

Potencial antioxidante del extracto de hoja de *Coffea arabica* sobre la lipoperoxidación y oxidación proteica en un modelo de músculo bovino

Antioxidant potential of *Coffea arabica* leaf extract on lipoperoxidation and protein oxidation in a bovine muscle model

Johan Alexander Villada Ramos^{1,2}, Johanny Aguillón Osma², Nelsy Loango Chamorro^{1,2}

¹. Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación en Bioquímica de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

². Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Educación (GICBE), Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Johan Villada: <https://orcid.org/0000-0001-5541-556X>

Johanny Aguillón: <https://orcid.org/0000-0002-1041-1140>

Nelsy Loango: <https://orcid.org/0000-0002-4777-3647>

Recibido: Agosto 1 de 2024

Aceptado: Noviembre 5 de 2024

*Correspondencia del autor: Johan Alexander Villada Ramos

E-mail: javilladar@uniquindio.edu.co

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i36.313>

Resumen

La calidad de los alimentos es crucial, especialmente en la industria cárnica, donde la oxidación de lípidos y proteínas afecta la calidad sensorial y nutricional. Este estudio evaluó el potencial antioxidante de los extractos metanólico (EM) e hidroalcohólico (EHA) de hojas de *Coffea arabica* en músculo bovino para mitigar la oxidación lipídica y proteica. Se empleó el método de extracción por maceración, se evaluaron los contenidos de fenoles y flavonoides, y la inhibición del radical DPPH. Los extractos se aplicaron a muestras de músculo bovino, incubadas con un agente oxidante (AAPH), y se evaluaron las formaciones de TBARS, carbonilos proteicos y las modificaciones de proteínas mediante SDS-PAGE. Los resultados mostraron que el EM presenta una mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, así como una mejor capacidad antioxidante en comparación con el EHA, con un porcentaje de inhibición del DPPH de 70.4 % y una IC₅₀ de 630 µg/mL, frente a 64.2 % y 732 µg/mL del EHA. Además, el tratamiento con AAPH incrementó significativamente la formación de grupos carbonilo en un 152.5 %, mientras que el EM mostró un aumento del 42.5 % y el EHA del 62.5 %. En cuanto a la peroxidación lipídica, el EM redujo significativamente los niveles de TBARS en comparación con el AAPH, demostrando su capacidad para inhibir la oxidación. En conclusión, los extractos de *C. arabica* ofrecen una alternativa natural prometedora a los antioxidantes sintéticos, con una notable capacidad para proteger los productos cárnicos de la degradación oxidativa.

Palabras clave: Carbonilos, compuestos bioactivos, compuestos fenólicos, oxidación lipídica, TBARS.

Abstract

Food quality is crucial, particularly in the meat industry, where lipid and protein oxidation affect both sensory and nutritional quality. This study evaluated the antioxidant potential of methanolic (ME) and hydroalcoholic extracts (EHA) of *Coffea arabica* leaves in bovine muscle to mitigate lipid and protein oxidation. The maceration extraction method was employed, and the contents of phenolic compounds and flavonoids, as well as DPPH radical inhibition, were assessed. The extracts were applied to bovine muscle samples, which were incubated with an oxidizing agent (AAPH), and the formation of TBARS, protein carbonyls, and protein modifications were evaluated via SDS-PAGE. The results demonstrated that the ME contained a higher concentration of phenolic compounds and flavonoids, as well as superior antioxidant capacity, compared to the EHA, with a DPPH inhibition percentage of 70.4% and an IC_{50} of 630 $\mu\text{g/mL}$, compared to 64.2% and 732 $\mu\text{g/mL}$ for the hydroalcoholic extract. Furthermore, AAPH treatment significantly increased carbonyl group formation by 152.5%, while the ME showed an increase of 42.5% and the EHA an increase of 62.5%. Regarding lipid peroxidation, the ME significantly reduced TBARS levels compared to AAPH, demonstrating its ability to inhibit oxidation. In conclusion, *C. arabica* extracts offer a promising natural alternative to synthetic antioxidants, with significant potential to protect meat products from oxidative degradation.

Keywords: : Carbonyls, bioactive compounds, phenolic compounds, lipid oxidation, TBARS.

Introducción

La calidad de los alimentos es un aspecto crucial en la ciencia alimentaria debido a las múltiples reacciones químicas que ocurren durante el procesamiento, transporte y almacenamiento. Estas reacciones afectan a nutrientes clave, como lípidos y proteínas, que son particularmente susceptibles a la oxidación (1). Este proceso puede deteriorar las propiedades organolépticas, nutricionales y la seguridad de los alimentos. En productos cárnicos, como el músculo bovino, la oxidación de lípidos y proteínas es especialmente problemática debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados y proteínas, lo que resulta en una pérdida de calidad sensorial y nutricional durante el almacenamiento (2). Este fenómeno ha impulsado un notable crecimiento en la investigación científica, centrada en comprender y mitigar el impacto de la oxidación sobre la calidad alimentaria.

La oxidación de lípidos provoca la formación de compuestos secundarios como carbonilos, aldehídos insaturados y cetonas, que contribuyen a la inestabilidad del sistema alimentario (1,2). Estos compuestos no solo afectan negativamente las características sensoriales de los alimentos, como el sabor y el aroma, sino que también fomentan la oxidación de proteínas (3,4). Esta oxidación proteica puede llevar a la formación de aductos de Michael y bases de Schiff, resultado de la interacción de aldehídos reactivos productos de la oxidación lipídica con grupos nucleófilos en las proteínas. Estas modifi-

caciones alteran la estructura y función de las proteínas, con implicaciones que van desde la pérdida de calidad nutricional hasta la generación de productos potencialmente tóxicos como los antes mencionados aductos de Michael y bases de Schiff (5,6).

En la industria cárnica, se utilizan predominantemente antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol, la terbutilhidroquinona y el galato de propilo para frenar la peroxidación lipídica. Sin embargo, en los últimos años, ha surgido una creciente preocupación entre los consumidores respecto a los posibles efectos adversos de estos antioxidantes sintéticos (7,8). Esta inquietud, junto con una demanda creciente de antioxidantes naturales, especialmente aquellos de origen vegetal, han adquirido una relevancia significativa.

Los antioxidantes naturales, particularmente los derivados de fuentes vegetales, han demostrado ser efectivos en la mitigación de la oxidación lipídica y proteica en diversas matrices alimentarias (9–13). *Coffea arabica* L, conocida por su riqueza en compuestos fenólicos, presenta un potencial antioxidante que podría aprovecharse para proteger los alimentos contra la oxidación. Las hojas de *C. arabica* ofrecen una alternativa prometedora a las tradicionales matrices utilizadas en la preparación de bebidas, como las hojas de té y los granos de café molidos. Los extractos y/o infusiones hechas con hojas de café son ricas en compuestos fenólicos

con propiedades antioxidantes y contienen menos cafeína(14). Por ejemplo, en las hojas de café se han identificado varios compuestos fenólicos, incluyendo ácido cafeico, clorogénico, p-cumárico, ferúlico y sinápico, así como flavonoides como la rutina, quercetina, kaempferol e isoquercitrina (15) con propiedad antioxidantes (16). También, la mangiferina, presente en las hojas y frutos del café, es un compuesto fenólico con actividad antioxidante significativa (17,18).

