



COMPUESTOS FENÓLICOS, MELANOIDINAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CAFE VERDE Y PROCESADO DE LAS ESPECIES *Coffea arabica* Y *Coffea canephora*

PHENOLIC COMPOUNDS, MELANOIDINS, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GREEN COFFEE BEAN AND PROCESSED COFFEE FROM *Coffea arabica* AND *Coffea canephora* SPECIES

Lucía Margarita Pérez-Hernández¹, Karla Chávez-Quiroz², Luis Ángel Medina-Juárez³ y Nohemí Gámez Meza^{*3}

¹Posgrado en Biociencias de la Universidad de Sonora, Blvd. Colosio s/n, entre Sahuaripa y Reforma, Colonia Centro. C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México | ²Café del Pacífico S.A. de C.V. Investigación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.

| ³Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Blvd. Colosio s/n, entre Sahuaripa y Reforma Colonia Centro. C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

El tostado del café podría ocasionar la disminución de actividad antioxidante, ya que pueden degradarse compuestos con esta actividad, como los fenoles. Sin embargo, las temperaturas altas pueden promover la formación de compuestos con actividad antioxidante como los productos de la reacción de Maillard (melanoidinas). En este estudio se identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos y se determinó el contenido de melanoidinas en dos cafés verdes y sus procesados: café caracolillo de grano Arábica caracol (*Coffea arabica*) y café soluble de grano Robusta (*Coffea canephora*, sin. *Coffea robusta*). La actividad antioxidante de los diferentes cafés se determinó por dos métodos. Los cafés procesados presentaron una actividad antioxidante mayor que sus respectivos granos verdes de origen. En el caso del café caracolillo, se observó una disminución de los compuestos fenólicos determinados por HPLC. Sin embargo, esto no afectó la actividad antioxidante total, probablemente al contenido alto de melanoidinas.

Palabras clave: Actividad antioxidante, fenoles, melanoidinas, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*

ABSTRACT

Coffee roasting could trigger the decrease of antioxidant activity, due to the degradation of phenols. However, high temperatures may stimulate the formation of other compounds that possess antioxidant activity, such as melanoidins generated via the Maillard reactions. In this study, phenols were quantified and identified, and melanoidin content was also determined in two coffees: caracolillo coffee from green caracoli bean (*Coffea arabica*) and instant coffee from green Robusta coffee bean (*Coffea canephora*, sin. *Coffea robusta*). Antioxidant activity was determined by two assays. Processed coffees presented a higher antioxidant activity than their beans from origin. A decrease of phenolic compounds, determined by HPLC, was observed in caracolillo coffee. However, this did not affect its total antioxidant activity, this could be due to high content of melanoidins.

Keywords: Antioxidant activity, phenols, melanoidins, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*

INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas y populares de todo el planeta. Estudios recientes indican que algunos constituyentes del café, como la cafeína, los ácidos fenólicos (derivados del ácido clorogénico), los compuestos formados durante la reacción de Maillard (melanoidinas) y ligninas, poseen propiedades antioxidantes (Yanagimoto *et al.*, 2004; Fujioka y Shibamoto, 2006; van Dam, 2006; Votavova *et al.*, 2009). Los antioxidantes evitan que se produzcan daños tisulares por radicales libres, actuando al reducir su formación o eliminarlos una vez originados. De esta forma, se pueden reducir las enfermedades asociadas al estrés oxidativo como la diabetes, la neurodegeneración, las enfermedades hepáticas, cardiovasculares y cáncer (Penckofer *et al.*, 2002; Gandhi y Wood, 2005; Albano, 2006; Butterfield *et al.*, 2006; Davidson y Duchon, 2007; Hwang y Bowen, 2007). En individuos adultos, las bebidas derivadas del café, constituyen el 64% de la ingesta total de antioxidantes. A pesar de que existen otros alimentos con una cantidad mayor de antioxidantes que el café, la frecuencia y volumen del consumo del mismo, lo convierten en la fuente dietaria principal de antioxidantes (Pulido *et al.*, 2003; Svilaas *et al.*, 2004).

