, con patrón externo.



### Análisis por HPLC

Para la cuantificación de ácido protocatéquico (AP), cafeína (CAF) y ácido clorogénico (ACG), se utilizó un equipo HPLC Agilent 1100 series acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD (G1315B) Agilent. La columna utilizada fue una Agilent Technologies EclipsePlus C-18 (4.6×250mm×5µm) con una pre-columna de 0.5 µm. El compartimiento de la columna fue calentado a 30 °C. Los solventes utilizados fueron acetonitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich), ácido fórmico al 85% (Merck) y agua Ultrapurificada a 18.3 M de resistencia, la cual fue filtrada con papel filtro de 0.45 µm en un sistema de filtración, Sartorius Stedim Biotech, antes de su uso.

### Patrones

Como patrones se utilizaron, un patrón comercial del ácido 5-O-cafeoilquinico (Sigma-Aldrich), que es el ácido clorogénico más común en café [25], y compuestos aislados e identificados, de cascara de café, como ácido protocatéquico y cafeína, de acuerdo al proceso que se muestra a continuación

### Aislamiento e identificación de ácido protocatéquico (AP)

Se pesaron 2 g de ERCF obtenido de la variedad catuaí, y se disolvieron en MeOH, se filtró en membrana PTFE especial de 0.45µm para separar algunas impurezas. Después de este proceso se obtuvo 1,021 g del extracto tratado, con los que se realizó una columna Sephadex LH-20 obteniéndose en las fracciones intermedias una mayor concentración de ácido protocatéquico, estas fracciones se unieron y se cromatografiaron en una columna abierta de Silicagel 60, obteniéndose finalmente 38,6 mg de ácido protocatéquico, que fue identificado mediante análisis de espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y comparación con datos bibliográficos [26].

### Aislamiento e identificación de cafeína (CAF)

Se pesaron 3 g de ERC obtenido de la variedad típica, y se disolvieron en MeOH, se filtró en membrana PTFE especial de 0.45µm para separar algunas impurezas, después de este proceso se obtuvo 1,256 g del extracto tratado, que se sembró en una columna Sephadex LH-20 obteniéndose en las fracciones intermedias cafeína que luego fue cristalizada obteniéndose 493,3 mg de cristales, que fueron analizados mediante espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C identificándose la estructura de la cafeína, que luego fue confirmada por comparación con datos bibliográficos [27]

### Datos de RMN de los compuestos aislados

#### Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido protocatéquico (AP)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) 7.32 (1H, d, J=1.8 Hz, H-2), 7.28 (1H, dd, J= 8.2, 1.8 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, J= 8.2 Hz, H-5); <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) 115.6 (C-5), 117.0 (C-2), 122.1(C-1), 122.3 (C-6), 145.3 (C-3), 150.4 (C-4), 167.8 (C-1'). UV <sub>max</sub> 254 nm (cm<sup>-1</sup>)

#### 1,3,7-Trimetilxantina, cafeína (CAF)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) 7.71 (1H, s, H-4), 3.71 (3H, s, H-6), 3.22 (3H, s, H-7), 3.05 (3H, s, H-8); <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) 115.6 (C-5), 117.0 (C-2), 122.1(C-1), 122.3 (C-6), 145.3 (C-3), 150.4 (C-4), 167.8 (C-1'). UV <sub>max</sub> 274 nm (cm<sup>-1</sup>)

### Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración con cada patrón de AP, ACG y CAF. Se prepararon soluciones de AP a 25, 50, 75, 100, 125 y 150 ppm, CAF a 15, 25, 50, 75, 100 y 125 ppm y de ACG a 5, 10, 15, 10 y 25 ppm, con estas concentraciones filtradas en membrana PTFE especial de 0.45µm, se procedió a su medición por HPLC, a la longitud de onda máxima que absorbe cada compuesto: 254 nm para el AP (tiempo de retención 4,5 min), 274 nm para la CAF (tiempo de retención 5,5 min) y 326 nm para el ACG (tiempo de retención 4,9 min), (Figura 2 y Figura 3). Con la relación de alturas de la señal de cada compuesto Vs la relación de sus concentraciones, obtenemos la curva de





calibración para cada compuesto, hallando sus ecuaciones de la regresión lineal y sus coeficientes de correlación (Tabla 5).

**Tabla 5.** Ecuación de la regresión lineal y determinación de los coeficientes de detección de AP, Cafeína y ACG.

Estándar	Ecuación de regresión lineal	Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )
Ácido ácido protocatéuico	y= 9,43x + 15,0	0,999
Cafeína	y= 7,36x + 10,6	0,998
Ácido 5-O-cafeoilquínico	y= 4,31x + 0,02	0,999

Para la cuantificación de ácido protocatéuico, cafeína y ácido clorogénico, se procedió a disolver cada uno de los extractos en agua ultrapurificada a 18.3 M de resistencia a una concentración determinada, filtrándolo previamente a la inyección de cada muestra, en membrana PTFE especiales de 0.45µm, para el análisis por HPLC.

El volumen de inyección de las muestras fue de 25 µL a un caudal de 1,0 ml/min. La fase móvil fue un sistema de disolvente binario que consiste en (A) 0.5% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado fue 43% B a 0 min, 57% B después de 20 minutos y 100% B después de 22 min hasta los 25 minutos. La absorbancia UV del eluato, se registró utilizando un detector de arreglo de diodos múltiple. Las señales del AP, CAF y ACG fueron determinadas en el cromatograma a 254, 274 y 326 nm, respectivamente, a los  $t_R$  antes señalados y la cantidad de cada compuesto fue determinada utilizando las curvas de calibración descritas. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado reportándose el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

#### Estadística

El límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) se calcularon sobre la base de la desviación estándar de la regresión y la pendiente obtenida de la ecuación lineal, empleando las siguientes ecuaciones:  $LOD = 3.3 \times (SD / \text{pendiente "b"})$  y  $LOQ = 10 \times (SD / \text{pendiente "b"})$ ; donde SD es la desviación estándar del intercepto de y.