En este contexto, el estudio evaluó el potencial antioxidante del extracto metanólico e hidroalcohólico de hojas de *C. arabica* en un modelo de músculo bovino, investigando cómo estos extractos protegen contra la degradación oxidativa de componentes lipídicos y proteicos para mejorar la preservación y seguridad nutricional de los productos cárnicos.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Material vegetal

Las hojas de *C. arabica* fueron recolectadas en el municipio de Córdoba con coordenadas geográficas 4°24'12.1"N 75°41'15.6"W, departamento del Quindío, Colombia, entre las 6:00 am y las 8:00 am, asegurando que el material vegetal estuviera completamente sano por inspección visual. Luego fueron transportadas en bolsas herméticas al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío para su procesamiento. Las hojas de café se secaron en horno a 40°C durante 96 horas y luego se trituraron antes del proceso de extracción. El polvo vegetal obtenido se almacenó a temperatura ambiente en bolsas herméticas aisladas de la luz para su posterior análisis.

2.1.2 Reactivos químicos y equipos

Ethanol (96%, v/v) (Tekkim, Bursa), methanol (96%, v/v) (Merck, Germany), Folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba, France), sodium carbonate (Isolab, Germany), sulfuric acid (Merck, Germany), gallic acid (Sigma-Aldrich, Germany), catechin (Sigma-Aldrich, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany), hydrochloric acid (HCl) (Sigma-Aldrich, Germany), sodium carbonate (Na₂CO₃) (Isolab, Germany), sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany), aluminum chloride (Merck, Germany), AAPH (clorhidrato de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)) (Sigma-Aldrich), ácido tiobarbitúrico(TBA) (Merck milipore), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich), were used in the analyses.

Precision balance (Mettler Toledo, XP205, Switzerland), distilled water system (Thermo Fisher Scientific, Milli-Q, United States), incubator (Sartorius, C25, Germany), ultrasonic bath (Branson, CPX3800H, United States), rotary evaporator (Heidolph, Hei-VAP Advantage, Germany), drying oven (Binder, FD115, Germany), vortex mixer (Eppendorf, MixMate, Germany), spectrophotometer (Shimadzu, UV-1800, Japan).

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de los extractos de *Coffea arabica*

Los extractos se obtuvieron mediante el método de maceración durante cuatro días. El polvo de la planta (100 g) se mezcló de manera independiente con 500 mL de metanol al 96% (para obtener el extracto metanólico, ME) y con 500 mL de metanol al 50% (v/v) (para obtener el extracto hidroalcohólico, EHA). Posteriormente, se separaron las clorofilas de los extractos mediante extracción líquido-líquido con una mezcla de etanol-agua (1:7)(19) y se filtraron utilizando un filtro con tamaño de poro de 11 µm. El metanol se evaporó a presión reducida (60 mbar) y a una temperatura inferior a 30°C utilizando un evaporador rotatorio. La suspensión líquida resultante se secó en una incubadora a 30°C. Los extractos de hojas de *Coffea arabica* se almacenaron protegidos de la luz a -20 °C hasta su uso. El rendimiento de extracción se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de extracción} = (W1/W2) * 100$$

Donde W1: extracto seco después de la extracción, W2: peso del polvo de la planta.

2.2.2 Contenido fenólico total (TPC)

Se determinó mediante el método del reactivo de Folin-Ciocalteu descrito por Muñoz *et al.*,(20) con algunas modificaciones. Se tomaron 50 µL del extracto y se añadieron 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na₂CO₃. Posteriormente, la mezcla se incubó a 40°C durante 15 minutos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 765 nm, utilizando una solución de Na₂CO₃ como blanco. Se empleó ácido gálico como estándar para elaborar la curva de calibración. El contenido total de fenoles se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg AG/g ES).

2.2.3 Contenido total de flavonoides (TFC)

Se determinó mediante el método descrito por Armentano *et al.*(21). Se tomó una alícuota de 150 µL del extracto y se añadió 45 µL de nitrato sódico (NaNO₃) al

5%. Posteriormente, en los minutos cinco y seis, respectivamente, se añadieron 90 µL de cloruro de aluminio (AlCl₃) al 10% y 300 µL de hidróxido de sodio (NaOH) al 1M. El volumen final de la mezcla se ajustó con agua destilada hasta completar 1.5 mL. Finalmente, se midió la absorbancia a 510 nm, utilizando como blanco la solución mencionada previamente, a excepción del extracto. Se empleó catequina como estándar para elaborar la curva de calibración. Los contenidos totales de flavonoides se expresaron como miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (mg CQ/g ES).

2.2.4 Inhibición del radical DPPH

Este ensayo se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Egharevba *et al.* (22), con algunas modificaciones. En una microplaca de 96 pocillos, se añadieron 200 µL del extracto a diferentes concentraciones: 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL, junto con 100 µL de una solución de DPPH (0.2 mM en metanol). La mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 minutos. La absorbancia se midió a 517 nm, utilizando metanol como blanco. Se emplearon hidroxitolueno butilado (BHT) y Trolox como controles positivos, a las mismas concentraciones que el extracto en metanol, y metanol con DPPH como control negativo. El porcentaje de inhibición del radical DPPH causado por el extracto se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = (\text{Ac}-\text{Am})/\text{Ac} \times 100$$

Donde, Ac es la absorbancia del control negativo. Am la absorbancia de la muestra (extracto o BHT).

2.2.5 Preparación e incubación del extracto de músculo bovino

Después de obtener el músculo de bovino fresco (*Longissimus dorsi*) del mercado local, se trituraron 90 g con agua milliQ hasta homogenizar y obtener una consistencia espesa. Posteriormente, los homogenizados fueron incubados con un tampón fosfato 7.5 mM a pH 7.4 (control negativo), BHT a 1 mM (control positivo) y los extractos ME o EHA (concentración IC₅₀ obtenida del ensayo DPPH), de manera independiente. Además, se añadió a cada muestra un producto acuoso ROO• AAPH (clorhidrato de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)) a 10 mM o tampón fosfato para completar el volumen final. Seguidamente, se incubaron los tratamientos en oscuridad a 37 °C durante 3 h, con agitación constante y suministro de aire cada hora para mantener la disponi-

bilidad de oxígeno (23, 24). Se tomaron alícuotas en los tiempos 0 y 3 h, considerando 0 h como el tiempo inmediatamente después de la mezcla de todos los componentes para la incubación. Para evitar la oxidación posterior, se añadió Trolox 0.1 mM (análogo de α-tocoferol soluble en agua) y se enfrió inmediatamente a -4 °C mediante un baño de hielo para su posterior análisis.

2.2.6 Determinación de TBARS

La oxidación de lípidos se midió mediante la formación de TBARS (23,25). Se tomaron 2 mL de cada uno de los tratamientos anteriores y se mezclaron con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). La mezcla se centrifugó a 16,000 rpm durante 20 min. A continuación, se transfirieron 500 µL del sobrenadante y 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA). La mezcla se homogenizó y se incubó en un baño de agua hirviendo durante 15 min, luego se enfrió rápidamente mediante un choque térmico en agua helada. La absorbancia se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 532 nm y se realizó una curva de calibración utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, el cual fue sometido al mismo tratamiento que las muestras. Los valores de TBARS se calcularon como µmol equivalentes de malondialdehído (MDA)/kg de carne, utilizando la curva de calibración de formación de MDA. Con base en los µmol equivalentes de MDA obtenidos, se calculó el porcentaje de oxidación mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de oxidación} = (\mu\text{mol equivalentes MDA del tratamiento a la hora 3} / \mu\text{mol equivalentes MDA del tratamiento a la hora 0}) * 100$$

2.2.7 Oxidación de proteínas

Preparación e incubación de proteínas miofibrilares.

