

Antioxidant phytochemicals and modulation of oxidative stress from infusions and ultrasound-assisted extractions of *Coffea* leaves

Fitoquímicos antioxidantes y modulación de estrés oxidativo en hojas de *Coffea* mediante infusión y extracción asistida por ultrasonido

Mayra C. Rosales-Villarreal¹; Nuria E. Rocha-Guzmán¹; José A. Gallegos-Infante¹; Martha R. Moreno-Jiménez¹; Rosalía Reynoso-Camacho²; Iza F. Pérez-Ramírez²; Rong Tsao³; Rubén F. González-Laredo^{1*}

¹TecNM/Instituto Tecnológico de Durango, UPIDET. Bulevar Felipe Pescador 1830 Oriente. C. P. 34080. Durango, Durango, México.

²Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n, Circuito Universitario. C. P. 76010. Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

³Guelph Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada. 93 Stone Road West, Guelph, Ontario N1G 5C9, Canada.

*Corresponding author: rubenfgl@itdurango.edu.mx; tel.: +52 618 138 7136.

Abstract

Introduction: Beyond the commercial value of coffee grains there is recent interest for the non-timber benefit and traditional medicinal properties of the *Coffea* tree leaves.

Objective: To determine the phytochemical composition, antioxidant properties and inhibition of oxidative stress by extracts from *Coffea* leaves obtained by ultrasound assistance as an opportunity for production of plant bioactives.

Material and methods: The phytochemical composition of ten extracts of *Coffea arabica* L. leaves cv. Catimor 5000 was evaluated in their phenolic and methylxanthines contents as well their antioxidant activity *in vitro* through nitric oxide (NO), absorbance capacity of oxygen radicals (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and radical ABTS (2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) assays, and their effect on inhibition of oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human colon adenocarcinoma cells (HT-29). Extracts were obtained by ultrasound assistance under different conditions (wave amplitude, solvent ratio, and extraction time).

Results and discussion: The higher phenolics and caffeine contents, as well the greater oxidative stress inhibition response in the HT-29 model, ORAC and NO assays were obtained at 60/40 water/methanol, 40 % amplitude and 6 min of extraction time. In this work, identification of two flavanones have been reported for the first time in *Coffea* leaves: neohesperidin and naringenin. Regarding phenolic acids, it was detected and identified a group of hydroxybenzoic acids not previously reported in coffee leaves, such as vanillic, shikimic, syringic, and ellagic acids, along with 2,4,6 trihydroxybenzaldehyde and 2,3 dihydroxybenzoic acid.

Conclusion: The novel phytochemical composition of bioactive extracts from *Coffea* leaves by ultrasound assistance is significant, representing a potential source of food nutraceuticals.

Keywords: phytochemical composition; bioactive extracts; flavonoids; mangiferin; phenolic acids.

Resumen

Introducción: Más allá del valor comercial de los granos de café, existe interés reciente por el aprovechamiento no maderero y las propiedades medicinales tradicionales de sus hojas.

Objetivo: Determinar la composición fitoquímica, las propiedades antioxidantes y la inhibición del estrés oxidativo de los extractos de hojas de *Coffea*, obtenidos por asistencia de ultrasonido, como una oportunidad para la producción de bioactivos vegetales.

Materiales y métodos: La composición fitoquímica de 10 extractos de hojas de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 5000 se evaluó de acuerdo con su contenido de fenoles y metilxantinas; su actividad antioxidante *in vitro*, mediante ensayos de óxido nítrico (ON), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y radicales ABTS (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]); y su efecto en la inhibición del estrés oxidativo inducido, por peróxido de hidrógeno en células humanas de adenocarcinoma de colon (HT-29). Los extractos se obtuvieron por asistencia de ultrasonido en diferentes condiciones de amplitud de onda, proporción de solvente y tiempo de extracción.

Resultados y discusión: El contenido de fenoles y cafeína, y la mayor respuesta de inhibición de estrés oxidativo en el modelo HT-29, ensayos ORAC y ON fueron mayores con 60/40 de agua/metanol, 40 % de amplitud y 6 min de tiempo de extracción. Se identificaron por primera vez dos flavanonas en hojas de *Coffea*: neohesperidina y naringenina. En cuanto a los ácidos fenólicos, se identificaron los ácidos vanílico, shikímico, siríngico, elágico, 2,4,6 trihidroxibenzaldehído, y 2,3 dihidroxibenzoico, no reportados previamente en hojas de café.

Conclusión: La novedosa composición fitoquímica de los extractos bioactivos de las hojas de *Coffea* por asistencia de ultrasonido es significativa, lo que representa una fuente potencial de nutraceuticos.

Palabras clave: composición fitoquímica; extractos bioactivos; flavonoides; mangiferina; ácidos fenólicos.

Introduction

The coffee tree (*Coffea* spp.) is an evergreen shrub that can guarantee a constant supply of leaves throughout the year. This non-timber resource can be used as it represents a non-commercial part of the plant to which different medicinal properties are attributed (Chen, 2019). *Coffea* leaves have been consumed since ancient times, mainly as infusion, to treat various health conditions (Rosales-Villarreal et al., 2019), for example respiratory infections (Tabuti, Kukunda, & Waako, 2010), stomach problems (Belayneh & Bussa, 2014), obesity, body ache, headache, cough, fever, and hair loss (Heredia-Díaz et al., 2018).

These therapeutic effects could be influenced by the phytochemical composition of the foliar matrix, which contains phenolic compounds such as phenolic acids (ferulic, synapic, caffeic, chlorogenic, and *p*-coumaric acids) and flavonoids (kaempferol, rutin, quercetin, and isoquercitrin) (Patay, Benczik, & Papp, 2016). It has been reported that 5-O-caffeoylquinic and feruloylquinic acids are also present in the leaves of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner along with other components, including xanthone mangiferin (Campa et al., 2012), lipids (Delarozza, Rakocevic, Malta, Bruns, & Scarminio, 2014), alkaloids (Zheng & Ashihara, 2004), and carbohydrates (Brum, Melo, Barquero, Alves, & Chalfun-Júnior, 2013). Many of these biological active metabolites can be obtained by conventional infusions; however, the implementation of clean extraction techniques may allow greater yields of phytochemicals, mainly phenolic compounds, that can supply of prophylactic ingredients and broaden our knowledge on the composition of plant materials. Particularly, there is an enhanced process of extraction for the recovery of these plant metabolites, i.e., UAE (ultrasound assisted extraction), which is an emerging technology that accelerates heat and mass transfer and has been proposed for bioactives extraction of coffee leaves (Chen, Ding, Ji, He, & Ma, 2020). Hence, these transfer mechanisms along cavitation effects facilitate the release of extractable components, such as bioactive phenolics, and their mass diffusion by breaking down the cell walls of the plant (Chemat et al., 2017). The UAE process improves the quality and novelty of obtained extracts compared to traditional methods such as infusion (Chemat et al., 2017).

Therefore, the aim of the present study was to determine the complete and updated chemical profile of phenolic bioactives such as flavonoids, methylxanthines and phenolic acids, as well as the *in vitro* antioxidant response and oxidative stress of extracts derived from *Coffea* leaves, using ultrasound-assisted extraction.

Introducción

El cafeto (*Coffea* spp.) es un arbusto perenne que puede garantizar un suministro constante de hojas durante todo el año. Este recurso no maderable puede utilizarse, ya que representa una parte no comercial de la planta a la que se le atribuyen propiedades medicinales (Chen, 2019). Las hojas de café se consumen desde la antigüedad, principalmente en forma de infusión, para tratar diversas enfermedades (Rosales-Villarreal et al., 2019) como infecciones respiratorias (Tabuti, Kukunda, & Waako, 2010), problemas estomacales (Belayneh & Bussa, 2014), obesidad, dolor de cuerpo y cabeza, tos, fiebre y caída del cabello (Heredia-Díaz et al., 2018).

Los efectos terapéuticos podrían estar influenciados por la composición fitoquímica de la matriz foliar, que contiene compuestos fenólicos como ácidos fenólicos (ferúlico, sináptico, cafeico, clorogénico y *p*-cumárico) y flavonoides (kaempferol, rutina, quercetina e isoquercitrina) (Patay, Benczik, & Papp, 2016). Se ha señalado que los ácidos 5-O-cafeoilquínico y feruloilquínico también están presentes en las hojas de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner junto con otros componentes, entre los que se encuentran la xantona mangiferina (Campa et al., 2012), lípidos (Delarozza, Rakocevic, Malta, Bruns, & Scarminio, 2014), alcaloides (Zheng & Ashihara, 2004) y carbohidratos (Brum, Melo, Barquero, Alves, & Chalfun-Júnior, 2013). Muchos de estos metabolitos biológicamente activos pueden obtenerse mediante infusiones convencionales; sin embargo, la implementación de técnicas limpias de extracción puede permitir mayores rendimientos de fitoquímicos, principalmente compuestos fenólicos, que pueden suministrar ingredientes profilácticos y ampliar el conocimiento sobre la composición. Particularmente, existe un proceso optimizado de extracción para la recuperación de estos metabolitos vegetales; es decir, la EAU (extracción asistida por ultrasonido), tecnología emergente que acelera la transferencia de calor y masa, que ha sido propuesta para la extracción de bioactivos de hojas de café (Chen, Ding, Ji, He, & Ma, 2020). Por lo tanto, estos mecanismos de transferencia, junto con los efectos de cavitación, facilitan la liberación de componentes extraíbles como los fenólicos bioactivos y su difusión en masa al romper las paredes celulares de la planta (Chemat et al., 2017). El proceso de EAU mejora la calidad y novedad de los extractos obtenidos en comparación con los métodos tradicionales como la infusión (Chemat et al., 2017).

Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil químico completo y actualizado de los bioactivos fenólicos como los flavonoides, las metilxantinas y los ácidos fenólicos, así como la respuesta antioxidante y estrés oxidativo *in vitro* de los extractos derivados de las hojas de *Coffea*, mediante el uso de la extracción asistida por ultrasonido.

Materials and methods

Reagent and biological materials

Air-dried *Coffea arabica* L. leaves cv. Catimor 5000 were obtained from the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) at Xalapa, Veracruz, México. All reagents used were from Sigma-Aldrich (Estado de México, México). Colon adenocarcinoma cells (HT-29) were from American Type Culture Collection (ATCC® HTB-38™, CDMX, Mexico).

Preparation of extracts

Coffea leaves infusions were prepared adding 1 g of ground material to 100 mL of 80 °C distilled water and allowed to stand for 10 min. Infusions were lyophilized and kept protected from light and humidity until analysis.

Plant material was subjected to UAE at constant temperature (<35 °C), using a 13 mm probe (Sonifer® SFX250, BRANSON®) with depth of 2.5 cm, solvent volume of 200 mL, solvent-to-solid ratio (10:1.5), frequency of 20 KHz, power of 250 W and intermittent pulses of 5 s ON / 5 s OFF (Hossain et al., 2012). The variable factors were extraction time (3, 6 and 9 min), wave amplitude percentage (20, 30 and 40 %) and water/methanol solvent ratio (100/0, 60/40 and 20/80 v/v).