Durante el procesamiento del café, el tostado afecta marcadamente su composición, lo que puede reducir la actividad antioxidante, debido a la degradación del ácido clorogénico y otros compuestos fenólicos. Sin embargo, se ha encontrado que la actividad antioxidante del café tostado se puede mantener debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard (Budryn *et al.*, 2009). Durante la última etapa de la reacción de Maillard, se forman compuestos poliméricos de color café llamadas melanoidinas. Éstas influyen en el color, sabor y textura de los alimentos sometidos a temperaturas altas. Entre algunas actividades biológicas importantes de las melanoidinas se encuentran la actividad antioxidante y la quelante (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Las dos especies de café más importantes mundialmente son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (sinónimo *Coffea robusta*) (www.ico.org, 2011). Estas dos especies no solo se procesan en el Estado de Sonora, sino que se consumen regionalmente, y comercializan en la República Mexicana. El café soluble de *Coffea robusta* se exporta a Holanda. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar

*Autor para correspondencia: Nohemí Gámez Meza
Correo electrónico: ngamez@guayacan.uson.mx.

Recibido: 9 de octubre de 2012

Aceptado: 21 de diciembre de 2012

el contenido de compuestos antioxidantes y la actividad antioxidante de bebidas de café procesado en el Estado de Sonora, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se analizaron dos especies: *Coffea arabica* (grano tipo Caracol) verde y tostado con azúcar (café caracolillo); y *Coffea canephora* (sin. *Coffea robusta*) verde y soluble. La elaboración del café caracolillo implica la adición de azúcar antes de llevar a cabo el tostado. La elaboración del café soluble consiste de un proceso de deshidratación (evaporación o liofilización). Las muestras de café verde y procesado fueron del mismo lote y cosechados en Huatusco, Veracruz, Mexico (latitud:19°08'48"; longitud: 096°57'00"; altitud: 1,344 m). Todas las muestras fueron proporcionadas por Café del Pacífico S.A. de C.V. (Caffenio, Hermosillo, Sonora, México).

Preparación de las Muestras de Café

El grano se pulverizó mecánicamente a un tamaño de partícula de 20 mesh (1 mm) en un molino Thomas Wiley Laboratory Mill, Modelo 4 (Arthur N. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA). Los polvos de café verde y procesado se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta el momento de su análisis

Extracción de los Compuestos Fenólicos

Se pesaron 0.2 g de muestra (café verde y procesado) y fueron homogenizados con 20 mL de agua a 75°C (Budryn *et al.*, 2009). Posteriormente, el homogenizado fue sometido a movimientos ultrasónicos (Sonicador marca Branson 1510) por 30 min y centrifugado a 17,900 g (IEC L31 Thermo electrón) a temperatura ambiente por 15 min. La extracción acuosa se repitió dos veces para asegurar la máxima extracción de los compuestos. Los sobrenadantes fueron mezclados y filtrados en papel Whatman No. 2. Los extractos acuosos fueron congelados a -20°C hasta su análisis (Chitindingu *et al.*, 2006).

Determinación de Fenoles Totales

Las determinaciones se realizaron espectrofotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se utilizó ácido clorogénico como estándar (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). El contenido de fenoles totales fue expresado en mg de ácido clorogénico/g de peso de la muestra.

Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Cafeína por HPLC

El procedimiento para la identificación de los compuestos fenólicos y cafeína se realizó de acuerdo al método descrito por Cantos *et al.* (2000). Se introdujeron 20 µL de extracto acuoso a una columna SupelcosilTM LC18 (30 x 0.4 cm x 5 mm tamaño de partícula, Supelco, Bellefonte, PA, USA),

en un equipo de cromatografía HPLC (Varian, modelo ProStar 230), equipado con un detector de luz ultravioleta (modelo 9050, Varian, Palo Alto, CA, USA). La identificación de los compuestos fenólicos (ácido clorogénico, ácido ferúlico y rutina) se llevó a cabo comparándolos con los tiempos de retención de sus estándares correspondientes (Figura 1). Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración (0-0.2 mg/mL) para cada uno de los compuestos fenólicos identificados.