#### RECONOCIMIENTOS

Los investigadores agradecen a los proyectos “Productos fitoterapéuticos y cosmeceúticos a partir de residuos agroindustriales de café y maní” y “Biomoléculas de interés medicinal e industrial anti-cáncer” financiados por fondos ASDI. Así como al proyecto “Bases científicas para el desarrollo de productos naturales con valor agregado a partir de residuos de café y maní” financiado por fondos IDH. Así mismo, agradecen al Instituto de Investigaciones Químicas de la UMSA, por el apoyo en infraestructura, carga horaria de investigadores y equipos para la realización del presente trabajo.

#### REFERENCIAS

1. Parra-Huertas, R.A. **2010**, Microencapsulación de Alimentos, *Rev. Fac. Nal. Agr.*, 63, 5669-5684.
2. <http://www.enlace.comunicacion.gob.bo/index.php/2017/12/16/caranavi-capital-cafetalera-de-bolivia>, access date 10/10/2017.
3. Braham, J., Bressani, R. Coffee pulp: Composition, Technology, and Utilization, **1979**, Ottawa., pp.5-10.
4. Heeger, A., Kosi ska-Cagnazzo, A., Cantergiani, E. and Andlauer, W. **2017**, Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage, *Food Chemistry*, 221, 969-975.
5. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella R. **2007**, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann Ist Super Sanita*, 43(4), 348-361.
6. Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., et al. **2007**, Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glycosides. *J Nutr*, 137(9), 2043-2048.
7. Semaming, Y., Pannengetch, P., Chattipakorn, S. and Chattipakorn, N. **2015**, Pharmacological Properties of Protocatechuic Acid and its Potential Roles as Complementary Medicine, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/593902>.
8. Kakkar, S., Bais, S. **2014**, A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential, *ISRN Pharmacology*, doi: 10.1155/2014/952943.
9. Aerts, R., Baumann, T. **1994**, Distribution and utilization of chlorogenic acid in Coffea seedlings, *Journal of Experimental Botany*, 45(4), 497-503.



10. Humphrey, C. J., Macrae, R. **1987**, Determination of chlorogenic acid in instant coffee using derivative spectrophotometry and its application to the characterization of instant coffee/chicory mixtures, In: Colloque scientifique international sur le café. Montreux (Suiza), Juin 29 - Juillet 3. ASIC, 179-186.
11. Moreira, R. F., Trugo, L. C., De María, C. A., Matos, A. G., Santos S. M., Leite J. M. **2001**, Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(1), 95-99.
12. Amorim, H. V., Malavolta, E., Teixeira, A., Cruz, V. F., Melo, M., Guércio, M. A., Fossa, E., Breviglieri, O., Ferrari, S. E., Silva, D. M, In: Colloque scientifique international sur le café, **1973**, Colombia, Bogotá Juin 4-9. ASIC, 113-127.
13. Morishita, H., Ohnishi, M. **2001**, Chlorogenic acids, In: Rahman A-U (ed), *Studies in natural products chemistry*, 25, 919-953.
14. Daglia, M., Tarsi, R., Papetti, A., Grisoli, P., Dacarro, C., Pruzzo, C. and Gazzani, G. **2002**, Antiadhesive Effect of Green and Roasted Coffee on Streptococcus mutans Adhesive Properties on Saliva-Coated Hydroxyapatite Beads, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1225-1229.
15. Clifford, M. N., Knight, S., Surucu, B., Kuhnert, N. **2006**, Characterization by LC-MS n of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 1957-1969.
16. Sawynok, J., Methylxanthines and pain, In Methylxanthines, Handb Exp Pharmacol, Springer **2011**, Berlin, Heidelberg, pp. 311-329.
17. Daly, J. **2007**, Caffeine analogs: biomedical impact, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2153-2169.
18. Ribeiro, J., Sebastião, A. **2010**, Caffeine and Adenosine, *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s1), S3-S15.
19. Davis, J., Green, J. **2009**, Caffeine and Anaerobic Performance, *Sports Medicine*, 39(10), 813-832.
20. Carrillo, J., Benitez, J. **2000**, Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions Between Dietary Caffeine and Medications, *Clinical Pharmacokinetics*, 39(2), 127-153.
21. Trandafir, I., Nour, V., Ionica, M. E. **2013**, Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(1), 87.
22. Clifford, M. N., Ramirez-Martinez, J. R. **1991**, Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp, *Food Chemistry*, 40(1), 35-42.
23. Janissen, B., Huynh, T. **2018**, Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review, *Resources, Conservation and Recycling*, 128, 110-117.
24. Clifford, M. N., Knight, S., Surucu, B., Kuhnert, N. **2006**, Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 1957-1969.
25. Gotteland, M., De Pablo, S. **2007**, Algunas verdades sobre el café, *Revista chilena de nutrición*, 34(2), 105-115.
26. Gural, M., Mitra, P., Ghosh, T., Gupta, S., Basu, B., Mitra, P. K. **2013**, 3, 4-dihydroxybenzoic acid Isolated from the Leaves of *Ageratum conyzoides* L, *Eur. J. Biotechnol. Biosci*, 1, 25-28.
27. Sitkowski, J., Stefaniak, L., Nicol, L., Martin, M. L., Martin, G. J., Webb, G. A. **1995**, Complete assignments of the <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectra of caffeine, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(5), 839-841.