Total phenolic content

In 96-well microplates, 25 µL of extract samples at 0.1 mg·mL⁻¹ were placed in triplicate, then 80 µL of distilled water and 5 µL of Folin-Ciocalteu reagent 2 N were added. The plate was capped and stirred for 5 min, then 80 µL of Na₂CO₃ 7 % was added to each well. Samples in plate were let to stand for 30 min and their absorbance read (ELISA SYNERGY HT, Microplate Reader BioTek; Winooski, VT, USA) at 765 nm. Results were expressed as mg chlorogenic acid equivalents per mg extract.

Flavonoid content

In a 96-well transparent microplate, 20 µL of extract at 0.1 mg·mL⁻¹ were placed, and then 7.5 µL of 5 % NaNO₂, 15 µL of 10 % AlCl₃, 50 µL of 1 M NaOH and 157 µL of distilled water were added to each well. Subsequently, the plate was shaken for 1 min and allowed to stand in the dark for 5 min. Afterwards, the absorbance was read at 570 nm as stated above. Results were expressed as mg catechin equivalents per mg extract.

Identification of phenolic compounds by UPLC-ESI-QqQ-MS/MS

The extracts were prepared at 10 mg·mL⁻¹ dissolved in UPLC grade methanol. An ultra-high-resolution liquid

Materiales y métodos

Reactivos y materiales biológicos

Hojas de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 5000, secadas al aire, se consiguieron a través del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Xalapa, Veracruz, México. Todos los reactivos utilizados fueron Sigma-Aldrich (Estado de México, México). Las células de adenocarcinoma de colon (HT-29) provinieron de American Type Culture Collection (ATCC® HTB-38™, CDMX, México).

Preparación de extractos

Para la preparación de las infusiones de hojas de *Coffea* se añadió 1 g de material molido a 100 mL de agua destilada a 80 °C y se dejó reposar durante 10 min. Las infusiones se liofilizaron y se mantuvieron protegidas de la luz y la humedad hasta su análisis.

El material vegetal se sometió a EAU a temperatura constante (<35 °C), utilizando una sonda de 13 mm (Sonifer® SFX250, BRANSON®) con profundidad de 2.5 cm, volumen de solvente de 200 mL, relación solvente-sólido (10:1.5), frecuencia de 20 KHz, potencia de 250 W y pulsos intermitentes de 5 s ON / 5 s OFF (Hossain et al., 2012). Los factores variables fueron el tiempo de extracción (3, 6 y 9 min), el porcentaje de amplitud de onda (20, 30 y 40 %) y la relación de solventes agua/metanol (100/0, 60/40 y 20/80 v/v).

Contenido de fenoles totales

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 25 µL de extracto a una concentración de 0.1 mg·mL⁻¹ por triplicado, luego se añadieron 80 µL de agua destilada y 5 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 2 N. La placa se tapó y se agitó durante 5 min, después se añadieron 80 µL de Na₂CO₃ al 7 % a cada pozo. Las muestras reposaron durante 30 min y se leyó su absorbancia a 765 nm (ELISA SYNERGY HT, Microplate Reader BioTek; Winooski, VT, EE. UU.). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido clorogénico por mg de extracto.

Contenido de flavonoides

En una microplaca transparente de 96 pozos se colocaron 20 µL de extracto a 0.1 mg·mL⁻¹ y, posteriormente, 7.5 µL de NaNO₂ al 5 %, 15 µL de AlCl₃ al 10 %, 50 µL de NaOH 1 M y 157 µL de agua destilada se añadieron en cada pozo. La placa se agitó durante 1 min y se dejó reposar en la oscuridad durante 5 min. Después, se leyó la absorbancia a 570 nm como se indicó anteriormente. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina por mg de extracto.

chromatograph Acquity UPLC® (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a mass spectrometer (UPLC/MS) was used with a negative electrospray ionization module (ESI). A reversed phase ZORBAX RRHD Eclipse XDB-C18 column (2.1 x 150 mm, 1.8 µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used and maintained at 30 °C. Mobile phases, 7.5 mM formic acid in deionized water (Phase A) and acetonitrile (Phase B) were used at 0.21 mL·min⁻¹ and 20 min total run time. Binary gradient program was: 0 min, 97 % A; 1.88 min, 91 % A; 5.66 min, 84 % A; 16.9 min, 50 % A; 19.62 to 20 min, 97 % A (Díaz-Rivas et al., 2018).

The mass spectrometer was set at 150 °C, a solvation temp 450 °C, cone gas flow 151 L·h⁻¹ and N₂ flow 796 L·h⁻¹. Methanol was used as co-solvent with 0.1 % of formic acid. Multiple reactions ionization mode was used for MS/MS assays at capillary voltage 2.5 kV, desolvation temp 400 °C, source temp 150 °C, desolvation gas flow 800 L·h⁻¹ and cone gas flow 150 L·h⁻¹; the collision gas flow was 0.13 mL·min⁻¹, the MS mode collision energy, 5.0 and the MS/MS mode collision energy, 20.0. The injection volume was 1 µL. The abundance of phenolic acids and flavonoids was calculated by calibration curves of various standards and expressed in µg·g⁻¹.

Identification of methylxanthines by UPLC-ESI-QqQ-MS/MS

An ACQUITY HPLC® coupled to mass (UPLC/MS-MS) spectrometer was used in positive electrospray ionization module (ESI⁺) and a triple quadrupole detector. An ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 µm column was used at 40 °C, samples kept at 6 °C, and injection volume at 1 µL. The extracts were prepared at 10 mg·mL⁻¹ dissolved in UPLC grade methanol. A binary mobile phase was used with solvents A (0.1 % formic acid in water) and B (0.1 % formic acid in methanol) at 0.3 mL·min⁻¹ and 12 min of total run time. Elution gradient was: 0 min, 99 % A; 1.5 min, 95 % A; 3 min, 80 % A; 5.5 min, 45 % A; 5.8 min, 2 % A; 7.6 to 12 min, 99 % A. MS parameters: source temp, 150 °C; solvation temp, 450 °C; cone voltage, 30 V; cone gas flow, 150 L·h⁻¹; and N₂ flow, 800 L·h⁻¹. Fragmentation patterns for 1,3,7-trimethylxanthine (caffeine), 1,3-dimethylxanthine (theophylline) and 3,7-dimethylxanthine (theobromine) were evaluated as Huck, Guggenbichler, and Bonn (2005). The abundance calculations were carried out through curves identifying peaks and reported in mg·g⁻¹.

Antioxidant activity by the absorbance capacity of oxygen radicals (ORAC)

In a 96-well dark microplate, 20 µL of extract prepared at 0.01 mg·mL⁻¹ in phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) and 200 µL of fluorescein at 1.09 µM were added and allowed to incubate for 15 min at 37 °C. After

Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

Los extractos se prepararon a 10 mg·mL⁻¹ disueltos en metanol para HPLC. Se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución Acquity HPLC® (Waters, Milford, MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC/MS) con un módulo de ionización por electrospray negativo (ESI). Se utilizó una columna ZORBAX RRHD Eclipse XDB-C18 de fase inversa (2.1 x 150 mm, 1.8 µm) (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) y se mantuvo a 30 °C. Se utilizaron las fases móviles 7.5 mM de ácido fórmico en agua desionizada (fase A) y acetonitrilo (fase B) a 0.21 mL·min⁻¹ y 20 min de tiempo total de ejecución. El programa de gradiente binario fue: 0 min, 97 % A; 1.88 min, 91 % A; 5.66 min, 84 % A; 16.9 min, 50 % A; 19.62 a 20 min, 97 % A (Díaz-Rivas et al., 2018).

El espectrómetro de masas se ajustó a 150 °C, temperatura de solvatación de 450 °C, flujo de gas de cono de 151 L·h⁻¹ y flujo de N₂ de 796 L·h⁻¹. Como cosolvente se usó metanol con 0.1 % de ácido fórmico. Se utilizó el modo de ionización de reacciones múltiples para los ensayos LC-MS/MS a un voltaje capilar de 2.5 kV, temperatura de desolvatación de 400 °C, temperatura de la fuente de 150 °C, flujo de gas de desolvatación de 800 L·h⁻¹ y flujo de gas de cono de 150 L·h⁻¹; el flujo de gas de colisión fue de 0.13 mL·min⁻¹, energía de colisión de modo MS de 5.0 y la energía de colisión de modo MS/MS de 20.0. El volumen de inyección fue de 1 µL. La abundancia de ácidos fenólicos y flavonoides se calculó mediante curvas de calibración de varios estándares y se expresaron en µg·g⁻¹.

Identificación de metilxantinas HPLC-ESI-MS/MS

Se utilizó un espectrómetro ACQUITY HPLC® con acoplamiento de masa (HPLC/MS-MS) en módulo de ionización por electrospray positivo (ESI⁺) y un detector de triple cuadrupolo. Se utilizó una columna ACQUITY HPLC® HSS T3 de 1.8 µm a 40 °C; las muestras se mantuvieron a 6 °C y el volumen de inyección a 1 µL. Los extractos se prepararon a 10 mg·mL⁻¹ disueltos en metanol para HPLC. Se utilizó una fase móvil binaria con solventes A (ácido fórmico a 0.1 % en agua) y B (ácido fórmico a 0.1 % en metanol) a 0.3 mL·min⁻¹ y 12 min de tiempo total de ejecución. El gradiente de elución fue: 0 min, 99 % A; 1.5 min, 95 % A; 3 min, 80 % A; 5.5 min, 45 % A; 5.8 min, 2 % A; 7.6 a 12 min, 99 % A. Los parámetros de MS fueron temperatura de la fuente, 150 °C; temperatura de solvatación, 450 °C; voltaje del cono, 30 V; flujo de gas del cono, 150 L·h⁻¹; y flujo de N₂, 800 L·h⁻¹. Los patrones de fragmentación para 1,3,7-trimetilxantina (cafeína), 1,3-dimetilxantina (teofilina) y 3,7-dimetilxantina (teobromina) se evaluaron como lo indican Huck, Guggenbichler, y Bonn (2005). La abundancia se calculó mediante curvas de identificación de picos y se expresaron en mg·g⁻¹.

incubation, a first reading was taken, then 75 μL of 2,2-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) were added to each well, and the plate was read at intervals of 210 s during 120 min at 485 nm for excitation and 580 nm for emission wavelengths. The area under the curve was acquired by SigmaPlot® ver 12.0 software and analyzed (Systat Software Inc., 2014). PBS was used as a blank and results were expressed in μM Trolox equivalents per mg extract.

Antioxidant capacity determined by the Nitric Oxide Assay

Scavenging activity of NO was determined using sodium nitroprusside (SNP) as the NO donor. In test tubes, 1000 μL of extract/solvent at 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ were mixed with 200 μL of 113 mM SNP and mixture incubated for 2 h. Subsequently, 100 μL of each mixture were transferred to wells of a 96-well transparent microplate and mixed with 100 μL of modified Griess reagent (Sigma-Aldrich). The plate was stirred for 15 min at 25 °C and absorbance read at 546 nm, reporting the inhibition percentage.