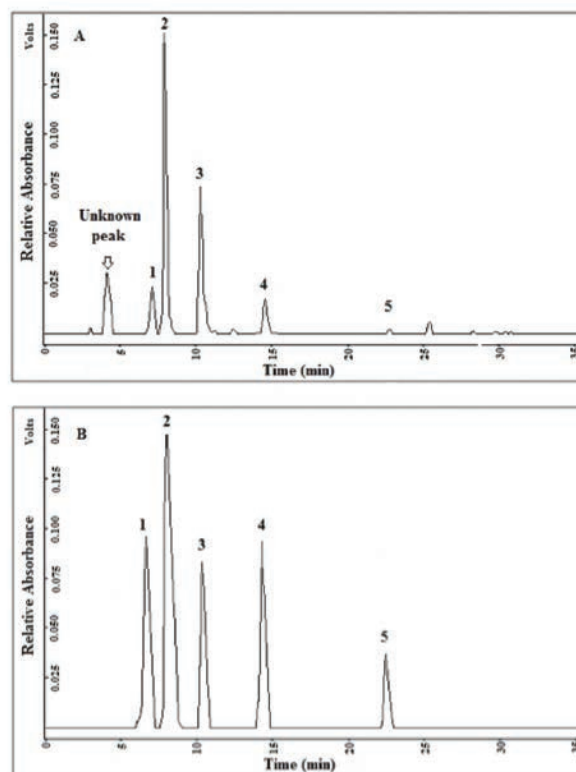


Figura 1. (A) Cromatograma de café verde (*Coffea arabica*) a 280 nm. (B) Cromatograma de estándares de referencia a 280 nm. Los picos corresponden a ácido cafeico (1), ácido clorogénico (2), cafeína (3), ácido ferúlico (4) y rutina (5)

Figure 1. (A) Chromatogram of green Arabica coffee beans (*Coffea arabica*) at 280 nm. (B) Chromatogram of reference standards at 280 nm. The peaks correspond to caffeic acid (1), chlorogenic acid (2), caffeine (3), ferulic acid (4), and rutin (5)

Cuantificación de Melanoidinas

Las melanoidinas fueron cuantificadas espectrofotométricamente. Primeramente, se estableció la longitud de onda de máxima absorción (420 nm) para las melanoidinas mediante un barrido espectral en las regiones del UV-VIS (Del Castillo *et al.*, 2002). Debido a que la estructura molecular de las melanoidinas no se ha determinado hasta la fecha, no existe un estándar de melanoidinas disponible. Por lo tanto, las curvas de absorción y de calibración fueron elaboradas utilizando un extracto de café tostado como fuente de melanoidinas. Previamente, se preparó una dilución 2:1 del extracto de café tostado, la cual fue considerada como una

solución madre de melanoidinas. Posteriormente, se elaboraron 5 diluciones seriadas de la solución madre. Después de determinar la absorbancia de cada dilución, se determinó la concentración de las melanoidinas con la fórmula de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A}{ab}$$

donde "C" es la concentración de melanoidinas, "A" es la absorbancia de la dilución, "b" es la longitud de la celda del espectrofotómetro (1 cm) y "a" es el coeficiente de extinción específico de las melanoidinas expresado en L/g x cm. El valor de "a" utilizado en este estudio fue de 1.1289 L g⁻¹ cm⁻¹ (Tagliacruz *et al.*, 2010). La curva de calibración fue elaborada al graficar los valores de absorbancia obtenidos para cada dilución contra la concentración de las mismas. Para determinar la concentración de melanoidinas en las muestras, primeramente se preparó una dilución 1:9 de cada extracto. El contenido de melanoidinas fue expresado como g de melanoidinas/ 100 g de muestra.