Los extractos cárnicos fueron preparados como se describió en el ítem 'Preparación e incubación del extracto de músculo bovino'. El músculo bovino fue homogeneizado en tampón PBS (pH 6.5). La concentración de proteína se ajustó utilizando el método del ácido bicinónico (BCA), con BSA como estándar. La proteína miofibrilar (3 mg/mL) fue incubada con tampón fosfato 7.5 mM a pH 7.4 (control negativo), BHT 1 mM (control positivo) y los extractos EM o EHA (concentración IC₅₀), de manera independiente. Además, se añadió AAPH a 10 mM, como productor de ROO•, o tampón a cada muestra para completar el volumen final. Seguidamente, se incubaron los tratamientos en oscuridad a 37 °C durante 3 h con agitación constante, administrando aire cada hora para mantener la disponibilidad de oxígeno (23,24). Se tomaron alícuotas a los tiempos 0 y 3 h,

donde el tiempo 0 h se definió como el momento inmediatamente después de mezclar todos los componentes para la incubación. Para evitar la oxidación posterior, se añadió Trolox 0.1 mM y se enfrió inmediatamente a -4 °C mediante un baño de hielo para su posterior análisis.

Determinación del contenido de carbonilo. Tras la oxidación, se tomaron 2 mL de los tratamientos (3 mg/mL de proteínas), los cuales fueron normalizados y mezclados con 2 mL de tampón fosfato potasio (pH 7.4) en un homogeneizador manual. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recolectado en un tubo nuevo para su posterior análisis. A 10 µL del sobrenadante se les añadieron 250 µL de 2,4-dinitrofenilhidracina, y la mezcla fue agitada con vórtex a 500 rpm durante 1 minuto. La mezcla se incubó en oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 125 µL de solución de TCA al 20 %, y la mezcla se incubó a -20 °C durante 15 minutos. La mezcla de reacción se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 9.000 rpm. El sobrenadante se retiró, y el sedimento fue lavado con una mezcla helada de etanol y acetato de etilo (2-3 veces). El sedimento se resuspendió en 1 mL de clorhidrato de guanidina 6 M. El contenido de carbonilo proteico se midió a una longitud de onda de 370 nm usando un espectrofotómetro. La cantidad de carbonilo proteico en las muestras (control y tratadas) se calculó utilizando un coeficiente de extinción milimolar de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹ para la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH). El contenido final de carbonilo proteico se expresó como nmol de carbonilo por mg de proteína. Los resultados permitieron comparar el contenido de carbonilo proteico en las muestras de control y tratadas. Con base en los nmol de carbonilo por mg de proteína obtenidos, se calculó el porcentaje de oxidación proteica utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de oxidación} = (\text{nmol de carbonilo por mg de proteína del tratamiento a la hora 3} / \text{nmol de carbonilo por mg de proteína del tratamiento a la hora 0}) * 100$$

Electroforesis SDS-PAGE. Las modificaciones sobre las proteínas fueron examinadas por electroforesis SDS-PAGE (26). Las muestras incubadas fueron mezcladas y hervidas durante 5 minutos en una solución tampón Tris

62,5 mM (pH 6,8), que contenía dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 %, glicerol al 10 %, β-mercaptoetanol 100 mM y trazas de azul de bromofenol. Se utilizó un gel de apilamiento de acrilamida al 4 %, geles de resolución de acrilamida al 12 % y un tampón de funcionamiento que consistía en Tris 25 mM, glicina 400 mM y SDS al 0.1 %, con pH 8.3. La electroforesis se realizó a 120 V durante 2 horas. Posteriormente, los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal al 0.1 % y destilados en una solución de metanol y ácido acético durante 4 horas. Los geles se escanearon y se realizó el análisis utilizando un densitómetro calibrado GS-900.

2.2.8 Análisis estadísticos

Los valores representan la media obtenida en tres ensayos independientes, cada uno realizado por triplicado. Los datos se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM). Los datos sobre las actividades antioxidantes y peroxidación lipídica se analizaron mediante ANOVA unidireccional y bidireccional y una prueba de Tukey para comparaciones múltiples utilizando el programa estadístico GraphPad Prism v 9.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). La prueba de comparación de medias entre tratamientos se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan; p ≤ 0,05 se consideró estadísticamente significativo. A través del parámetro fit spline lowess en GraphPad V9 se calculó el IC₅₀.

3. Resultados

3.1 Rendimiento de extracción y análisis fitoquímico de los extractos de hojas de *Coffea arabica*

El porcentaje de rendimiento obtenido para el EM y EHA fue de 5.48 % y 9.26 %, respectivamente. La Tabla 1 muestra que el EM de hojas de *Coffea arabica* contiene una mayor concentración de compuestos fenólicos (249.1 ± 10.8 mg EAG/g ES) y flavonoides (181.5 ± 80.4 mg EC/g de ES) en comparación con el EHA, que presentó valores de 221.3 ± 9.3 mg EAG/g ES para fenoles y 86.8 ± 32.5 mg EC/g de ES para flavonoides. Estos resultados indican que el solvente metanol es más eficiente en la extracción de estos compuestos bioactivos, lo cual puede ser debido a la polaridad del solvente y su capacidad para solubilizar fenoles y flavonoides.

Tabla 1. Contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides de los extractos metanólicos de *C. arabica*.

Tipo de extracto	TPC – Fenoles mg EAG/g ES	TFC - Flavonoides mg EC/g de ES
EM	249.1 ± 10.8	181.5 ± 80.4
EHA	221.3 ± 9.3	86.8 ± 32.5

Los datos fueron expresados como la media \pm SEM de los resultados de tres determinaciones por triplicado para cada compuesto. El contenido total de fenoles (TPC) se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg AG/g ES). Los contenidos totales de flavonoides (TFC) se expresaron como miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (mg CQ/g ES).

3.2 Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hoja de café

En la Figura 1 y Tabla S1, se observan los resultados de la capacidad antioxidante, evaluada mediante la inhibición del radical DPPH. El EM mostró una mayor capacidad antioxidante con un porcentaje de inhibición del DPPH del $70.4 \% \pm 4.8$ a la concentración más alta (1600 $\mu\text{g/mL}$) y una IC_{50} de 630 $\mu\text{g/mL}$. El EHA, por otro lado, tuvo un menor porcentaje de inhibición ($64.2 \pm 4.5\%$ a 1600 $\mu\text{g/mL}$) y una mayor IC_{50} de 732 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica una menor eficacia antioxidante en comparación con el EM. Los controles positivos, BHT y Trolox, mostraron una inhibición significativamente mayor, con porcentajes de $86.7\% \pm 3.3\%$ y $93.5\% \pm 1.3\%$ a una concentración de 1600 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Además, presentaron valores de IC_{50} de 84.6 $\mu\text{g/mL}$ y 73.3 $\mu\text{g/mL}$, lo que demuestra su elevada capacidad antioxidante.