Antioxidant activity by the scavenging capacity of the radical ABTS

In 96-well transparent microplates, 10 μL of extract in saline phosphate buffer (pH 7.4, 0.75 M) were mixed with 190 μL ABTS (2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] radical) prepared 16 h prior to test. The plate was stirred, allowed to stand for 10 min and absorbance read at 750 nm. Results were expressed as mg of Trolox equivalents per mg of extract.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The radical was prepared by mixing 400 mM acetate buffer, 30 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) and 60 mM ferric chloride hexahydrate at 1:1:10 (v/v/v). In a 96-well transparent microplate, 10 μL of extract at 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 190 μL of reagent mixture were mixed, stirred, and left to stand for 20 min in darkness. The absorbance was read at 593 nm. Results were expressed as mM Trolox equivalent per mg of extract.

Cell culture experiments

Cell culture

Human colon adenocarcinoma cell line HT-29 was grown in RPMI-1640 medium with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % penicillin-streptomycin in 100 mm Petri plates and incubated at 37 °C and 5 % CO_2 humidified atmosphere. The medium was changed every other day.

Actividad antioxidante por capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

En una microplaca oscura de 96 pozos se añadieron 20 μL de extracto preparado a 0.01 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con pH 7.4 y 200 μL de fluoresceína a 1.09 μM y se dejaron incubar por 15 min a 37 °C. Después de la incubación se tomó una primera lectura, luego se añadieron 75 μL de dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH) a cada pozo, y la placa se leyó a intervalos de 210 s durante 120 min a 485 nm para excitación y 580 nm para longitudes de onda de emisión. El área bajo la curva se obtuvo con el *software* SigmaPlot® versión 12.0 (Systat Software Inc., 2014). Se utilizó PBS como blanco y los resultados se expresaron en μM equivalentes de trolox por mg de extracto.

Capacidad antioxidante determinada por ensayo de óxido nítrico

La actividad de barrido de ON se determinó utilizando nitroprusiato de sodio (SNP) como donante de ON. En tubos de ensayo, 1000 μL de extracto/solvente a 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se mezclaron con 200 μL de 113 mM de SNP y la mezcla se incubó durante 2 h. Posteriormente, se transfirieron 100 μL de cada mezcla a pozos de una microplaca transparente de 96 pozos y se mezclaron con 100 μL de reactivo de Griess modificado (Sigma-Aldrich). La placa se agitó durante 15 min a 25 °C y la absorbancia se leyó a 546 nm, reportando el porcentaje de inhibición.

Actividad antioxidante por capacidad de barrido del radical ABTS

En microplacas transparentes de 96 pozos se mezclaron 10 μL de extracto en solución salina de fosfato (pH 7.4, 0.75 M) con 190 μL de ABTS (radical 2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) preparado 16 h antes del ensayo. La placa se agitó y se dejó reposar durante 10 min, después la absorbancia se leyó a 750 nm. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de trolox por mg de extracto.

Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

El radical se preparó mezclando 400 mM de solución tampón de acetato, 30 mM de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) y 60 mM de cloruro férrico hexahidratado al 1:1:10 (v/v/v). En una microplaca transparente de 96 pozos se mezclaron 10 μL de extracto a 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 190 μL de mezcla de reactivos, se agitó y se dejó reposar durante 20 min en la oscuridad. La absorbancia se leyó a 593 nm. Los resultados se expresaron como mM equivalente de trolox por mg de extracto.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of infusion and *Coffea* leaves extracts on HT-29 cells was evaluated by the trypan blue staining method. Cells were seeded into 24-well plates at 30 000 cells per well in 0.5 mL RPMI 1640 medium with 10 % FBS and antibiotics. The HT-29 cells were treated by samples at 5, 10, 30, 100, 200, 500, 1 000, 10 000 and 15 000 ng·mL⁻¹ for 24 h. Later, they were washed with PBS, added with 0.015 % trypsin dissolved in EDTA and incubated 10 min. Trypsin was neutralized with 0.35 mL RPMI with FBS. Live cells were counted in a Neubauer camera by the trypan blue staining method and result expressed as the mean inhibitory concentration (IC₅₀) in µg·mL⁻¹.

Measurement of reactive oxygen species induced by H₂O₂

Cells were seeded into 96-well dark plates at 9600 cells per well in 0.2 mL RPMI with 10 % SFB and as antibiotics, streptomycin sulfate (0.6 mg·mL⁻¹) and penicillin (1 mg·mL⁻¹), incubated for 72 h at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were incubated with 200 µL of extracts at 50 ng·mL⁻¹ for 4 h. Later, cells were loaded with dichlorofluorescein-diacetate (10 mM) and incubated for 15 min at 37 °C, then washed with PBS and exposed to H₂O₂ (100 mM) for 1 h. Fluorescence was then measured at 37 °C at 485/530 nm excitation/emission wavelengths, respectively.

Statistical analysis

To reduce number of experimental runs, energy, and materials involved, an experimental design based on D-optimal criterium was used with ten different combinations, comprising all experimental variables as shown in Table 1. Results were expressed as the mean ± standard deviation. Data were analyzed by one-way ANOVA and differences among treatments were determined by comparison of means by Fisher tests with a statistical significance of $P < 0.05$ using the statistical program Minitab version 7 (Minitab Inc., 2009). The principal components analysis (PCA) was performed in the XLSTAT program.

Results and discussion

Phytochemical identification

The extractions of *Coffea* leaves were carried out by ultrasound assistance and infusions (conventionally). The content of total phenols and flavonoids in extractions is shown in Figure 1, which shows that the infusion had the highest concentration of total phenolic compounds. Flavonoids accounted for approximately 20 to 40 % of the total phenolic content.

Experimentos de cultivo celular

Cultivo celular

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 se cultivó en medio RPMI-1640 con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de penicilina-estreptomicina en placas Petri de 100 mm y se incubó a 37 °C y en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. El medio se cambió cada dos días.

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de la infusión y de los extractos de las hojas de *Coffea* en las células HT-29 se evaluó mediante el método de tinción con azul tripán. Las células se sembraron en placas de 24 pozos con 30 000 células por pozo en 0.5 mL de medio RPMI 1640 con 10 % de FBS y antibióticos. Las células HT-29 se trataron con muestras a 5, 10, 30, 100, 200, 500, 1 000, 10 000 y 15 000 ng·mL⁻¹ durante 24 h. Posteriormente, se lavaron con PBS, se añadieron con tripsina al 0.015 % disuelta en EDTA y se incubaron 10 min. La tripsina se neutralizó con 0.35 mL de RPMI con FBS. Las células vivas se contaron en una cámara Neubauer mediante el método de tinción con azul tripán y el resultado se expresó como concentración inhibitoria media (IC₅₀) en µg·mL⁻¹.

Medición de especies reactivas de oxígeno inducidas por H₂O₂

Las células se sembraron en placas oscuras de 96 pozos con 9600 células por pozo en 0.2 mL de RPMI con 10 % de SFB y, como antibióticos, sulfato de estreptomina (0.6 mg·mL⁻¹) y penicilina (1 mg·mL⁻¹), incubadas durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se mantuvieron con 200 µL de extractos a 50 ng·mL⁻¹ durante 4 h. Posteriormente, las células se cargaron con diclorofluoresceína-diacetato (10 mM) y se incubaron durante 15 min a 37 °C; luego se lavaron con PBS y se expusieron a H₂O₂ (100 mM) durante 1 h. Finalmente, la fluorescencia se midió a 37 °C a 485/530 nm de longitud de onda de excitación/emisión, respectivamente.

Análisis estadístico

Para reducir el número de ejecuciones experimentales, energía y materiales correspondientes, se utilizó un diseño experimental basado en el criterio D-óptimo con 10 combinaciones que comprendieron todas las variables experimentales, como se muestra en el Cuadro 1. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía y las diferencias entre tratamientos se determinaron por comparación de medias mediante pruebas de Fisher con una significación estadística de $P < 0.05$, utilizando el

Table 1. Experimental conditions for the D-optimal design in the ultrasound-assisted extraction of *Coffea* leaves.Cuadro 1. Condiciones experimentales para el diseño D-óptimo en extracción asistida por ultrasonido de hojas de *Coffea*.

Extract sample/ Extracto muestra	Extraction condition/ Condición de extracción	Ratio of water/ methanol (%) / Relación agua/ metanol (%)	Extraction time (min) / Tiempo de extracción (min)	Amplitude (%) / Amplitud (%)
1	20-3-20	20/80	3	20
2	100-3-20	100/0	3	20
3	100-9-20	100/0	9	20
4	40-3-30	60/40	3	30
5	100-6-30	100/0	6	30
6	20-9-30	20/80	9	30
7	20-3-40	20/80	3	40
8	100-3-40	100/0	3	40
9	60-6-40	60/40	6	40
10	100-9-40	100/0	9	40

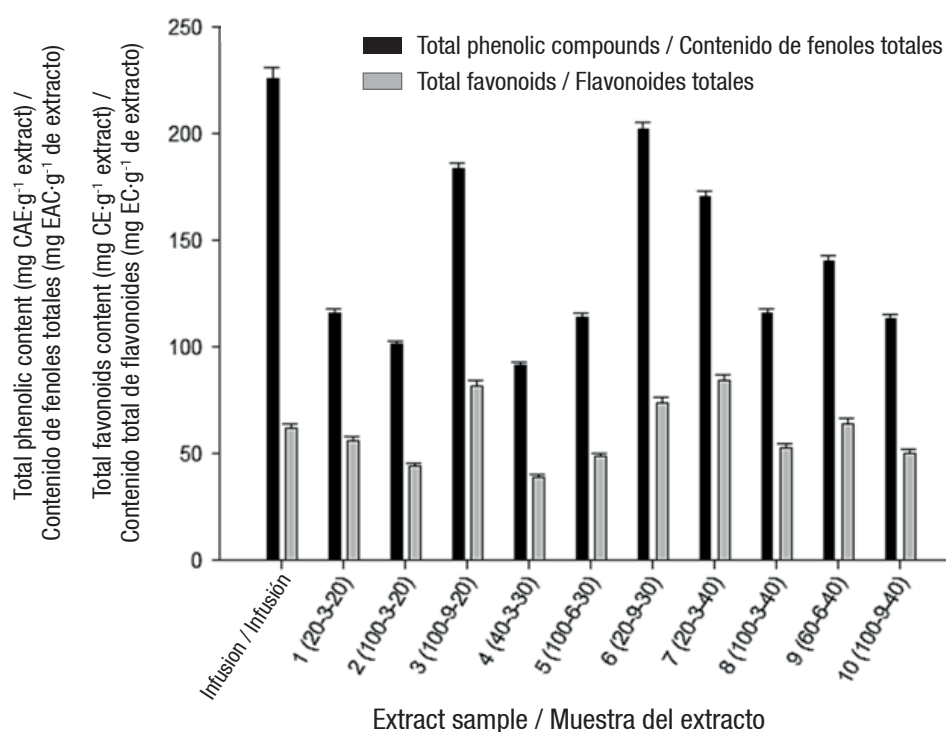


Figure 1. Total phenolic and flavonoids contents in infusion and extracts of *Coffea* leaves. Infusion: 1 g of ground material into 100 mL of distilled water at 80 °C and left for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). CAE: chlorogenic acid equivalents; CE: catechin equivalents. Different letters mean significant differences (Fisher $P = 0.05$).

