

# POTENCIAL FUNCIONAL Y NUTRACÉUTICO DE HOJAS DE CAFÉ INJERTADO (*Coffea* spp.) DURANTE UN CICLO ANUAL

## FUNCTIONAL AND NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF GRAFTED COFFEE (*Coffea* spp.) LEAVES DURING AN ANNUAL CYCLE

Tania Marín-Garza<sup>1</sup>, Fernando C. Gómez-Merino<sup>2</sup>, Libia I. Trejo-Téllez<sup>3</sup>, Miriam C. Pastelín-Solano<sup>1</sup>, Odón Castañeda-Castro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Prolongación de Oriente 6 No. 1009. 94340. Orizaba, Veracruz. (tamarin@uv.mx), (mpastelin@uv.mx), (odcastaneda@uv.mx). <sup>2</sup> Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Manuel León. 94946 Amatlán de los Reyes, Veracruz. (fernandg@colpos.mx). <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 56230 Montecillo, México. (tlibia@colpos.mx).

### RESUMEN

Compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, cafeína, azúcares, vitaminas, minerales y sustancias volátiles que son componentes principales del café (*Coffea* spp.) tienen funciones biológicas, calificadas como nutraceuticas e insecticidas. En al menos una etapa fenológica, las hojas de café tienen mayores posibilidades de utilizarse con propósitos comerciales. El objetivo de este estudio fue analizar el área foliar, contenido de clorofila *a*, *b* y total, cafeína, ácido clorogénico (5-CGA), azúcares y macro y micronutrientes en hojas de café arábica (*Coffea arabica*) var. Caturra rojo injertado sobre café robusta (*Coffea canephora*) var. Romex durante un ciclo anual. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para un experimento factorial. El muestreo de 10 árboles fue completamente al azar, las muestras se corrieron por triplicado. Los valores mayores se presentaron como sigue: área foliar en la etapa de floración y fructificación; clorofila *a*, *b* y total durante la etapa vegetativa; cafeína en la etapa de floración; 5-CGA se obtuvo durante la etapa vegetativa, en la cual también se observaron las concentraciones mayores de glucosa y fructosa. La concentración de macronutrientes, excepto Mg, fue mayor durante la etapa de fructificación, mientras que las de Fe y Zn fueron mayores durante la floración y Mn y B en fructificación. Los macro y micronutrientes se acumularon durante la etapa de fructificación. Las hojas de café pueden ser funcionales y nutraceuticos durante las etapas vegetativa y fructificación.

**Palabras clave:** carbohidratos, nutrientes, *Coffea*, cafeína, clorofila, ácido clorogénico.

### ABSTRACT

Phenolic compounds, such as chlorogenic acid, caffeine, sugars, vitamins, minerals and volatile substances are major compounds of coffee (*Coffea* spp.). They perform distinctive biological functions and are classified as nutraceuticals and insecticides. In at least one phenological stage, coffee leaves are more likely to be used for commercial purposes. The objective of this study was to analyze leaf area, content of chlorophyll *a*, *b* and total, caffeine, chlorogenic acid (5-CGA), sugars and macro and micronutrients in arabica coffee leaves (*Coffea arabica*) var. Caturra rojo grafted on robusta coffee (*Coffea canephora*) var. Romex during an annual cycle. An analysis of variance (ANOVA) was performed with the obtained data and the means were compared by the Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) for a factorial experiment. Sampling of 10 trees was done completely at random, and the samples were run in triplicate. The largest values occurred as follows: leaf area in the blooming and fruiting stage; chlorophyll *a*, *b* and total during the vegetative stage; caffeine in the blooming stage; 5-CGA was obtained during the vegetative stage, in which we observed the highest concentrations of glucose and fructose. The concentration of macronutrients, except Mg, was higher during the fruiting stage, while Fe and Zn were higher during blooming and Mn and B in fruiting. Macro and micronutrients accumulated during the fruiting stage. Coffee leaves may be both functional and nutraceutical during the vegetative and fruiting stages.

**Key words:** carbohydrates, nutrients, *Coffea*, caffeine, chlorophyll, chlorogenic acid.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2018. Aprobado: septiembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 459-469. 2020.

## INTRODUCCIÓN

Las dos especies de café con mayor importancia económica internacional son arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*C. canephora*). México es el décimo productor de café en el mundo, por su topografía, altitudes, clima y suelo. En 15 entidades federativas y 480 municipios de México se produce café de buena calidad. El estado de Veracruz es el segundo lugar nacional con 24% de la producción (OIC, 2019).