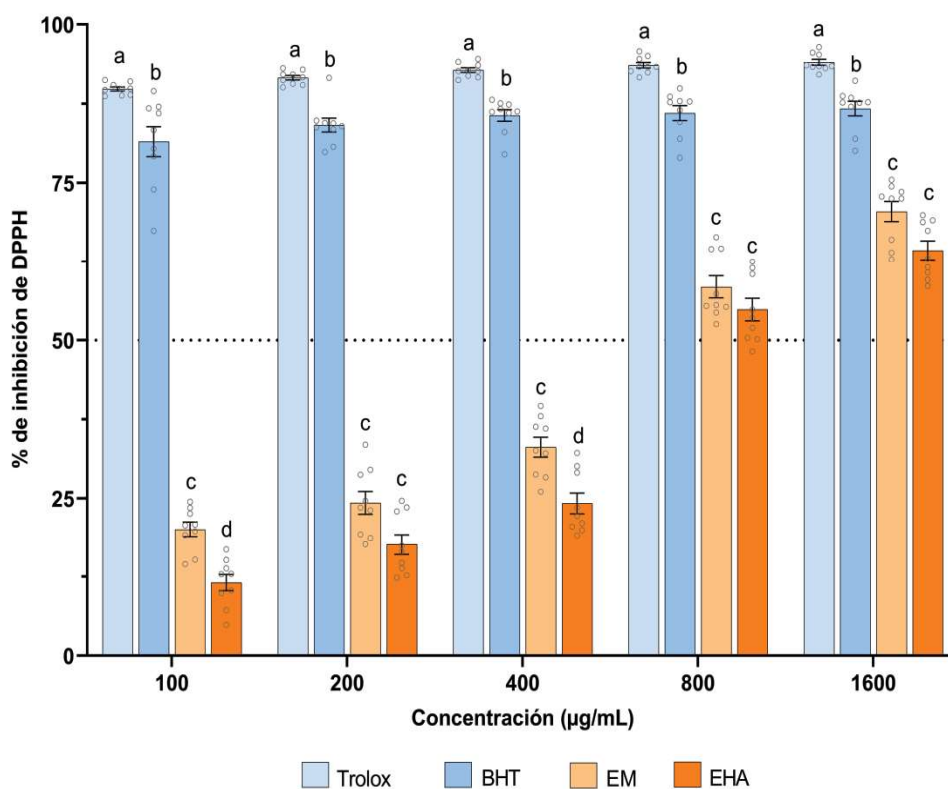


Figura 1. Porcentaje de inhibición del radical DPPH por los diferentes tratamientos del extracto metanólico e hidroalcohólico de hojas de *C. arabica* y controles. Los valores con la misma letra (a-e) en cada grupo de concentraciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; $n=9$; análisis de varianza, prueba post-hoc de Tukey). Los datos representan la media \pm SEM de tres repeticiones por triplicado. Trolox: Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, BHT: butilhidroxitolueno, EM: extracto metanólico, EHA: extracto hidroalcohólico.

3.3 Oxidación de lípidos en modelo de músculo bovino – TBARS

En cuanto a la inhibición de la lipoperoxidación (Figura 2 y Tabla 2), los resultados indican una variabilidad significativa entre los diferentes tratamientos. El AAPH indujo una notable oxidación de lípidos, con un porcentaje de 179 % en los niveles de MDA después de 3 horas en comparación con el punto inicial, evidenciando una alta capacidad prooxidante. En contraste, el BHT mostró una capacidad considerable para inhibir la formación de MDA, con un porcentaje de oxidación de lípidos de 62.7 % y una reducción significativa en comparación con AAPH ($p < 0.05$). Los valores de MDA en el PBS y BHT se mantienen en niveles intermedios, pero el PBS (110.1 % de oxidación) presentó una oxidación de lípidos más alta que el BHT lo que confirma su falta de actividad antioxidante, sugiriendo que el BHT es más efectivo como antioxidante.

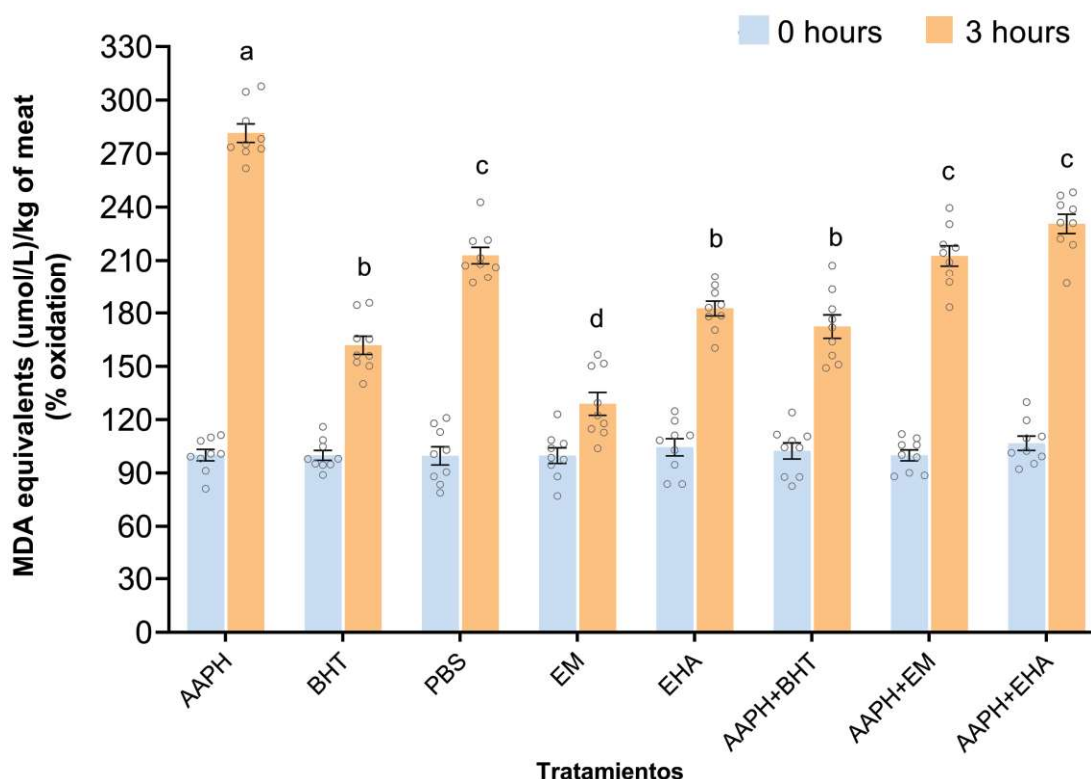


Figura 2. Porcentaje de oxidación obtenido a partir de la concentración de malondialdehído en las diferentes muestras analizadas: Tampón fosfato PBS, diclorhidrato de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH, 10 mM), hidroxianisol butilado (BHT) (1 mM), extracto metanólico (EM, IC₅₀ 630 ug/mL) y extracto hidroalcohólico (EHA, IC₅₀ 732 ug/mL). (a – e) Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$; $n = 9$; análisis de varianza, prueba post-hoc de Tukey). Los datos representan la media \pm SEM de tres repeticiones por triplicado.