Determinación de la Actividad Antioxidante Total por el Método del Radical 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺)

El método se llevó a cabo según lo descrito por Kusoski *et al.*, (2005). Este método mide la capacidad relativa de los antioxidantes para neutralizar al radical ABTS⁺ generado en fase acuosa y se compara con un estándar de Trolox (análogo de la vitamina E que es soluble en agua) (Ozgen *et al.*, 2006). Se leyó la absorbancia a 754 nm al inicio (Abs_i) y cada minuto hasta los 7 minutos de reacción (Abs_t). El diferencial de absorbancia (abs_i - abs_t) se transformó a porcentaje de inhibición y se calculó la actividad antioxidante en milimoles equivalentes Trolox (mmoles ET) /gramo peso fresco (g pf), mediante una curva de calibración (0-0.25 mg/mL) de Trolox (análogo soluble de la vitamina E).

Determinación de la Actividad Antioxidante Total por el Método del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[·])

El método se realizó de acuerdo con el método descrito por Materska y Perucka, (2005). El DPPH[·] es un radical libre estable cuya absorbancia se determina a 515 nm. La absorbancia disminuye cuando el radical es reducido por un antioxidante (Ozgen *et al.*, 2006). Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS (Varian, modelo Cary 100). Los resultados fueron expresados como μmol equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por un análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de LSD (P<0,05). Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico Sigmasat 3.5 (Systat Software Inc. Point Richmond, CA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles Totales

Los contenidos de fenoles totales entre el café procesado caracolillo y su café de origen (caracol verde) no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Tabla 1). Como se mencionará más adelante, el café caracolillo mostró una cantidad considerable de melanoidinas. Se ha encontrado que las melanoidinas, al igual que los compuestos fenólicos, reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Perez-Martinez *et al.*, 2010). En el presente estudio, el porcentaje de fenoles totales encontrados para el café caracolillo fue de 65.56 mg/g (Tabla 1). Afify *et al.* (2011) reportaron contenidos de compuestos fenólicos menores (18.7 mg/g).

El contenido de fenoles totales encontrados para café soluble fue de 14.08%. Vignoli *et al.*, (2011) reportaron valores de fenoles totales en café soluble que oscilaron entre 14.58% a 15.14% de la materia seca total. La cantidad de compuestos

Tabla 1. Fenoles totales, actividad antioxidante y concentración de melanoidinas encontrados en café verde y procesado
Table 1. Total phenols, antioxidant activity, and melanoidins concentration found in green and processed coffee

Muestra	Fenoles Totales (mg/g)	ABTS ⁺ (μmoles eq. trolox/g)	DPPH [·] (μmoles eq. trolox/g)	Melanoidinas (g/100 g)
Caracol verde (Arabica)	65.19 ± 3.74 ^b	209.29 ± 6.72 ^a	813.51 ± 2.83 ^a	4.49 ± 0.57 ^a
Caracolillo	63.56 ± 2.03 ^b	238.71 ± 8.06 ^b	938.58 ± 57.27 ^b	30.52 ± 2.26 ^c
Robusta verde	56.73 ± 2.82 ^a	196.48 ± 4.94 ^a	801.15 ± 18.70 ^a	5.55 ± 0.10 ^b
Robusta Soluble	140.78 ± 3.59 ^c	681.72 ± 37.81 ^c	1921.82 ± 100.33 ^c	67.61 ± 0.21 ^d

Los valores son el promedio y desviación estándar de triplicados. Los valores de cada columna con diferentes letras (a-d) presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Values are mean ± standard deviation of triplicates. The values in each column with different letters (a-d) show a significant difference ($p < 0.05$).

fenólicos encontrados en el café soluble fue tres veces mayor ($p < 0.05$) que el encontrado en el grano de café verde de la misma especie (Tabla 1). Este aumento se debe al proceso de elaboración del café soluble, el cual consiste en un proceso de deshidratación (evaporación o liofilización), en el cual se concentran los componentes solubles, incluyendo a los fenoles (Mussatto *et. al.*, 2011).