Figura 1. Contenido de fenoles totales y flavonoides en infusión y extractos de hojas de *Coffea*. Infusión: 1 g de material molido en 100 mL de agua destilada a 80 °C, reposado durante 10 min. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). EAC: equivalentes de ácido clorogénico; EC: equivalentes de catequina. Literales distintas indican diferencias significativas (Fisher $P = 0.05$).

This determination is influenced by the ability of the Folin-Ciocalteu reagent to interact with the reducing compounds in the sample; therefore, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) was used for more precise identification.

Phenolic acids, flavonoids and xanthone mangiferin were identified (Table 2). Aqueous extracts 2, 3, 5, 8, 10 and the infusion showed lower contents of specific flavonoid compounds ($>197.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), particularly flavanols such as catechin, procyanidin and mangiferin, when compared to the hydroalcoholic extracts 1, 4, 6, 7 and 9 ($<274.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); however, mangiferin in extracts was twice as much ($>54.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) as that found in infusions ($25.8 \pm 0.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). In contrast, higher concentrations of phenolic acids (735.6 to $899.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) were found in all extracts obtained with ultrasound assistance compared with the infusion ($597.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Table 3). No significant differences were observed between aqueous extracts and the water/methanol mixtures. The group of hydroxycinnamic acids was the predominant, with quinic, 3-4/4-5 dicaffeoylquinic and chlorogenic acids as the major compounds identified in both infusion and extracts.

The amounts of caffeine in *Coffea* leaves samples are shown in Figure 2. Except for extract 9 (ratio of water/methanol [60/40 %] - extraction time [6 min] - amplitude [40 %]), the infusion exceeded the content of these compounds over the rest of extracts. A cup of coffee contains about 137 mg caffeine (Setiawan et al., 2015), and based on our results, one cup of *Coffea* leaves infusion has about 1.4 mg. A decrease in the concentration of caffeine has been reported in extracts obtained by ultrasound assistance, possibly due to its degradation by the sonication effect (Guglielmetti, D'Ignoti, Ghirardello, Belviso, & Zeppa, 2017). Theophylline and theobromine were low in all samples.

Different phenolic compounds and alkaloids such as caffeine have already been previously reported in *Coffea* leaves (Ratanamarno & Subkar, 2017), and many of these phytochemicals may be related to therapeutic properties. Particularly, chlorogenic acid and mangiferin exhibit important pharmacological effects such as anti-diabetic, anti-lipidemic (Ong, Hsu, & Tan, 2013), anti-inflammatory (Hwang, Kim, Park, Lee, & Kim, 2014), anti-carcinogenic (Ebkatan, Li, Ghorbani, Azadi, & Kubow, 2018; Yamagata, Izawa, Onodera, & Tagami, 2018) and increased antioxidant capacity (Shi et al., 2016).

In this work, identification of two flavanones have been reported for the first time in *Coffea* leaves: neohesperidin and naringenin. Their detection was possible mainly in extracts using sonication and hydroalcoholic solvents (extracts 1, 4, 6, 7 and 9). These compounds

programa Minitab versión 7 (Minitab Inc., 2009). El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con el programa XLSTAT.

Resultados y discusión

Identificación fitoquímica

Las extracciones de hojas de *Coffea* se realizaron con ultrasonidos e infusiones (forma convencional). El contenido de fenoles totales y flavonoides en las extracciones se muestra en la Figura 1, en la cual se observa que la infusión tuvo la mayor concentración de compuestos fenólicos totales. Los flavonoides representaron aproximadamente 20 a 40 % del contenido de fenoles totales. Esta determinación está influenciada por la capacidad del reactivo Folin-Ciocalteu de interactuar con los compuestos reductores de la muestra; por ello, para una identificación más precisa se utilizó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Se identificaron ácidos fenólicos, flavonoides y xantona mangiferina (Cuadro 2). Los extractos acuosos 2, 3, 5, 8, 10 y la infusión tuvieron contenidos más bajos de compuestos flavonoides específicos ($>197.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), especialmente flavanoles como la catequina, procianidina y mangiferina en comparación con los extractos hidroalcohólicos 1, 4, 6, 7 y 9 ($<274.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); sin embargo, la mangiferina en los extractos fue el doble ($>54.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) que la encontrada en infusiones ($25.8 \pm 0.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Por el contrario, se encontraron concentraciones más elevadas de ácidos fenólicos (735.6 a $899.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en todos los extractos obtenidos con ultrasonido en comparación con la infusión ($597.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Cuadro 3). No se observaron diferencias significativas entre extractos acuosos y mezclas de agua/metanol. El grupo de ácidos hidroxycinnámicos fue el predominante con ácidos quínico, 3-4/4-5 dicaffeoilquínico y clorogénico como los principales compuestos identificados tanto en la infusión como en los extractos.

Las cantidades de cafeína en las muestras de hojas de *Coffea* se ilustran en la Figura 2. A excepción del extracto 9 (relación agua/metanol [60/40 %] - tiempo de extracción [6 min] - amplitud [40 %]), la infusión superó el contenido de cafeína con respecto al resto de los extractos. Una taza de café contiene aproximadamente 137 mg de cafeína (Setiawan et al., 2015) y, según los resultados, una taza de infusión de hojas de *Coffea* tiene alrededor de 1.4 mg. Se ha informado de una disminución de la concentración de cafeína en los extractos obtenidos por asistencia de ultrasonido, probablemente debido a su degradación por efecto de sonicación (Guglielmetti, D'Ignoti, Ghirardello, Belviso, & Zeppa, 2017). La teofilina y la teobromina fueron bajas en todas las muestras.

Table 2. Flavonoid compounds identified in extracts of *Coffea* leaves obtained by ultrasound assistance under different conditions. Cuadro 2. Compuestos flavonoides identificados en extractos de hojas de *Coffea* obtenidos por asistencia de ultrasonido en diferentes condiciones.

Compound ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ extract*) / Compuesto ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ extracto*)	Extract 1 20-3-20/ Extracto 1 20-3-20	Extract 2 100-3-20/ Extracto 2 100-3-20	Extract 3 100-9-20/ Extracto 3 100-9-20	Extract 4 60-3-30/ Extracto 4 60-3-30	Extract 5 100-6-30/ Extracto 5 100-6-30	Extract 6 20-9-30/ Extracto 6 20-9-30	Extract 7 20-3-40/ Extracto 7 20-3-40	Extract 8 100-3-40/ Extracto 8 100-3-40	Extract 9 60-6-40/ Extracto 9 60-6-40	Extract 10 100-9-40/ Extracto 10 100-9-40
Naringenin/ Naringenina	traces /trazas	traces /trazas	traces /trazas	6.49 \pm 2.6 bc	traces /trazas	8.38 \pm 3.4 ab	10.0 \pm 4.0 ab	traces /trazas	17.52 \pm 7.1 a	6.10 \pm 2.5 b
Neohesperidin/ Neohesperidina	traces /trazas	0.19 \pm 0.1 a	0.26 \pm 0.1 a	0.13 \pm 0.0 a	0.25 \pm 0.1 a	0.18 \pm 0.1 a	0.15 \pm 0.1 a	0.18 \pm 0.1 a	0.16 \pm 0.1 a	0.13 \pm 0.0 a
Catechin/ Catequina	3.02 \pm 0.12 a	1.19 \pm 0.3 cd	0.28 \pm 0.1d	2.42 \pm 0.6 abc	1.21 \pm 0.3 bcd	2.92 \pm 0.7 a	2.27 \pm 0.6 abc	0.57 \pm 0.1 d	2.64 \pm 0.7 ab	0.41 \pm 0.1 d
Epicatechin/ Epicatequina	10.6 \pm 0.52 b	13.82 \pm 2.4 b	11.16 \pm 1.9 b	29.71 \pm 5.2 a	9.29 \pm 1.6 b	32.19 \pm 5.6 a	33.20 \pm 5.8 a	13.14 \pm 2.3 b	28.22 \pm 4.9 a	8.08 \pm 1.4 b
Procyanidin B1/ Procianidina B1	13.94 \pm 2.13 e	0.67 \pm 0.1 a	0.96 \pm 0.2 d	1.32 \pm 0.3 bcd	0.77 \pm 0.2 d	2.42 \pm 0.5 a	2.41 \pm 0.5 a	0.72 \pm 0.1 d	1.71 \pm 0.3 abc	0.57 \pm 0.1 d
Procyanidin B2/ Procianidina B2	14.03 \pm 2.15 bc	17.70 \pm 5.8 abc	16.51 \pm 5.4 abc	39.07 \pm 12.8 b	12.94 \pm 4.2 c	40.35 \pm 3.2 abc	41.02 \pm 13.4 abc	16.91 \pm 5.5 bc	43.80 \pm 14.3 ab	13.66 \pm 4.5 bc
Quercetin/ Quercetina	0.18 \pm 0.06 c	0.10 \pm 0.0 c	0.12 \pm 0.0 c	1.19 \pm 0.2 ab	0.10 \pm 0.0 c	0.43 \pm 0.1 c	0.27 \pm 0.0 c	0.11 \pm 0.0 c	2.34 \pm 0.4 a	0.16 \pm 0.0 c
Quercetin 3-O-glucoside/ Quercetina 3-O-glucósido	11.98 \pm 0.14 d	30.88 \pm 3.9 abc	23.68 \pm 3.0 c	36.18 \pm 4.5 ab	30.74 \pm 3.8 abc	36.16 \pm 4.5 ab	31.76 \pm 4.0 abc	25.71 \pm 3.2 bc	40.67 \pm 5.1 a	31.07 \pm 3.9 abc
Rutin/ Rutina	21.76 \pm 0.17 c	63.52 \pm 9.5 b	66.66 \pm 10 ab	87.05 \pm 13 a	82.99 \pm 12.4 ab	78.53 \pm 11.7 ab	71.68 \pm 10.7 ab	70.56 \pm 10.5 ab	97.47 \pm 14.6 a	79.00 \pm 11.8 ab
Kaempferol 3-O-glucoside/ Kaempferol 3-O-glucósido	0.84 \pm 0.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mangiferin/ Mangiferina	25.8 \pm 0.12 c	82.66 \pm 3.7 a	53.45 \pm 2.4 b	78.25 \pm 3.5 a	58.56 \pm 2.6 b	84.06 \pm 3.7 a	81.71 \pm 3.6 a	56.51 \pm 2.5 b	78.80 \pm 3.5 a	54.44 \pm 2.4 b
Total	97.04 c	274.84 a	177.45 b	281.79 a	196.83 b	285.61 a	274.45 a	184.45 b	313.31 a	193.61 b

Infusion: 1 g of ground material to 100 mL of 80 °C distilled water and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). Values in rows that show different letters are statistically different (Fisher, $P = 0.05$), nd: not detected (outside the detection limit of the equipment 0.0001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of extract). *Dry basis. Traces <0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 minutos. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). Valores en filas con letras distintas son estadísticamente diferentes (Fisher, $P = 0.05$), nd: no detectado (fuera del límite de detección del equipo 0.0001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de extracto). *Base seca. Trazas <0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Table 3. Phenolic acids identified in extracts of *Coffea* leaves obtained by ultrasound assistance under different conditions. Cuadro 3. Ácidos fenólicos identificados en extractos de hojas de *Coffea* obtenidos por asistencia de ultrasonido en diferentes condiciones.