Los EM y EHA también mostraron capacidades inhibitoras notables, el EM presentó un 29.1 % en la oxidación de lípidos, mientras que el EHA mostró un 80.5 % de oxidación en comparación con el aumento observado con el AAPH y PBS. Estos resultados sugieren que el EM tiene una mayor capacidad de inhibir la lipoperoxidación en comparación con el EHA. También, es importante destacar que el EM sin un agente prooxidante funciona mejor que el BHT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, y el EHA sin presencia del prooxidante tiene un comportamiento similar al BHT. Por otra parte, en las interacciones (mezclas) entre los extractos y el AAPH se evidenció que el ME y el EHA presentan propiedades antioxidantes que pueden mitigar la oxidación inducida por el AAPH. El EM mostró un porcentaje de oxidación de lípidos del 112.1 % y el EHA un 129.5 %, siendo ambos valores menores y significativos en comparación con el AAPH. Con respecto al tratamiento BHT/AAPH, este mostró una actividad antioxidante superior en comparación con los extractos. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos. El EM, con un contenido total de fenoles y flavonoides más alto que el EHA, podría explicar su mayor eficacia en la inhibición de la lipoperoxidación. Los resultados del DPPH también sugieren que el EM tiene una mayor capacidad para capturar radicales libres en comparación con el EHA, lo que refuerza la idea de que el contenido de fenoles y flavonoides contribuye significativamente a la actividad antioxidante observada.

Tabla 2. Inhibición de la lipoperoxidación mediante el método de TBARS. Tampón fosfato PBS, diclorhidrato de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH, 10 mM), hidroxianisol butilado (BHT) (1 mM), extracto metanólico (EM, IC₅₀ 630 ug/mL) y extracto hidroalcohólico (EHA, IC₅₀ 732 ug/mL).

Tratamientos	MDA umol/L 0 horas	MDA umol/L 3 horas	% oxidación de lípidos a las 3 horas	Aumento del % oxidación con respecto a 0 horas
AAPH ^a	8.5 ± 2.2	23.7 ± 5.3	279.0 ± 15.6	179.0
BHT ^b	5.9 ± 2.5	9.6 ± 4.1	162.7 ± 15.3	62.7
PBS ^c	5.9 ± 2.2	12.4 ± 4.0	210.1 ± 13.9	110.1
EM ^d	4.1 ± 1.7	5.3 ± 2.1	129.1 ± 19.3	29.1
EHA ^b	3.6 ± 0.5	6.5 ± 1.0	180.5 ± 12.5	80.5
BHT/AAPH ^b	10.1 ± 2.2	17.3 ± 3.3	171.2 ± 19.7	70.7
EM/AAPH ^c	8.2 ± 2.8	17.4 ± 5.6	212.1 ± 17.0	112.1
EHA/AAPH ^c	9.8 ± 1.1	22.5 ± 1.3	229.5 ± 16.1	129.5

Notas: (a – d) Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos representan la media ± SEM de tres repeticiones por triplicado.

3.4 Oxidación de proteínas - determinación del contenido de carbonilo en proteínas miofibrilares en modelo de músculo bovino

En la formación de grupos carbonilo (Figura 3 y Tabla 3). El tratamiento con AAPH, provocó el mayor incremento en la oxidación proteica, con un aumento del 152.5 % en el contenido de carbonilo tras 3 horas de incubación. En comparación, el tampón PBS, utilizado como control negativo, mostró un incremento del 104.8 %, lo que refleja la capacidad oxidativa natural del sistema sin agentes protectores y/o prooxidantes.

El BHT mostró un porcentaje de oxidación del 57,4 % sin la presencia de AAPH, lo que indica una efectividad moderada en la protección contra la oxidación proteica natural. El EM evidenció una mayor capacidad para inhibir la oxidación, con un porcentaje de oxidación del 42,5 %, sin diferencias significativas en comparación con el BHT. Por otro lado, el EHA fue menos eficaz en la inhibición de la oxidación, con un valor del 62,5 %.

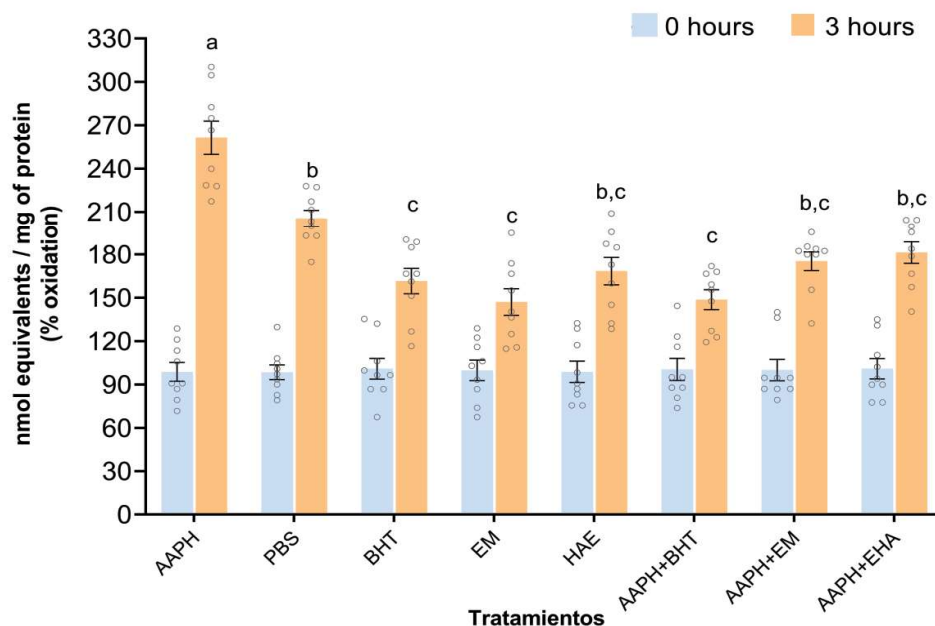


Figura 3. Porcentaje de grupos carbonilo en las diferentes muestras analizadas, control, AAPH (10 mM), BHT (1 mM) y extracto metanólico (EM, IC₅₀ 630 ug/mL) y extracto hidroalcohólico (EHA, IC₅₀ 732 ug/mL). (a – e) Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$; $n=9$; análisis de varianza, prueba post-hoc de Tukey). Los datos representan la media ± SEM de tres repeticiones por triplicado.

En los tratamientos combinados de BHT/AAPH, EM/AAPH y EHA/AAPH, se observó una reducción significativa en la oxidación proteica en comparación con el tratamiento con AAPH solo. En particular, el tratamiento EM/AAPH resultó en un 72.5 % de oxidación proteica, mientras que EHA/AAPH mostró un 78.3 % de oxidación. Estos valores, aunque superiores a los del BHT (46.5 %), no fueron estadísticamente significativos; por lo tanto, se refleja la capacidad de estos extractos para mitigar los efectos oxidativos del AAPH.

Tabla 3. Concentración de grupos carbonilos en las diferentes muestras analizadas. Tampón fosfato PBS, diclorhidrato de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH, 10 mM), hidroxianisol butilado (BHT) (1 mM), extracto metanólico (EM, IC₅₀ 630 ug/mL) y extracto hidroalcohólico (EHA, IC₅₀ 732 ug/mL).