Contenido de Fenoles por HPLC

La cantidad de ácido clorogénico, ácido ferúlico y rutina disminuyó durante el proceso de café caracol (grano verde), debido a la degradación térmica durante el tostado (Tabla 2). Budryn *et. al.*, (2009) reportaron la misma tendencia para el ácido clorogénico de la especie Arábica. El ácido clorogénico, no sólo disminuye por la temperatura de tostado (280°C), sino porque también participa como sustrato en la formación de melanoidinas (Alves *et. al.*, 2010).

En el caso de la cafeína no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el contenido de café *Coffea arabica* verde y procesado (Tabla 2), es decir el proceso de tostado (280°C) no afectó el nivel de cafeína. Casal *et. al.* (2000), reportaron valores similares de cafeína para cafés Arábica tostados y una ligera reducción debido al tostado.

La cantidad de ácido clorogénico, ácido cafeico y cafeína en los cafés *Coffea robusta* fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en las muestras de café soluble que en la de café verde sin procesar (Tabla 2). Esto es debido al efecto que tiene el proceso de secado en la elaboración del café soluble sobre la concentración de los compuestos. Dupas *et. al.* (2006), reportaron una concentración de ácido clorogénico menor al reportado en el presente estudio (8.75 - 14.21 mg/g). Además, en el mismo estudio también se encontraron cantidades menores de ácido cafeico (13.93 - 27.41 mg/g) y ácido ferúlico (1.28 - 1.98 mg/g). Sin embargo, se reportó la presencia de ácido *p*-coumárico, el cual no fue identificado en el café soluble analizado en el presente estudio. Según Materska y Perucka, (2005), los compuestos fenólicos producidos por las plantas son el resultado de la adaptación a las

condiciones de estrés biótico y abiótico (infección, heridas, estrés por agua, estrés por frío, elevada luz visible). Por lo tanto, las diferencias en la composición fenólica y la actividad antioxidante de los cafés de diferentes orígenes se puede deber a los factores ambientales a los que esta sometida la planta de café.

Contenido de Melanoidinas

Durante el tostado del café se llevan a cabo diversos cambios físicos y químicos, incluyendo el cambio de color del grano de verde a café y la formación de productos nuevos como las melanoidinas. Muchos de estos cambios se deben a la reacción de Maillard (Del Castillo *et. al.*, 2002). En general, la cantidad de melanoidinas que se encontraron en todos los cafés procesados analizados en el presente estudio fue superior ($p < 0.05$) a la encontrada en los granos sin procesar (granos de café verdes) como se puede observar en la Tabla 1. Bekedam *et. al.* (2008) encontraron alrededor de 25 g de melanoidinas/100 g de café tostado sin azúcar. El café caracolillo presentó una concentración de melanoidinas mayor que lo reportado por Bekedam *et. al.* (2008) lo cual podría deberse principalmente a la adición de azúcar durante la elaboración del mismo (López-Galilea *et. al.*, 2007). El café soluble no solo presentó una concentración de melanoidinas mayor en comparación con el café verde Robusta, sino que también presentó un contenido de melanoidinas mayor que todos los cafés analizados en este estudio ($p < 0.05$).