Compound ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ extract*)/ Compuesto ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ extracto*)	Infusión / Infusión	Extract 1 20-3-20 / Extracto 1 20-3-20	Extract 2 100-3-20 / Extracto 2 100-3-20	Extract 3 100-9-20 / Extracto 3 100-9-20	Extract 4 60-3-30 / Extracto 4 60-3-30	Extract 5 100-6-30 / Extracto 5 100-6-30	Extract 6 20-9-30 / Extracto 6 20-9-30	Extract 7 20-3-40 / Extracto 7 20-3-40	Extract 8 100-3-40 / Extracto 8 100-3-40	Extract 9 60-6-40 / Extracto 9 60-6-40	Extract 10 100-9-40 / Extracto 10 100-9-40
Hydroxybenzoic acids / Ácidos hidroxibenzoicos											
Benzoic acid / Ácido benzoico	0.475 ± 0.04 f	3.69 ± 0.15 bcd	3.86 ± 0.15 bc	3.02 ± 0.12 e	3.52 ± 0.14 cd	4.05 ± 0.16 ab	3.89 ± 0.15 bc	3.82 ± 0.15 bcd	4.32 ± 0.17 a	3.08 ± 0.12 e	3.41 ± 0.13 de
4-hydroxybenzoic /salicylic acid/ Ácido 4-hidroxibenzoico/ salicílico	0.115 ± 0.00 b	0.57 ± 0.08 a	0.52 ± 0.08 a	0.49 ± 0.07 a	0.44 ± 0.06 a	0.50 ± 0.07 a	0.60 ± 0.09 a	0.48 ± 0.07 a	0.51 ± 0.07 a	0.42 ± 0.06 a	0.59 ± 0.09 a
2,5 dihydroxybenzoic acid/ ácido 2,5 dihidroxibenzoico	0.035 ± 0.00 c	0.10 ± 0.01 ab	0.08 ± 0.01 b	0.06 ± 0.01 b	0.07 ± 0.01 b	0.09 ± 0.01 ab	0.07 ± 0.01 b	0.12 ± 0.02 a	0.07 ± 0.01 b	0.06 ± 0.01 b	0.09 ± 0.01 ab
2,4,6 trihydroxy- benzaldehyde acid/ Ácido 2,4,6 trihidroxibenzoico	0.085 ± 0.02 b	0.03 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 a
Protocatechuic acid/ Ácido protocatequico	0.05 ± 0.00 e	1.82 ± 0.09 a	1.64 ± 0.08 ab	1.62 ± 0.08 abc	1.20 ± 0.06 abc	1.51 ± 0.08 bc	1.81 ± 0.09 a	1.82 ± 0.09 a	1.65 ± 0.09 ab	1.37 ± 0.07 cd	1.57 ± 0.08 abc
Vanillic acid / Ácido vanílico	5.84 ± 1.56 f	23.58 ± 1.56 cd	26.67 ± 1.7 bc	26.32 ± 1.74 bc	18.15 ± 1.2 bc	25.18 ± 1.66 c	33.12 ± 2.19 a	22.0 ± 1.45 cde	22.89 ± 1.51 cde	19.41 ± 1.28 de	30.53 ± 2.01 ab
Gallic acid / Ácido gallico	1.38 ± 0.13 e	14.92 ± 3.51 a	2.62 ± 0.62 d	3.54 ± 0.83 bcd	9.65 ± 2.27 bcd	3.83 ± 0.90 bcd	14.55 ± 3.42 a	11.81 ± 2.78 a	3.48 ± 0.82 cd	9.13 ± 2.15 abc	3.29 ± 0.77 cd
Shikimic acid / Ácido shikímico	5.74 ± 0.03 bcd	5.13 ± 0.18 de	5.49 ± 0.20 cde	5.49 ± 0.20 cde	5.84 ± 0.21 cde	6.29 ± 0.23 ab	5.71 ± 0.20 bcd	5.20 ± 0.19 de	5.48 ± 0.20 cde	5.06 ± 0.18 e	6.31 ± 0.23 a
Syringic acid / Ácido siríngico	0.075 ± 0.00 e	0.34 ± 0.03 bc	0.29 ± 0.03 bcd	0.37 ± 0.03 b	0.25 ± 0.02 b	0.34 ± 0.03 bc	0.32 ± 0.03 bcd	0.30 ± 0.03 bdc	0.36 ± 0.03 bc	0.27 ± 0.02 cd	0.47 ± 0.04 a
Ellagic acid / Ácido eláxico	0.73 ± 0.03 b	0.82 ± 0.05 a	0.71 ± 0.04 b	0.36 ± 0.02 d	0.16 ± 0.01 d	0.49 ± 0.03 c	0.90 ± 0.06 a	0.36 ± 0.02 d	0.53 ± 0.03 c	0.23 ± 0.01 e	0.55 ± 0.03 c

Infusión: 1 g of ground material to 100 mL of 80 °C distilled water and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). Values in rows that show different letters are statistically different according to Fisher with $P = 0.05$. *Dry basis. Traces <0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 minutos. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). Valores en filas con letras distintas son estadísticamente diferentes según Fisher con $P = 0.05$. *Base seca. Trazas <0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Table 3. Phenolic acids identified in extracts of *Coffea* leaves obtained by ultrasound assistance under different conditions. (cont.)
Cuadro 3. Ácidos fenólicos identificados en extractos de hojas de *Coffea* obtenidos por asistencia de ultrasonido en diferentes condiciones. (cont.)

Compound ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ extract ^a)/ Compuesto ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ extracto ^a)	Extract 1 20-3-20/ Extracto 1 20-3-20	Extract 2 100-3-20/ Extracto 2 100-3-20	Extract 3 100-9-20/ Extracto 3 100-9-20	Extract 4 60-3-30/ Extracto 4 60-3-30	Extract 5 100-6-30/ Extracto 5 100-6-30	Extract 6 20-9-30/ Extracto 6 20-9-30	Extract 7 20-3-40/ Extracto 7 20-3-40	Extract 8 100-3-40/ Extracto 8 100-3-40	Extract 9 60-6-40/ Extracto 9 60-6-40	Extract 10 100-9-40/ Extracto 10 100-9-40
Hydroxycinnamic acids / Ácidos hidroxicinámicos										
Trans-Cinnamic acid/ Ácido transcinámico	25.04 ± 1.31 d	54.99 ± 5.38 abc	41.30 ± 4.04 c	49.05 ± 4.8 bc	55.12 ± 5.4 abc	48.58 ± 4.75 bc	54.1 ± 5.28 abc	59.22 ± 5.79 ab	48.23 ± 4.71 bc	63.96 ± 6.25 a
Coumaric acid/ Ácido cumárico	0.25 ± 0.09 d	0.47 ± 0.03 ab	0.46 ± 0.03 ab	0.37 ± 0.02 c	0.52 ± 0.03 a	0.48 ± 0.03 ab	0.46 ± 0.03 ab	0.45 ± 0.03 abc	0.44 ± 0.02 bc	0.52 ± 0.03 a
Caffeic acid/ Ácido cafeico	traces/trazas	10.67 ± 0.53 ab	10.93 ± 0.54 ab	10.46 ± 0.52 ab	10.3 ± 0.51 ab	10.62 ± 0.53 ab	9.85 ± 0.49 ab	10.12 ± 0.50 ab	10.58 ± 0.53 ab	11.31 ± 0.56 a
Quinic acid/ Ácido quínico	519.35 ± 6.19 d	393.81 ± 8.1 abc	407.66 ± 8.35 a	381.22 ± 7.81 bc	396.1 ± 8.1 abc	410.95 ± 8.42 a	373.1 ± 7.64 c	412.78 ± 8.46 a	401.6 ± 8.23 ab	408.07 ± 8.36 a
Ferulic acid/ Ácido ferúlico	0.27 ± 0.04 d	0.41 ± 0.02 bc	0.51 ± 0.03 a	0.39 ± 0.02 bc	0.51 ± 0.03 a	0.49 ± 0.03 a	0.35 ± 0.02 c	0.53 ± 0.03 a	0.46 ± 0.03 ab	0.46 ± 0.03 ab
Synaptic acid/ Ácido sináptico	traces/trazas	0.30 ± 0.04 a	0.18 ± 0.03 b	0.32 ± 0.05 a	0.15 ± 0.02 b	0.31 ± 0.04 a	0.29 ± 0.04 a	0.18 ± 0.03 b	0.37 ± 0.05 a	0.18 ± 0.03 b
Caftaric acid/ Ácido caftárico	0.31 ± 0.08 b	14.81 ± 4.64 a	13.65 ± 4.28 a	11.31 ± 3.54 a	14.39 ± 4.51 a	15.59 ± 4.89 a	14.44 ± 4.53 a	14.69 ± 4.60 a	14.67 ± 4.60 a	11.86 ± 3.72 a
4-O-caffeoylquinic acid/ Ácido 4-O-cafeoilquínico	Traces	9.78 ± 0.72 ab	8.71 ± 0.64 b	10.37 ± 0.76 ab	9.28 ± 0.68 ab	10.05 ± 0.74 ab	9.14 ± 0.67 ab	8.77 ± 0.65 b	11.07 ± 0.82 a	8.78 ± 0.65 b
Chlorogenic acid/ Ácido clorogénico	1.32 ± 0.4 f	145.01 ± 4.56 a	116.02 ± 3.65 de	127.64 ± 4.0 bcd	125.4 ± 3.9 cde	138.39 ± 4.35 ab	133.0 ± 4.2 bc	118.16 ± 3.71 de	139.0 ± 4.37 ab	122.9 ± 3.86 cde
3,4/4,5 dicaffeoylquinic acid/ Ácido 3,4/4,5 dicafeoilquínico	36.13 ± 0.09 e	193.52 ± 9.46 bc	116.23 ± 5.68 d	215.1 ± 10.52 ab	102.0 ± 4.99 d	203.28 ± 9.94 ab	185.9 ± 9.09 c	107.15 ± 5.24 d	222.2 ± 10.87 a	110.96 ± 5.43 d
Total	597.15 f	874.75 ab	756.90 e	845.46 abc	756.09 e	899.69 a	826.60 bcd	771.32 de	887.66 ab	785.76 cde

Infusion: 1 g of ground material to 100 mL of 80 °C distilled water and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). Values in rows that show different letters are statistically different according to Fisher with $P = 0.05$. *Dry basis. Traces <0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 minutos. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). Valores en filas con letras distintas son estadísticamente diferentes según Fisher con $P = 0.05$. *Base seca. Trazas <0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

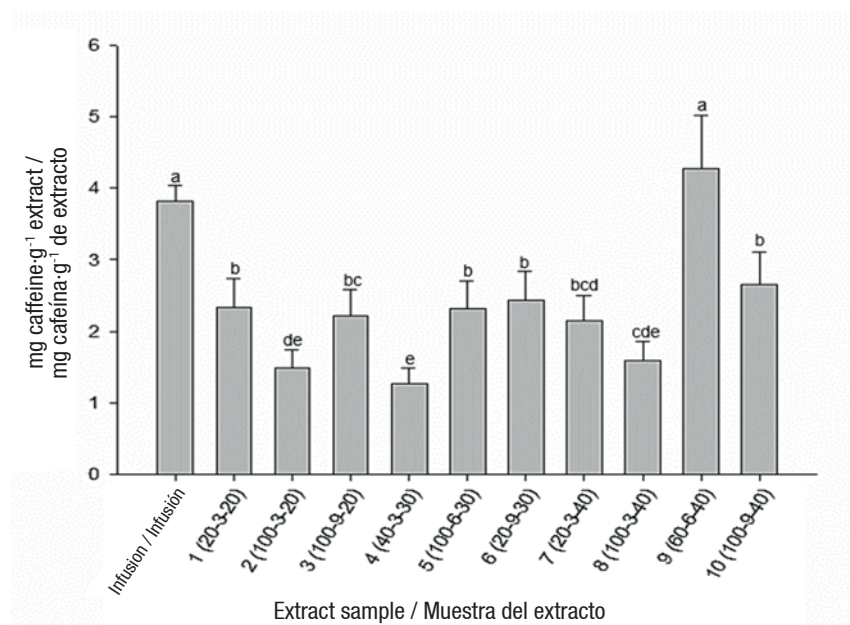


Figure 2. Total caffeine content in infusion and extracts of *Coffea* leaves. Infusion: 1 g of ground material into 100 mL of distilled water at 80 °C and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). Different letters mean significant differences (Fisher $P = 0.05$).