Tratamientos	Carbonilo nmol/mg proteína 0 horas	Carbonilo nmol/mg proteína 3 horas	% oxidación proteica a las 3 horas	Aumento del % oxidación con respecto a 0 horas
AAPH ^a	0.40 ± 0.08	1.01 ± 0.08	252.5 ± 34.5	152.5
PBS ^b	0.41 ± 0.06	0.84 ± 0.06	204.8 ± 17.4	104.8
BHT ^c	0.47 ± 0.10	0.74 ± 0.05	157.4 ± 26.3	57.4
EM ^c	0.47 ± 0.10	0.67 ± 0.03	142.5 ± 27.7	42.5
EHA ^{b,c}	0.40 ± 0.09	0.65 ± 0.07	162.5 ± 28.6	62.5
BHT/AAPH ^c	0.43 ± 0.10	0.63 ± 0.07	146.5 ± 20.5	46.5
EM/AAPH ^{b,c}	0.40 ± 0.09	0.69 ± 0.07	172.5 ± 19.3	72.5
EHA/AAPH ^{b,c}	0.37 ± 0.08	0.66 ± 0.08	178.3 ± 22.6	78.3

Notas: (a – c) Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos representan la media ± SEM de tres repeticiones por triplicado.

3.4 Oxidación de proteínas - Electroforesis SDS-PAGE

Se llevó a cabo una electroforesis para identificar las alteraciones causadas por la oxidación de las proteínas. En los geles (Figura 4) se pueden observar bandas correspondientes a diversas proteínas presentes en el extracto de músculo bovino, donde la tropomiosina, actina y paramiosina se destacan como los componentes principales del extracto, con pesos moleculares aproximados de 37 kDa, 43 kDa y 100 kDa (27).

En la figura 4 se evidenció que el sistema oxidante empleado afectó la estructura proteica después de tres horas de incubación, mostrando un aumento en la fragmentación de proteínas (de 17 bandas proteicas a las 0 horas a 21 bandas proteicas a las 3 horas). En los controles de PBS y BHT no se evidenciaron cambios después de las tres horas de incubación. En los extractos sin oxidante, no se observó fragmentación ni modificaciones en la actina, que presentó un peso molecular de aproximadamente 42-43 kDa. Además, se evidenció que tanto el EM como el EHA brindan una ligera protección al extracto bovino tratado con AAPH, particularmente en la actina y la paramiosina, después de tres horas de incubación, en comparación con las muestras tratadas exclusivamente con AAPH.

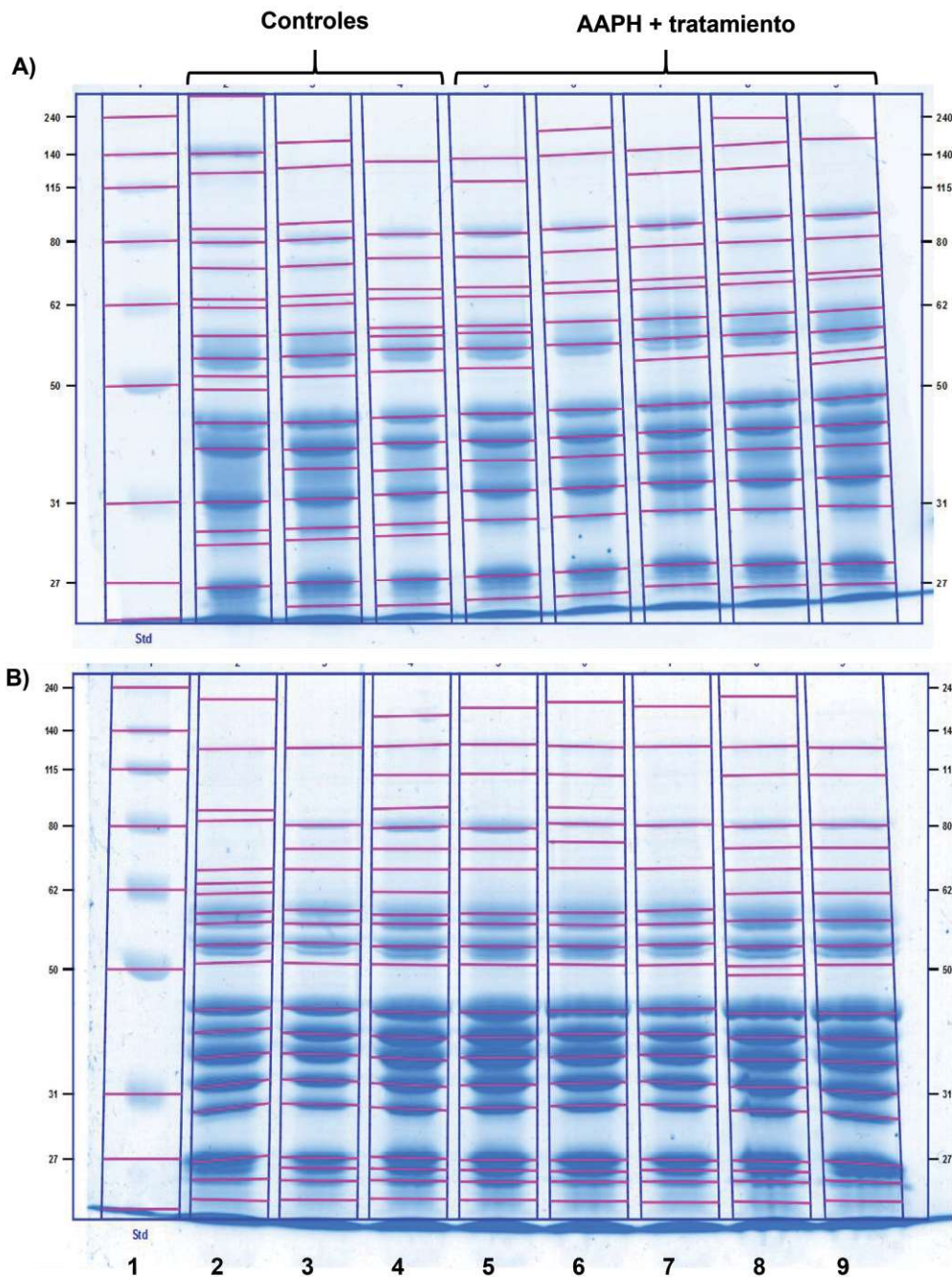


Figura 4. Análisis de proteínas miofibrilares incubadas con diferentes tratamientos mediante electroforesis SDS-PAGE. (A) 0 hora de incubación. (B) 3 horas de incubación. Línea 1 marcador de peso molecular, línea 2 tampón fosfato PBS, línea 3 BHT 1 mM, línea 4 AAPH 10 mM, línea 5 AAPH+EHA, línea 6 AAPH+EM, línea 7 AAPH+BHT, línea 8 EM, línea 9 EHA. Std o MP: 27 a 240 KDa.

4. Discusión

El EM de hojas de *C. arabica* demostró una mayor eficacia en la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides en comparación con el EHA. Esta mayor concentración de compuestos bioactivos en el EM se tradujo en una capacidad antioxidante superior, medida mediante la inhibición del radical DPPH. Esto sugiere que la polaridad del solvente en el EM permite una solubilización más efectiva de fenoles y flavonoides en comparación con el EHA. La superioridad de BHT y Trolox en la inhibición del DPPH destaca la alta eficacia de los antioxidantes sintéticos; sin embargo, los antioxidantes naturales, como los presentes en *C. arabica*, siguen siendo de gran interés por sus beneficios potenciales para la salud y la seguridad alimentaria.