Actividad Antioxidante Total (Método ABTS⁺)

Se encontraron diferencias significativas entre la actividad antioxidante del grano verde caracol y el café caracolillo (Tabla 1). El incremento de la capacidad antioxidante del café después del tostado se puede deber a que a pesar de que se pierden compuestos con capacidad antioxidante durante el proceso, la capacidad antioxidante de las infusiones de café se pueden mantener o incrementar debido a la formación de nuevos compuestos con actividad antioxidante, como los

Tabla 2. Cuantificación de compuestos fenólicos y cafeína en las muestras de café (mg/g)

Table 2. Quantification of phenolic compounds and caffeine in coffee samples (mg/g)

Muestras	Ácido Clorogénico	Ácido Cafeico	Ácido Ferúlico	Rutina	Cafeína
Caracol verde (Arabica)	174.39 ± 16.5 ^d	6.65 ± 0.80 ^b	5.17 ± 0.50 ^b	1.62 ± 0.14 ^b	15.64 ± 0.72 ^a
Caracolillo	43.86 ± 1.80 ^a	7.01 ± 0.22 ^b	1.66 ± 0.03 ^a	n/d	15.21 ± 0.39 ^a
Robusta verde	90.81 ± 4.22 ^b	3.71 ± 0.08 ^a	6.18 ± 0.16 ^c	1.15 ± 0.01 ^a	15.68 ± 0.10 ^a
Soluble	143.99 ± 9.92 ^c	33.77 ± 2.74 ^c	7.28 ± 0.36 ^d	n/d	55.19 ± 2.30 ^b

Los valores son el promedio y desviación estándar de triplicados. Los valores de cada columna con diferentes letras (a-d) presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Values are mean ± standard deviation of triplicates. The values in each column with different letters (a–e) show a significant difference ($p < 0.05$).

productos de la reacción de Maillard (Del Castillo *et al.*, 2002; Votavova *et al.*, 2009). La actividad antioxidante por la estabilización del radical ABTS⁺ para el café caracolillo fue menor (238.71 μmol equivalentes Trolox/g) que los observados por Pérez-Martínez *et al.*, (2010) (296-445 μmol equivalentes Trolox/g).

En el caso de café soluble éste presentó los valores de actividad antioxidante mas altos ($p < 0.05$) (Tabla 1). Sin embargo, Vignoli *et al.* (2011), reportaron valores de ABTS aún mayores (1,110.27 y 1,310.03 μmol equivalentes trolox/g) que los encontrados en el presente estudio.

Las diferencias de actividad antioxidante entre cafés, se pueden deber a varios factores como el tipo de café, las diferentes condiciones geográficas y climatológicas en donde crecen las plantas (Materska y Peruka, 2005).

Actividad Antioxidante Total (Método DPPH)

El café caracolillo presentó una actividad antioxidante mayor ($p < 0.05$) que la de su grano de origen (caracol verde). La actividad antioxidante alta observada para dicho café se puede deber a que la adición de azúcar estimula la formación de melanoidinas, las cuales poseen actividad antioxidante (López-Galilea *et al.*, 2007).

En el caso de los cafés de la especie de Robusta, se observó que el café soluble presentó una actividad antioxidante significativamente mayor ($p < 0.05$) que la exhibida por el grano de café verde. Como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de elaboración del café soluble se concentran los compuestos solubles del café tostado, incluyendo aquellos que poseen actividad antioxidante, como los fenoles y las melanoidinas. Como resultado, la actividad antioxidante puede aumentar.

CONCLUSIONES

Los cafés procesados presentaron una actividad antioxidante mayor que sus respectivos granos verdes de origen. En el caso del café caracolillo, se observó una disminución de los principales compuestos fenólicos identificados. Sin embargo, esto no afectó la actividad antioxidante total, probablemente al contenido alto de melanoidinas. Es posible que la adición de azúcar al café caracol haya estimulado la formación de melanoidinas, mejorando así la actividad antioxidante. Por otro lado, durante la elaboración del café soluble, los fenoles, melanoidinas y cafeína se concentran significativamente, como consecuencia, la actividad antioxidante aumenta.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro sincero agradecimiento a Café del Pacífico por proveer las muestras analizadas en este estudio y a CONACYT por la beca otorgada.