Figura 2. Contenido total de cafeína en la infusión y extractos de hojas de *Coffea*. Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 min. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). Letras distintas indican diferencias significativas (Fisher $P = 0.05$).

were also extracted with water, but at the largest amplitude and extraction times; thus, only at higher energy administered to the extract or in combination with methanol, was possible to get these flavanones. The aglycone naringenin and the glycoside form of hesperetin, neohesperidin are important flavanones. They have shown several functional properties, such as antioxidant, antiproliferative, antiviral, antiallergic, anti-inflammatory, anti-atherosclerotic and anticancer activities (Kim et al., 2011). Naringenin has been highly studied for its antidiabetic activity. Some mechanisms for this flavanone are its modulatory effects on insulin secretion and sensitivity, hepatic production, transporters, peripheral uptake, and intestinal glucose absorption, blood lipids and cholesterol biosynthesis, oxidative stress and inflammation (Joshi, Kulkarni, & Wairkar, 2018). Naringenin is a primary flavanone abundant in many citrus fruits such as oranges (1.47 to 11.15 mg·100 g⁻¹) and grapefruits (14.17 to 53 mg·100 g⁻¹) (Nogata et al., 2006); in this study, the highest concentration was 1.75 mg·100 g⁻¹ for extract 9.

Regarding phenolic acids, it was detected and identified a group of hydroxybenzoic acids not previously reported in coffee leaves, such as vanillic, shikimic, syringic, and ellagic acids, along with 2,4,6 trihydroxybenzaldehyde and 2,3 dihydroxybenzoic acid. Among them, vanillic acid was found in higher concentration and it is related

Varios compuestos fenólicos y alcaloides como la cafeína se han reportado previamente en las hojas de *Coffea* (Ratanamarno & Subkar, 2017) y muchos de estos fitoquímicos pueden estar relacionados con las propiedades terapéuticas. En particular, el ácido clorogénico y la mangiferina muestran importantes efectos farmacológicos como antidiabético, antilipídémico (Ong, Hsu & Tan, 2013), antiinflamatorio (Hwang, Kim, Park, Lee, & Kim, 2014), anticancerígeno (Ebkatan, Li, Ghorbani, Azadi, & Kubow, 2018; Yamagata, Izawa, Onodera, & Tagami, 2018) y aumento de capacidad antioxidante (Shi et al., 2016).

En este trabajo se ha señalado por primera vez la identificación de dos flavanonas en las hojas de *Coffea*: neohesperidina y naringenina. Su detección fue posible principalmente en los extractos realizados por sonicación y con disolventes hidroalcohólicos (extractos 1, 4, 6, 7 y 9). Dichos compuestos también se extrajeron con agua, pero con la mayor amplitud y tiempos de extracción; es decir, solo con mayor energía administrada al extracto o en combinación con metanol fue posible la obtención de estas flavanonas. La aglicona naringenina y la forma glucósida de hesperetina, neohesperidina son flavanonas importantes. Estas han mostrado varias propiedades funcionales como actividades antioxidantes, antiproliferativas, antivirales, antialérgicas, antiinflamatorias, antiateroscleróticas

to multiple pharmacological activities such as the inhibition of snake venom activity, plus antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties (Dhananjaya, Nataraju, Raghavendra Gowda, Sharat, & D'Souza, 2009; Tai, Sawano, & Ito, 2012).

Antioxidant Activity

Results from the antioxidant assays are shown in Table 4. The ABTS and FRAP assays essentially quantify the ability of the extract to neutralize a radical by single electron transfer (SET). However, the ABTS assay could also act under the mechanism of a hydrogen atom transfer (HAT). The ORAC and NO trials evaluate the HAT mechanism. The ABTS radical scavenging activity showed a positive and statistically significant correlation with the total phenolic (Pearson 0.754, $P = 0.007$) and the flavonoid contents (Pearson 0.854, $P = 0.001$).

Extract 6 (ratio of water/methanol [20/80 %] - extraction time [9 min] - amplitude [30 %]) showed the highest ABTS and FRAP values, while extract 9 (ratio of water/methanol [60/40 %] - extraction time [6 min] - amplitude [40 %]), the highest activity in ORAC and NO assays.

y anticancerígenas (Kim et al., 2011). La naringenina ha sido muy estudiada por su actividad antidiabética. Algunos mecanismos de esta flavanona son sus efectos moduladores sobre la secreción y la sensibilidad a la insulina; la producción hepática, los transportadores, la captación periférica y la absorción intestinal de glucosa; los lípidos sanguíneos y la biosíntesis del colesterol; así como el estrés oxidativo y la inflamación (Joshi, Kulkarni, & Wairkar, 2018). La naringenina es una flavanona primaria que abunda en muchos cítricos como las naranjas (1.47 a 11.15 mg·100 g⁻¹) y toronjas (14.17 a 53 mg·100 g⁻¹) (Nogata et al., 2006); en este estudio, la mayor concentración fue de 1.75 mg·100 g⁻¹ en el extracto 9.

En cuanto a los ácidos fenólicos, se identificó un grupo de ácidos hidroxibenzoicos no reportados previamente en las hojas de café, como los ácidos vanílico, shikímico, siríngico y elálgico, junto con el 2,4,6 trihidroxibenzaldehído y el ácido 2,3 dihidroxibenzoico. Entre estos, el ácido vanílico se encontró en mayor concentración y está relacionado con múltiples actividades farmacológicas como la inhibición de la actividad del veneno de serpiente, además de propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias

Table 4. Assays for the evaluation of *in vitro* antioxidant capacity in infusion and extracts of *Coffea* leaves.

Cuadro 4. Ensayos para la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* en infusión y extractos de hojas de *Coffea*.

Extract sample/ Muestra de extracto	Extraction conditions/ Condiciones de extracción	ABTS	FRAP	ORAC	NO
		mM TE·mg ⁻¹ extract/ ABTS mM TE·mg ⁻¹ extracto	mM TE·mg ⁻¹ extract/ FRAP mM TE·mg ⁻¹ extracto	mM·TE mg ⁻¹ extract/ ORAC mM·TE mg ⁻¹ extracto	(% inhibition)/ ON (% inhibición)
Infusion*/ Infusión*	-	180.71 ± 7.14 d	198.33 ± 23.09 bcd	166.17 ± 9.82 f	36.25 ± 2.46 g
1	20-3-20	178.81 ± 0.15 d	238.33 ± 21.53 a	112.56 ± 0.52 i	50.74 ± 2.03 b
2	100-3-20	120.95 ± 0.10 h	223.33 ± 20.17 ab	159.82 ± 0.74 g	42.67 ± 1.71 de
3	100-9-20	289.76 ± 0.26 b	126.66 ± 11.44 f	120.77 ± 0.56 h	45.32 ± 1.82 cd
4	40-3-30	86.42 ± 0.077 i	188.33 ± 17.01 cd	103.59 ± 0.48 j	40.64 ± 1.63 ef
5	100-6-30	144.52 ± 0.13 g	196.66 ± 17.76 bcd	156.32 ± 0.73 g	38.62 ± 1.55 fg
6	20-9-30	343.09 ± 0.31 a	218.33 ± 19.72 abc	182.92 ± 0.85 e	47.06 ± 1.88 c
7	20-3-40	230.71 ± 0.21 c	245.00 ± 22.13 a	197.85 ± 0.92 d	47.71 ± 1.91 bc
8	100-3-40	154.04 ± 0.14 f	150.00 ± 13.55 ef	232.84 ± 1.08 b	46.85 ± 1.88 c
9	60-6-40	165.47 ± 0.15 e	175.00 ± 15.81 de	259.05 ± 1.21 a	58.71 ± 2.35 a
10	100-9-40	152.14 ± 0.13 f	193.33 ± 17.46 bcd	214.82 ± 1.00 c	50.65 ± 2.03 b

*Infusion: 1 g of ground material to 100 mL of 80 °C distilled water and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). Values in same column with different letters are significantly different (Fisher $P = 0.05$). Assays: absorbance capacity of oxygen radicals (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), radical ABTS (2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]), nitric oxide (NO). TE: Trolox equivalent.

*Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 min. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). Valores en la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes (Fisher $P = 0.05$). Ensayos: capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), poder antioxidante férrico reductor (FRAP), radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]), óxido nítrico (ON). TE: equivalente de trolox.

Extract 9 showed a higher concentration of flavanones, flavonols and caffeine compared to extract 6. It has been reported that low concentrations of caffeine can favor an antioxidant effect by exerting strong trapping capacity of radical $\bullet\text{OH}$ (Petrucci, Zollo, Curulli, & Marrosu, 2018). However, recent research suggests that caffeine has no influence on the antioxidant capacity by assays based on the HAT mechanism (Petrucci et al., 2018). Extract 6 also showed a higher concentration of epicatechin and mangiferin than extract 9.

It is known that both oxidative and nitrosative stresses, due to various circumstances both intrinsic and extrinsic, induce biological mechanisms to lose control over free radicals with the consequent imbalance between oxidant conditions and cellular antioxidant defenses. It is therefore of interest to evaluate not only the antioxidant potential of a plant material, but also its anti-nitrosative capacity. The nitric oxide inhibitory potential of the evaluated extracts ranged 36-58 % and extract 9 was the most efficient scavenger against it.

Cell viability

Different concentrations of extracts and infusions were evaluated in HT-29 cultures and their IC_{50} 's obtained. Table 5 shows that IC_{50} values of all samples were below $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Based on these results, it was proposed a fixed concentration of extracts and infusions of $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (where the cell viability was 100 %) to assess their protective effect. Phytochemicals present in extracts and infusions at this low concentration were able to inhibit the stress generated in cells by exposure to H_2O_2 . Compared to 100 % stress in the positive control with H_2O_2 , all treatments were able to reduce the stress by 5.9–16 %, particularly extract 9 (Figure 3). The extraction conditions of process 9 favored an extract rich in mangiferin, which shows cellular protection by attenuating the expression of oxidative stress (Rocha, Bonet, Tambeli, de-Faria, & Parada, 2018).