Las variedades más cultivadas de la especie arábica en el estado de Veracruz son: Caturra, Typica, Garnica y Bourbon (Hernández-Solabac *et al.*, 2011). Algunos productores, principalmente en la región de Huatusco, injertan las variedades de café arábica sobre patrones de café robusta, debido a que esta especie tiene una raíz abundante que tolera la presencia de nematodos en los suelos (Hernández-Martínez *et al.*, 2013).

El área foliar se relaciona con características como el crecimiento vegetativo, eficiencia fotosintética, el uso de nutrimentos y sobre todo con la asimilación de carbono durante el ciclo de vida de la planta (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017). Moléculas orgánicas, como la clorofila *a*, *b*, y las proteínas solubles totales, se utilizan como estimadores de la fotosíntesis, por eso su aumento estimula un incremento de la tasa fotosintética y el contenido de carbohidratos solubles (San Clemente y Peña, 2008).

La cafeína es el principal alcaloide en el café, se encuentra en toda la planta, incluyendo en la pulpa de frutos, raíces y hojas (Hečimović *et al.*, 2011). Los compuestos bioactivos interesan a la industria farmacológica porque son fuente de compuestos nutraceuticos que poseen actividad antioxidante como los ácidos clorogénicos. Sin embargo, hay muchos factores que las plantas requieren para completar funciones específicas en el metabolismo, activar reacciones enzimáticas y constituir estructuras orgánicas (Bustos *et al.*, 2008). El ácido cafeoilquinico acid (CQA) es uno de los ácidos clorogénicos más representativos tanto en café arábica como en robusta (Fortunato *et al.*, 2010).

En algunos cultivos el llenado de los frutos y granos se caracteriza por modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos no estructurales, el que puede limitarse por la actividad fotosintética de la planta (Maqueira-López *et al.*, 2016).

## INTRODUCTION

The two species of coffee with the highest international economic importance are arábica (*Coffea arabica*) and robusta (*C. canephora*). Mexico is the tenth largest coffee producer in the world, due to its topography, altitudes, climate and soil. Good quality coffee is produced in 15 states and 480 municipalities in Mexico. Veracruz is the second producer state with 24% of the national production (OIC, 2019).

The most cultivated varieties of the arábica species in the state of Veracruz are: Caturra, Typica, Garnica and Bourbon (Hernández-Solabac *et al.*, 2011). Some producers, mainly in the Huatusco region, graft arábica coffee varieties on robusta coffee patterns because this species has an abundant root that tolerates the presence of nematodes in the soil (Hernández-Martínez *et al.*, 2013).

The leaf area is related to traits such as plant growth, photosynthetic efficiency, the use of nutrients, and especially with the assimilation of carbon during the life cycle of the plant (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017). Organic molecules, such as chlorophyll *a*, *b*, and total soluble proteins are used as estimators of photosynthesis, therefore their increase stimulates a rise in the photosynthetic rate and content of soluble carbohydrates (San Clemente and Peña, 2008).

Caffeine is the main alkaloid in coffee, and is found throughout the plant, including fruit pulp, roots and leaves (Hečimović *et al.*, 2011). Bioactive compounds are of interest to the pharmacological industry because they are a source of nutraceutical compounds that possess antioxidant activity, as chlorogenic acids do. However, there are many factors that plants require to complete specific metabolic functions, activate enzymatic reactions and constitute organic structures (Bustos *et al.*, 2008). The caffeoylquinic acid (CQA) is one of the most representative chlorogenic acids in both arábica and robusta coffee (Fortunato *et al.*, 2010).

In some crops, the filling of fruits and grains is characterized by modifications in the metabolism of non-structural carbohydrates, which can be limited by the photosynthetic activity of the plant (Maqueira-López *et al.*, 2016).

Nutrients fulfill essential functions in plant metabolism as activators of enzymatic reactions, and part of organic structures and osmoregulators

Los nutrimentos cumplen funciones esenciales en el metabolismo de las plantas como activadores de reacciones enzimáticas, constituyentes de estructuras orgánicas, y osmorreguladores (Bustos *et al.*, 2008). Éstos varían por causas como el crecimiento de la planta y su disponibilidad en el suelo, lo que produce una mayor concentración o una dilución nutrimental en los tejidos de la planta (Sadeghian y Salamanca, 2015).

Durante las distintas etapas fenológicas del cultivo es probable que la hoja del café presente niveles diferentes de compuestos químicos. El objetivo de este estudio fue analizar el área foliar, clorofilas, concentraciones de cafeína, ácido clorogénico (5-CGA), carbohidratos, macro y micronutrimentos en hojas de *C. arabica* var. Caturra rojo injertado sobre *C. canephora* var. Romex, durante un ciclo anual.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y condiciones del experimento

El material vegetal del estudio fueron injertos de café arábica (*C. arabica*) var. Caturra, sobre café robusta (*C. canephora*) var. Romex con cinco años de edad de la finca La Laja, establecidas en la congregación La Laja, municipio de Tlaltetela, Veracruz, México (19° 17' 10.8" N, 96° 56' 51.9" O y altitud de 1250 m). Las plantas se cultivaron con sombra manejada para dar paso al 70% de la radiación solar aproximadamente, con el método tradicional selectivo de plantaciones (siembra, fertilización y poda) de 2000 a 2500 arbustos ha<sup>-1</sup> en suelos tipo cambisol.