En estudios previos, se ha observado que los extractos obtenidos con alcoholes al 100% exhiben la mayor actividad antioxidante total mediante el método DPPH (28,29). Aunque hay pocos estudios sobre los extractos de hojas de *C. arabica*, algunas investigaciones, como el de Armijos (30), muestran que los extractos acuoso y etanólico presentan actividades antioxidantes del 15% y 23%, respectivamente, con valores de IC_{50} de 117.5 y 104.2 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, Kurang (31) reporta que el EM contiene flavonoides, alcaloides, terpenoides y fenoles, lo que se traduce en una potente capacidad antioxidante con un IC_{50} de 57.699 ppm. Nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos, mostrando una mayor eficacia del EM en la inhibición del radical DPPH comparado con el EHA, subrayando la importancia del solvente en la optimización de la extracción de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

Hasta la fecha, no se habían reportado estudios que evaluaran la capacidad de los extractos metanólicos de *C. arabica* para inhibir la lipoperoxidación en un modelo de músculo bovino. Sin embargo, investigaciones previas han mostrado resultados prometedores con extractos de *C. arabica* en otros modelos. Por ejemplo, Stadler *et al.* (32), encontraron que la administración de cafeína pura durante siete días redujo en un 70% los hidroperóxidos lipídicos y aumentó la relación entre glutatión reducido y oxidado en un 249 % en voluntarios saludables. Estos resultados sugieren que los componentes del café podrían desempeñar un papel importante en la reducción del daño oxidativo (33), aunque los efectos específicos en la lipoperoxidación del músculo bovino aún no han sido investigados.

Phan *et al.* (34) reportan que las fracciones del extracto etanólico crudo del sedimento de *C. arabica* mostraron una notable actividad antioxidante en la captura del radical DPPH (IC_{50} de 27.3 $\mu\text{g/mL}$) y una capacidad superior para inhibir la peroxidación lipídica (2.11 mg MDA/kg al día 6 de almacenamiento) en camarones blancos. Estos resultados, que están asociados con un alto contenido de fenoles totales (116.5 mg GAE/100 g), son consistentes con nuestros hallazgos sobre el EM de hojas de *C. arabica*, que también mostró una elevada capacidad antioxidante. Aunque la comparación directa con los efectos en las fracciones del sedimento es limitada debido a la falta de estudios específicos en músculo bovino, los resultados sugieren un potencial significativo para la protección contra la oxidación lipídica, resaltando el valor de *C. arabica* en la seguridad alimentaria y la valorización de subproductos.

En un estudio paralelo (35), se demostró que los extractos con etanol y agua del residuo de café (ECR) tienen una actividad antioxidante significativa en homogenizados de carne cruda, con un incremento mucho menor en TBARS en comparación con el butilhidroxianisol (BHA). Nuestro estudio, que muestra que el EM de hojas de *C. arabica* también tiene una alta capacidad antioxidante, respaldando la eficacia de los solventes orgánicos para extraer compuestos fenólicos. Sin embargo, es importante notar que las diferencias en las matrices de muestra pueden influir en los perfiles de estos compuestos. En cuanto a la inhibición de la peroxidación lipídica, los extractos de ECR mostraron ser efectivos en carne cruda, pero su potencia disminuyó en carne cocida. Esto sugiere que la efectividad de los extractos naturales puede variar según la matriz y las condiciones de procesamiento.

Aunque la capacidad antioxidante del extracto de hojas de *C. arabica* ha sido bien investigada, sus efectos específicos sobre la oxidación proteica en músculo bovino son nuevos. En contraste con el estudio de do Carvalho (36), que no encontró un aumento significativo en los niveles de carbonilos proteicos en ratas Wistar tras la exposición a café orgánico y convencional en comparación con 1,2-dimetilhidrazina, nuestros resultados muestran un aumento significativo del 152.5 % en la oxidación proteica en el modelo de músculo bovino utilizando AAPH como inductor de oxidación. El BHT redujo la oxidación al 57.4 %, mientras que los extractos metanólico e hidroalcohólico de *C. arabica* mostraron una capacidad similar para inhibir la oxidación proteica, aunque no tan efectiva como el BHT. Esto sugiere que, aunque el café tiene un potencial antioxidante considerable, su eficacia puede variar dependiendo del tipo de muestra y las condiciones experimentales. La discrepancia con los hallazgos de do Carvalho puede deberse a diferencias en los modelos experimentales, como la especie animal y el tipo de tejido, lo que resalta la necesidad de realizar más estudios para evaluar el potencial antioxidante de *Coffea arabica* en diferentes contextos y su aplicabilidad en la industria alimentaria.

5. Conclusiones

Este estudio evidenció la capacidad del extracto metanólico de hojas de *Coffea arabica* para inhibir la oxidación lipídica y proteica en comparación con el extracto hidroalcohólico. Ambos extractos demostraron una significativa capacidad antioxidante, con el EM mostrando mayores concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides y una mayor eficacia en la inhibición del

radical DPPH. En cuanto a la oxidación lipídica, el EM y el EHA redujeron significativamente la formación de MDA, aunque el EM fue más efectivo, a pesar de que ambos extractos resultaron menos eficaces que el BHT. En la inhibición de la oxidación proteica, el EM mostró una reducción en la formación de grupos carbonilo que, aunque inferior a la del BHT, supera a la del EHA. Los resultados sugieren que el EM de *Coffea arabica* tiene un potencial superior en la protección antioxidante, especialmente en la prevención de la oxidación de lípidos y proteínas. No obstante, ambos extractos tienen aplicaciones prometedoras en la preservación de productos alimenticios, y es recomendable realizar estudios adi-

cionales para explorar su eficacia en diferentes matrices alimentarias y condiciones experimentales.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue apoyado por la Universidad del Quindío mediante del Proyecto número 1163 a través de la convocatoria No14 para el fortalecimiento de los grupos de investigación.

Declaración de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Geng L, Liu K, Zhang H. Lipid oxidation in foods and its implications on proteins. Vol. 10, *Frontiers in Nutrition*. 2023.
2. Silva FAP, Estévez M, Ferreira VCS, Silva SA, Lemos LTM, Ida EI, *et al*. Protein and lipid oxidations in jerky chicken and consequences on sensory quality. *LWT*. 2018 Nov 1;97:341–8.
3. Torrico DD, Hutchings SC, Ha M, Bittner EP, Fuentes S, Warner RD, *et al*. Novel techniques to understand consumer responses towards food products: A review with a focus on meat. *Meat Sci*. 2018 Oct 1;144:30–42.
4. Huang X, Ahn DU. Lipid oxidation and its implications to meat quality and human health. Vol. 28, *Food Science and Biotechnology*. 2019.
5. Viedma-Poyatos Á, González-Jiménez P, Langlois O, Company-Marín I, Spickett CM, Pérez-Sala D. Protein lipoxidation: Basic concepts and emerging roles. Vol. 10, *Antioxidants*. 2021; 10(2), 295.
6. Zhao J, Chen J, Zhu H, Xiong YL. Mass spectrometric evidence of malonaldehyde and 4-hydroxynonenal adductions to radical-scavenging soy peptides. *J Agric Food Chem*. 2012;60(38).
7. Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. Vol. 51, *Appetite*. 2008.
8. Nguyen TTK, Laosinwattana C, Teerarak M, Pilasombut K. Potential antioxidant and lipid peroxidation inhibition of *Phyllanthus acidus* leaf extract in minced pork. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2017;30(9).
9. Caleja C, Barros L, Antonio AL, Oliveira MBPP, Ferreira ICFR. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chem*. 2017 Feb 1;216:342–6.
10. Caleja C, Barros L, Antonio AL, Ciric A, Soković M, Oliveira MBPP, *et al*. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *J Funct Foods*. 2015 Jan 1;12:428–38.
11. Nissen LR, Byrne D V., Bertelsen G, Skibsted LH. The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Sci*. 2004 Nov 1;68(3):485–95.
12. Shah MA, Bosco SJD, Mir SA. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci*. 2014 Sep 1;98(1):21–33.
13. Hayes JE, Stepanyan V, Allen P, O’Grady MN, Kerry JP. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT*. 2011 Jan 1;44(1):164–72.
14. Cangeloni L, Bonechi C, Leone G, Consumi M, Andreassi M, Magnani A, *et al*. Characterization of Extracts of Coffee Leaves (*Coffea arabica* L.) by Spectroscopic and Chromatographic/Spectrometric Techniques. *Foods*. 2022 Aug 18;11(16):2495
15. Patay ÉB, Bencsik T, Papp N. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species