Figure 4 illustrates a PCA of the response variables, and the extraction processes (ultrasound and infusion). On quadrant 1, a group with most of the responses can be observed and all the ultrasound extraction processes in which a hydroalcoholic medium (water/methanol) was used. In this group all the antioxidant responses (ON, ORAC, ABTS and FRAP) are related to hydroalcoholic extracts, as well as to the evaluation of oxidative stress in cells. Phenolic compounds with important therapeutic activity are also observed. The correlation between the observed responses as well as phytochemicals of biological importance, make these extraction conditions a good alternative for obtaining phenolic compounds with potential capacity as nutraceutical ingredients.

(Dhananjaya, Nataraju, Raghavendra Gowda, Sharat, & D'Souza, 2009; Tai, Sawano, & Ito, 2012).

Actividad antioxidante

Los resultados de los ensayos antioxidantes se muestran en el Cuadro 4. Los ensayos ABTS y FRAP cuantifican esencialmente la capacidad del extracto para neutralizar un radical por transferencia de un solo electrón (SET); sin embargo, el ensayo ABTS también podría actuar bajo el mecanismo de una transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). Los ensayos ORAC y ON evalúan el mecanismo de HAT. La actividad de barrido de radicales ABTS mostró correlación positiva y estadísticamente significativa con el contenido de fenoles totales (Pearson 0.754, $P = 0.007$) y flavonoides (Pearson 0.854, $P = 0.001$).

El extracto 6 (relación agua/metanol [20/80 %] - tiempo de extracción [9 min] - amplitud [30 %]) mostró los valores más altos de ABTS y FRAP, mientras que el extracto 9 (relación agua/metanol [60/40 %] - tiempo de extracción [6 min] - amplitud [40 %]), la mayor actividad en los ensayos ORAC y ON. El extracto 9 mostró mayor concentración de flavanonas, flavonoles y cafeína en comparación con el extracto 6. Se ha reportado que bajas concentraciones de cafeína pueden favorecer un efecto antioxidante al ejercer una fuerte capacidad de atrapamiento del radical $\bullet\text{OH}$ (Petrucci, Zollo, Curulli, & Marrosu, 2018). No obstante, también se ha sugerido que la cafeína no influye en la capacidad antioxidante mediante ensayos basados en el mecanismo HAT (Petrucci et al., 2018). Por otra parte, el extracto 6 también mostró mayor concentración de epicatequina y mangiferina en comparación con el extracto 9.

Está comprobado que tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo, debido a circunstancias tanto intrínsecas como extrínsecas, inducen a los mecanismos biológicos para perder el control sobre los radicales libres con el consiguiente desequilibrio entre las condiciones oxidantes y defensas antioxidantes celulares. Por ello, es interesante evaluar no solo el potencial antioxidante de un material vegetal, sino también su capacidad antinitrosativa. El potencial inhibidor del óxido nítrico de los extractos evaluados osciló entre 36 y 58 % y el extracto 9 fue el más eficiente para eliminarlo.

Viabilidad celular

Diferentes concentraciones de extractos e infusiones en cultivos HT-29 se evaluaron y se obtuvieron sus IC_{50} . El Cuadro 5 muestra que los valores de IC_{50} de todas las muestras fueron inferiores de $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Según estos resultados, se propuso una concentración

Table 5. Cell viability results expressed as IC_{50} (mean inhibitory concentration) of infusions and *Coffea* leaves extracts evaluated in human colon adenocarcinoma cells (HT-29).

Cuadro 5. Resultados de viabilidad celular expresados como IC_{50} (concentración inhibitoria media) de infusiones y extractos de hojas de *Coffea*, evaluados en células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29).

Extract sample / Muestra de extracto	Extraction conditions / Condiciones de extracción	IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) / IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Infusion	-	9.16 \pm 0.9 b
1	20-3-20	6.50 \pm 0.8 c
2	100-3-20	8.97 \pm 1.1 b
3	100-9-20	5.05 \pm 0.6 c
4	40-3-30	2.86 \pm 0.4 d
5	100-6-30	12.09 \pm 1.5 a
6	20-9-30	12.50 \pm 1.6 a
7	20-3-40	6.19 \pm 0.8 c
8	100-3-40	5.22 \pm 0.7 c
9	60-6-40	5.70 \pm 0.7 c
10	100-9-40	9.82 \pm 1.2 b

Infusion: 1 g of ground material to 100 mL of 80 °C distilled water and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: Ratio of water/methanol (%) - Extraction time (min) - Amplitude (%). Values with different letters are significantly different (Fisher $P = 0.05$).

Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 min. Condiciones de extracción: Relación agua/metanol (%) - Tiempo de extracción (min) - Amplitud (%). Valores con letras distintas son significativamente diferentes (Fisher $P = 0.05$).

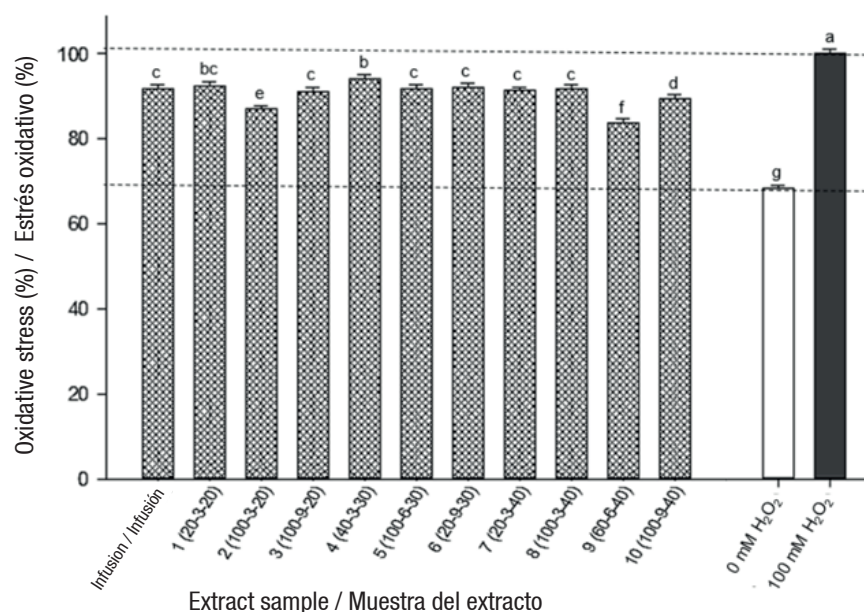


Figure 3. Ability of *Coffea* leaf extracts to inhibit oxidative stress in a human colon adenocarcinoma cell assay (HT-29). Positive control with H_2O_2 . Different letters mean significant differences (Fisher $P = 0.05$). Infusion: 1 g of ground material into 100 mL distilled water at 80 °C and allowed to stand for 10 min. Extraction conditions: ratio of water/methanol (%) - extraction time (min) - amplitude (%).

Figura 3. Capacidad de los extractos de hojas de *Coffea* para inhibir el estrés oxidativo en un ensayo de células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29). Control positivo con H_2O_2 . Letras distintas indican diferencias significativas (Fisher, $P = 0.05$). Infusión: 1 g de material molido con 100 mL de agua destilada a 80 °C en reposo durante 10 min. Condiciones de extracción: relación agua/metanol (%) - tiempo de extracción (min) - amplitud (%).

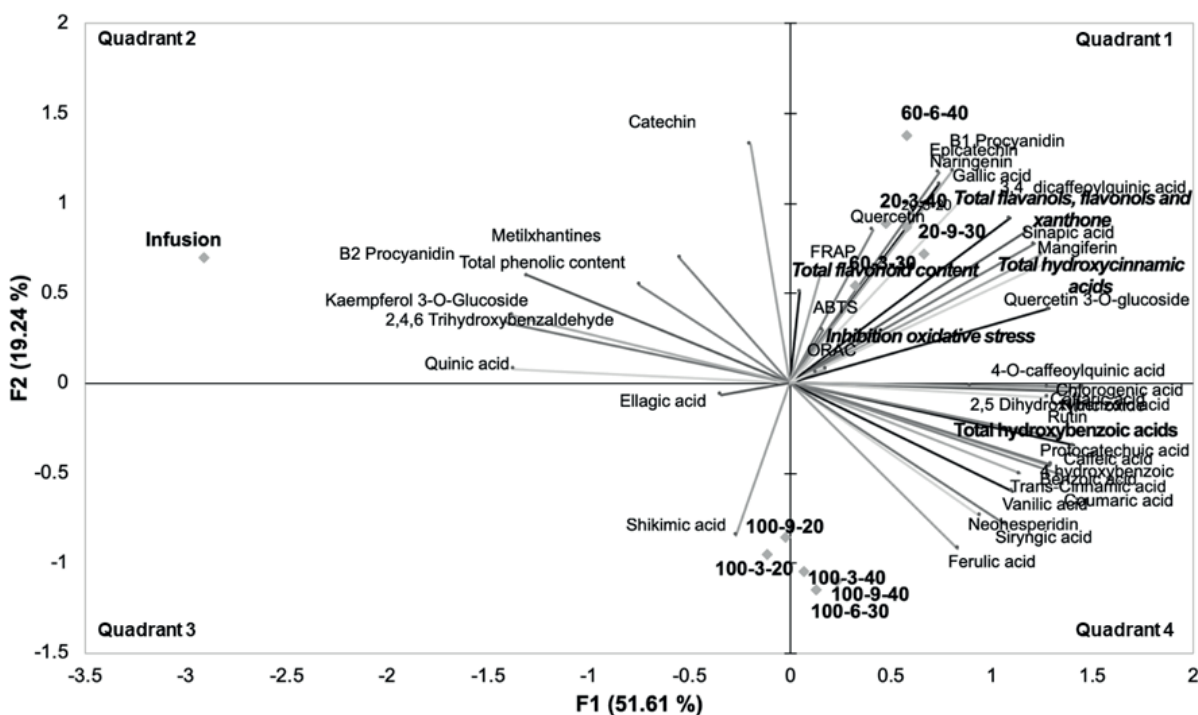


Figure 4. Principal component analysis that involves response variables as well as conditions of sonication and infusion extractions of *Coffea* leaves.

Figura 4. Análisis de componentes principales que involucra las variables respuesta, así como las condiciones de extracciones por sonicación e infusión de hojas de *Coffea*.

In the lower quadrants the extraction processes with ultrasound assistance, exclusively the aqueous medium, were observed and related to the recovery of simple phenolic compounds, while infusion was found in quadrant 2. This extraction process has a high correlation specifically with the recovery of quinic acid. The 11 processes evaluated showed the recovery capability of phenolic compounds, and those obtained by sonication and combination with alcohol as solvent, had also important antioxidant activity.