REFERENCIAS

- Affy, A.M.R., Shalaby, E. A. y El-Beltagi, H. S. 2011. Antioxidant activity of aqueous extracts of different caffeine products. *Journal of Medicinal Plants Research*. 20:5071-5078.
- Albano, E. 2006. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65: 278–290.
- Alves, R.C., Costa, A. S.G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Nuñez, M.J. y Oliveira, B. 2010. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in expresso coffee: influence of technological factors *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 12221-12229.
- Bekedam, E.K., Schols, H.A., Caemmerer, B. Kroh, L.W. Van Boekel, M.A.J.S. y Smit, G. 2008. Electron Spin Resonance (ESR) Studies on the Formation of Roasting-Induced Antioxidative Structures in Coffee Brews at Different Degrees of Roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 4597–4604.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsddek, A., Zyzelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S. y Janda, B. 2009. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *European Food Research and Technology*. 228: 913–922.
- Butterfield, D.A., Perluigi, M. y Sultana, R. 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *European Journal of Pharmacology*. 545: 39–50.
- Cantos, E., García-Viguera, C., Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F.A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 4606–4612.
- Casal, S., Oliveira B. y Ferreira M.A. 2000. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*. 68: 481-485.
- Chitindingu, K., Ndhlala, A.R., Chapano, C., Benhyura, M. A. y Muchuweti, M. 2006. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (pigweed), *Brachiaria brizantha* (upright brachiaria) and *Panicum maximum* (guinea grass). *Journal of Food Biochemistry*. 31: 206–216.
- Davidson, S.M. y Duchon, M.R. 2007. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circulation Research*. 100: 1128–1141.
- Del Castillo, M.D., Ames, J.M. y Gordon, M.H. 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3698-3703.
- Dupas, C.J., Marsset-Baglieri, A.C., Ordonaud, C.S., Ducept, F.M.G. y Maillard, M.N. 2006. Coffee An-

- tioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *Journal of Food Science*. 71: S253–S258.
- Fujioka, K. y Shibamoto, T. 2006. Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 6054–6058.
- Gandhi, S. y Wood, N.W. 2005. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*. 14: 2749–2755.
- Hwang, E. S. y Bowen, P.E. 2007. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47: 27–50.
- Kuskoski, M.E., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Revista Brasileña Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 25, 726–732.
- López-Galilea, I., Paz de Peña, M. y Cid, C. 2007. Correlation of Selected Constituents with the Total Antioxidant Capacity of Coffee Beverages: Influence of the Brewing Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6110–6117.
- Materska, M. y Peruka, I. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1750–1756.
- Mussatto, S.I., Machado, E. M. S., Martins, S. y Teixeira, J.S. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technology*. 4:661–672.
- Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, J.R.A.Z., Scheerens, J.C., Miller, A.R. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1151–1157.
- Penckofer, S., Schwertz, D. y Florczak, K. 2002. Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 16: 68–85.
- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., Paz de Peña, M., Cid, C. y Kroh, L.W. 2010. Influence of Brewing Method and Acidity Regulators on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2958–2965.
- Pulido, R., Hernandez-Garcia, M. y Saura-Calixto, F. 2003. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57: 1275–1282.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144–158
- Svilaas A., Sakhi A.K., Andersen L.F., Svilaas, T.E.C., Ström E.C., Jacobs D.R. 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition*, 134: 562–567.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E. y Conte, A. 2010. Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2513–2519.
- Van Dam, R.M. 2006. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 16: 69–77.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G. y Benassi, M.T. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidines in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*. 124: 863–868.
- Votavova, L., Voldrich, M., Sevcik, R., Cizkova, H., Mlejnecka, J., Stolar, M. y Fleisman, T. 2009. Changes on the antioxidant capacity of robusta coffee during roasting. *Czech Journal of Food Science*. 27: S49–S52.
- Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, K.G. y Shibamoto, T. 2004. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 592–596.