- from the past until now. *Asian Pac J Trop Med.* 2016 Dec;9(12):1127-1135.
16. Murthy PS, Naidu MM. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioproc Tech.* 2012;5(3).
 17. Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV, Matute C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium.* 2009;45(4).
 18. Campa C, Mondolot L, Rakotondravao A, Bidel LPR, Gargadennec A, Couturon E, *et al.* A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Ann Bot.* 2012;110(3).
 19. Aguillón Osma J, Maldonado ME, Loango Chamorro N, Arango Varela SS, Landázuri P. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. *Perspectivas en Nutrición Humana.* 2013;15(1).
 20. Muñoz-Bernal ÓA, Torres-Aguirre GA, Núñez-Gastélum JA, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, Ayala-Zavala JF, *et al.* NUEVO ACERCAMIENTO A LA INTERACCIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU CON AZÚCARES DURANTE LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES. *TIP.* 2017;20(2): 23-28
 21. Armentano MF, Bisaccia F, Miglionico R, Russo D, Nolfi N, Carosino M, *et al.* Antioxidant and proapoptotic activities of sclerocarya birrea [(A. Rich.) Hochst.] methanolic root extract on the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
 22. Egharevba GO, Dosumu OO, Oguntoye SO, Njinga NS, Dahunsi SO, Hamid AA, *et al.* Antidiabetic, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of *Tephrosia bracteolata* leaves. *Heliyon.* 2019 Aug 21;5(8):e02275.
 23. Bridi R, Giordano A, Peñailillo MF, Montenegro G. Antioxidant effect of extracts from native Chilean plants on the lipoperoxidation and protein oxidation of bovine muscle. *Molecules.* 2019;24(18).
 24. Zhou F, Zhao M, Zhao H, Sun W, Cui C. Effects of oxidative modification on gel properties of isolated porcine myofibrillar protein by peroxy radicals. *Meat Sci.* 2014;96(4).
 25. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186(C).
 26. Zhou F, Zhao M, Zhao H, Sun W, Cui C. Effects of oxidative modification on gel properties of isolated porcine myofibrillar protein by peroxy radicals. *Meat Sci.* 2014;96(4).
 27. Wang H, Yang Z, Yang H, Xue J, Li Y, Wang S, *et al.* Comparative study on the rheological properties of myofibrillar proteins from different kinds of meat. *LWT.* 2022 Jan 1;153:112458.
 28. Calle-Chumo RN, Calle-Chumo DA, Gallegos-Peredo AS, Jarrín-Oseguera PI. Influence of the Solvent on the Extraction of Phenolic Compounds from Coffee Grounds via Soxhlet Leaching. *Ingeniería e Investigación.* 2023;43(1).
 29. Rotundo G, Paventi G, Barberio A, De Cristofaro A, Notardonato I, Russo MV, *et al.* Biological activity of *dittrichia viscosa* (L.) greuter extracts against adult *sitophilus granarius* (L.) (coleoptera, curculionidae) and identification of active compounds. *Sci Rep.* 2019;9(1).
 30. Armijos Moncada DA, Torres Segarra SM. Comparación de la actividad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *Coffea arabica*. [Cuenca]: Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana; 2020.
 31. Kurang RY, Kamengon RY. Phytochemical Test and Antioxidant Activity of Methanol Extract in Arabica Coffee Leaves by Using DPPH Method (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Walisongo Journal of Chemistry.* 2021;4(2).
 32. Metro D, Cernaro V, Santoro D, Papa M, Buemi M, Benvenga S, *et al.* Beneficial effects of oral pure caffeine on oxidative stress. *J Clin Transl Endocrinol.* 2017 Dec 1;10:22–7.
 33. Stadler RH, Turesky RJ, Müller O, Markovic J, Leong-Morgenthaler PM. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutation Research Regular Papers.* 1994;308(2).
 34. Phan DTA, Ha HT, Ho TT. An extract and fractions from *Coffea arabica* sediment on antioxidant and anti-tyrosinase activities, and on the quality of whiteleg shrimp (*Litopenaus vannamei*) during refrigerated storage. *Prev Nutr Food Sci.* 2021;26(3).
 35. Kim JH, Ahn DU, Eun JB, Moon SH. Antioxidant effect of extracts from the coffee residue in raw and cooked meat. *Antioxidants.* 2016;5(3).
 36. do Carvalho DC, Brigagão MRPL, dos Santos MH, de Paula FBA, Giusti-Paiva A, Azevedo L. Organic and Conventional *Coffea arabica* L.: A Comparative Study of the Chemical Composition and Physiological, Biochemical and Toxicological Effects in Wistar Rats. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2011;66(2).

Material suplementario

Tabla S1. Porcentaje de inhibición del radical DPPH por los extractos de hojas de *Coffea arabica* en comparación con BHT y trolox. Se muestran las concentraciones inhibitorias media IC₅₀. Los datos son las medias ± SEM de tres experimentos por triplicado.

Muestra	Tratamientos	% inhibición de DPPH	IC ₅₀ (µg/mL)
EM	100 µg/mL	20.1 ± 3.4	630
	200 µg/mL	24.3 ± 5.4	
	400 µg/mL	33.1 ± 4.7	
	800 µg/mL	58.4 ± 5.2	
	1600 µg/mL	70.4 ± 4.8	
EHA	100 µg/mL	11.5 ± 3.8	732
	200 µg/mL	17.6 ± 4.9	
	400 µg/mL	24.2 ± 4.9	
	800 µg/mL	54.8 ± 5.4	
	1600 µg/mL	64.2 ± 4.5	
BHT	100 µg/mL	81.5 ± 0.7	84.6
	200 µg/mL	84.1 ± 5.0	
	400 µg/mL	85.6 ± 0.7	
	800 µg/mL	86.0 ± 2.3	
	1600 µg/mL	86.7 ± 0.5	
Trolox	100 µg/mL	89.8 ± 0.9	73.3
	200 µg/mL	91.7 ± 1.0	
	400 µg/mL	92.7 ± 1.1	
	800 µg/mL	93.3 ± 1.3	
	1600 µg/mL	93.5 ± 1.3	