Conclusions

Phenolic and methylxanthines contents in extracts from *Coffea arabica* leaves were evaluated. Their antioxidant activity in vitro through NO, ORAC, FRAP, and ABTS assays, and inhibition of oxidative stress by H_2O_2 in HT-29 cells was determined. Effect of ultrasound-assisted extraction conditions was observed and extracts at 60/40 water/methanol, 40 % amplitude and 6 min of extraction (extract 9) showed the highest concentrations of phenolics and caffeine, and the greater oxidative stress inhibition in the HT-29 model, ORAC and NO assays. It was also possible to identified new phenolic compounds, such as flavanones (naringenin and neohesperidin), and hydroxybenzoic acids (vanillic acid). The total content of identified

compounds in the extracts and infusions of 50 ng·mL⁻¹ (where the cell viability was 100 %) to evaluate its effect as a protector. The phytochemicals present in the extracts and infusions at this concentration were capable of inhibiting the stress generated in the cells by exposure to H_2O_2 . In comparison with the 100 % of stress in the control positive with H_2O_2 , all treatments were capable of reducing the stress from 5.9 to 16 %, especially the extract 9 (Figure 3). The extraction conditions of process 9 favored an extract rich in mangiferin, which shows cellular protection by attenuating the expression of oxidative stress (Rocha, Bonet, Tambeli, de-Faria, & Parada, 2018).

In Figure 4, the PCA of the response variables and extraction processes (ultrasound and infusion) is shown. In quadrant 1, a group with most of the responses and all extraction processes by ultrasound, where a hydroalcoholic medium (water/methanol) was used, is observed. In this group, all antioxidant responses (ORAC, ABTS, FRAP, and NO) are related to hydroalcoholic extracts, as well as the evaluation of oxidative stress in the cells. Phenolic compounds with therapeutic importance are also observed, as well as phytochemicals of importance

compounds was always higher in ultrasound-assisted extracts while phenolic extraction yields improved with the addition of alcohol. The phytochemical composition of ultrasound-assisted extracts of *Coffea* leaves represents an opportunity for using this plant material as a novel source of nutraceuticals to treat various health conditions related to oxidative stress; however, further investigations are needed.

Acknowledgments

First author (MCRV) is thankful with the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for granting her a doctoral scholarship. The samples collection from M. C. Rosalío López-Morgado from PICIP (café), S.E. Teocelo, INIFAP is fully appreciated. Partial funding support is acknowledged from Tecnológico Nacional de Mexico (TecNM) grant No. 5690.19-P.

End of English version

References / Referencias

- Belayneh, A., & Bussa, N. F. (2014). Ethnomedicinal plants used to treat human ailments in the prehistoric place of Harla and Dengego valleys, eastern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 18. doi: 10.1186/1746-4269-10-18
- Brum, C. N. F., Melo, E. F., Barquero, L. O. B., Alves, J. D., & Chalfun-Júnior, A. (2013). Modifications in the metabolism of carbohydrates in (*Coffea arabica* L. cv. siriema) seedlings under drought conditions. *Coffee Science*, 8(2), 140-147. Retrieved from <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/384>
- Campa, C., Mondolot, L., Rakotondravao, A., Bidet, L. P. R., Gargadennec, A., Couturon, E., La Fisca, P., ...Davis, A. P. (2012). A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: Biological implications and uses. *Annals of Botany*, 110(3), 595-613. doi: 10.1093/aob/mcs119
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. doi: 10.1016/j.ulsonch.2016.06.035
- Chen, X. (2019). A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 59(6), 1008-1025. doi: 10.1080/10408398.2018.1546667
- Chen, X., Ding, J., Ji, D., He, S., & Ma, H. (2020). Optimization of ultrasonic-assisted extraction conditions for bioactive components from coffee leaves using the Taguchi design and response surface methodology. *Journal of Food Science*, 85(6), 1742-1751. doi: 10.1111/1750-3841.15111

biológica, convierten estas condiciones de extracción en una buena alternativa para la obtención de compuestos fenólicos con capacidad potencial como ingredientes nutraceuticos.

En los cuadrantes inferiores se observaron los procesos de extracción con asistencia de ultrasonido, exclusivamente en el medio acuoso, y se relacionaron con la recuperación de compuestos fenólicos simples, mientras que la infusión se encontró en el cuadrante 2. Este proceso de extracción tiene una alta correlación específicamente con la recuperación de ácido quínico. Los 11 procesos evaluados mostraron la capacidad de recuperación de los compuestos fenólicos, y los obtenidos por sonicación y combinación con alcohol como solvente tuvieron, además, una actividad antioxidante importante.

Conclusiones

El contenido de fenoles y metilxantinas se evaluó en los extractos de las hojas de *Coffea arabica*. Su actividad antioxidante *in vitro* se determinó mediante ensayos ON, ORAC, FRAP y ABTS e inhibición del estrés oxidativo por H₂O₂ en células HT-29. El efecto de las condiciones de extracción asistida por ultrasonido se constató y extractos a 60/40 agua/metanol, 40 % de amplitud y 6 min de extracción (extracto 9) mostraron las mayores concentraciones de fenólicos y cafeína, y la mayor inhibición de estrés oxidativo en el modelo HT-29, ensayos ORAC y ON. Asimismo, fue posible identificar nuevos compuestos fenólicos como flavanonas (naringenina y neohesperidina) y ácidos hidroxibenzoicos (ácido vanílico). El contenido total de compuestos identificados siempre fue mayor en extractos asistidos por ultrasonido, mientras que el rendimiento de la extracción fenólica mejoró con la adición de alcohol. La composición fitoquímica de los extractos asistidos por ultrasonido de hojas de *Coffea* representa una oportunidad para utilizar este material vegetal como una nueva fuente de nutraceuticos para tratar diversas condiciones de salud relacionadas con estrés oxidativo; sin embargo, es necesario realizar más investigaciones.

Agradecimientos

La primera autora (MCRV) agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberle otorgado una beca de doctorado. Se agradece la recolección de muestras de M. C. Rosalío López-Morgado del PICIP (café), S.E. Teocelo, INIFAP. Se agradece el apoyo financiero parcial del Tecnológico Nacional de México (TecNM) mediante el proyecto núm. 5690.19-P.

Fin de la versión en español

- Delarozza, F., Rakocevic, M., Malta, G. B., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2014). Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(11), 1929-1938. doi: 10.5935/0103-5053.20140172
- Dhananjaya, B. L., Nataraju, A., Raghavendra Gowda, C. D., Sharat, B. K., & D'Souza, C. J. M. (2009). Vanillic acid as a novel specific inhibitor of snake venom 5'-nucleotidase: A pharmacological tool in evaluating the role of the enzyme in snake envenomation. *Biochemistry (Moscow)*, 74, 1315-1319. doi: 10.1134/s0006297909120037
- Díaz-Rivas, J. O., González-Laredo, R. F., Chávez-Simental, J. A., Montoya-Ayón, J. B., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., & Rocha-Guzman, N. E. (2018). Comprehensive characterization of extractable phenolic compounds by UPLC-PDA-ESI-QqQ of *Buddleja scordioides* plants elicited with salicylic acid. *Journal of Chemistry*, ID 4536970. doi: 10.1155/2018/4536970
- Ebkatan, S. S., Li, X. Q., Ghorbani, M., Azadi, B., & Kubow, S. (2018). Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 723. doi: 10.3390/ijms19030723
- Guglielmetti, A., D'Ignoti, V., Ghirardello, D., Belviso, S., & Zeppa, G. (2017). Optimisation of ultrasound and microwave-assisted extraction of caffeoylquinic acids and caffeine from coffee silverskin using response surface methodology. *Italian Journal of Food Science*, 29(3), 409-423. doi: 10.14674/IJFS-727
- Heredia-Díaz, Y., García-Díaz, J., López-González, T., Chil-Núñez, I., Arias-Ramos, D., Escalona-Arranza, J. C., Gonzalez-Fernandez, R., ...Martinez-Figueroa, Y. (2018). An ethnobotanical survey of medicinal plants used by inhabitants of Holguín, Eastern Region, Cuba. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(2), 160-196. Retrieved from <https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/41>
- Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics and Sonochemistry*, 19(3), 582-590. doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.11.001
- Huck, C., Guggenbichler, W., & Bonn, G. (2005). Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 195-203. doi: 10.1016/j.aca.2005.01.064
- Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., & Kim, K. W. (2014). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, 63(1), 81-90. doi: 10.1007/s00011-013-0674-4
- Joshi, R., Kulkarni, Y. A., & Wairkar, S. (2018). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of naringenin: An update. *Life Sciences*, 215, 43-56. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.066
- Kim, M. C., Kim, S. J., Kim, D. S., Jeon, Y. D., Park, S. J., Lee, H. S., Um, J. Y., & Hong, S. H. (2011). Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(3), 525-532. doi: 10.3109/08923973.2010.547500
- Minitab Inc. (2009). Minitab® Statistical Software, version 7. State College, PA, USA: Author.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(1), 178-192. doi: 10.1271/bbb.70.178
- Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1341-1351. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.008
- Patay, É. B., Bencsik, T., & Papp, N. (2016). Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(12), 1127-1135. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.11.008
- Petrucci, R., Zollo, G., Curulli, A., & Marrosu, G. (2018). A new insight into the oxidative mechanism of caffeine and related methylxanthines in aprotic medium: May caffeine be really considered as an antioxidant? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(8), 1781-1789. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.11.008
- Ratanamarno, S., & Surbkar, S. (2017). Caffeine and catechins in fresh coffee leaf (*Coffea arabica*) and coffee leaf tea. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 11(3), 211-218. Retrieved from <http://www.mijst.mju.ac.th/vol11/211-218.pdf>
- Rocha, L. W., Bonet, I. J. M., Tambeli, C. H., de-Faria, F. M., & Parada, C. A. (2018). Local administration of mangiferin prevents experimental inflammatory mechanical hyperalgesia through CINC-1/epinephrine/PKA pathway and TNF- α inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 830, 87-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.04.030
- Rosales-Villarreal, M. C., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I. F., & Gonzalez-Laredo, R. F. (2019). Significance of bioactive compounds, therapeutic and agronomic potential of non-commercial parts of the *Coffea* tree. *Biotecnica*, 21(3), 143-153. doi: 10.18633/biotecnica.v21i3.1046
- Setiawan, V. W., Wilkens, L. R., Lu, S. C., Hernandez, B. Y., Le Marchand, L., & Henderson, B. E. (2015). Association of coffee intake with reduced incidence of liver cancer and death from chronic liver disease in the US multiethnic cohort. *Gastroenterology*, 148(1), 118-125. doi: 10.1053/j.gastro.2014.10.005
- Shi, H., Shi, A., Dong, L., Lu, X., Wang, Y., Zhao, J., Dai, F., & Guo, X. (2016). Chlorogenic acid protects against liver fibrosis

- in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1366-1373. doi: 10.1016/j.clnu.2016.03.002
- Systat Software Inc. (2014). SigmaPlot® version 12. Exact graphs for exact science. San Jose, CA, USA: Author.
- Tabuti, J. R. S., Kukunda, C. B., & Waako, P. J. (2010). Medicinal plants used by traditional medicine practitioners in the treatment of tuberculosis and related ailments in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 130-136. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.035
- Tai, A., Sawano, T., & Ito, H. (2012). Antioxidant properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(2), 314-318. doi: 10.1271/bbb.110700
- Yamagata, K., Izawa, Y., Onodera, D., & Tagami, M. (2018). Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441(1-2), 9-19. doi: 10.1007/s11010-017-3171-1
- Zheng, X., & Ashihara, H. (2004). Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science*, 166(3), 807-813. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.11.024