Las etapas del ciclo anual evaluadas fueron: vegetativa (enero), floración (abril) y fructificación (noviembre) en 10 plantas obtenidas al azar durante enero y noviembre. En esos meses la precipitación promedio fue 46 y 358 mm, respectivamente, y la precipitación anual fue 1964 mm. La temperatura promedio mínima fue 9.0 °C (febrero) y la máxima 35.0 °C (marzo y abril), mientras que en noviembre, la temperatura mínima promedio fue 9 °C y máxima promedio 21 °C. La humedad relativa fue 59 y 98% (Estación Climatológica de Huatusco, clave clicom: 30342).

### Área foliar y cuantificación de clorofilas

El área foliar se analizó con el instrumento óptico Medidor de Área Foliar (CID-Biociencia, modelo CI-202 Camas, WA, EE.UU.) que determina indirectamente el índice de área foliar (IAF) en cm<sup>2</sup> (CID, 2012).

(Bustos *et al.*, 2008). These vary due to the growth of the plant and their availability in the soil, producing a higher concentration or a nutritional dilution in plant tissues (Sadeghian and Salamanca, 2015).

During the different phenological stages of cultivation, the coffee leaf is likely to present different levels of chemical compounds. The objective of this study was to analyze the leaf area, chlorophylls, caffeine concentrations, chlorogenic acid (5-CGA), carbohydrates, macro and micronutrients in leaves of *C. arabica* var. Caturra rojo grafted on *C. canephora* var. Romex during an annual cycle.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and experiment conditions

Vegetal material in the study were grafts of arabica coffee (*C. arabica*) var. Caturra rojo, on five years old robusta coffee (*C. canephora*) var. Romex plants from La Laja farm established at locality La Laja, Tlaltetela municipality, Veracruz, Mexico (19° 17' 10.8" N, 96° 56' 51.9" W, at an altitude of 1250 m). Plants were cultivated under managed shading, 70% of the solar radiation allowed through, following the traditional selective plantation method (sowing, fertilization and pruning) of 2000 to 2500 shrubs ha<sup>-1</sup> in cambisol type soils.

The stages of the annual cycle evaluated were vegetative (January), blooming (April) and fruiting (November) in 10 plants obtained at random during January and November. In those months average precipitation was 46 and 358 mm, respectively, and annual precipitation was 1964 mm. The minimum average temperature was 9.0 °C (February) and the maximum was 35.0 °C (March and April), while in November the average minimum temperature was 9 °C and the average maximum was 21 °C. Relative humidity was 59 and 98% (Huatusco Climatic Station, clicom code: 30342).

### Leaf area and chlorophyll quantification

The leaf area was analyzed with the optical instrument Leaf Area Meter (CID-Biociencia, model CI-202 Camas, WA, USA) that indirectly determines the leaf area index (IAF) in cm<sup>2</sup> (CID, 2012).

The *a*, *b* and total chlorophyll content was measured in mature coffee leaves placed in 80% acetone until maceration (24 h). Chlorophyll content was expressed based on the weight of fresh biomass (PBS) and measured with a spectrophotometer (ThermoFisher, Genesys 10S UV-VIS Madison model, WI, USA) at an absorbance of 645 and 665 nm.

El contenido de clorofila *a*, *b* y total se midió en hojas maduras de café que se colocaron en acetona al 80% hasta su maceración (24 h). El contenido de clorofila se expresó con base en el peso de biomasa fresca (PBS) y se midió con un espectrofotómetro (ThermoFisher, modelo Genesys 10S UV-VIS Madison, WI, EUA) a una absorbancia de 645 y 665 nm.

El contenido de clorofila *a*, *b* y total se obtuvo con la fórmula:

$$\text{Clorofila } a = [12.7 (A663) - 2.69 (A645)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Clorofila } b = [22.9 (A645) - 4.68 (A663)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Clorofila total} = [20.2 (A645) + 8.20 (A663)] * V / 100 * W$$

donde, A: absorbancia, V: volumen final del extracto, y W: peso fresco de la muestra en g.

### Contenidos de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA)

La cafeína se extrajo con un termoreactor (Hach, modelo DRB200 Loveland, CO, EUA) a 135 °C por 5 min. La cuantificación se realizó en un HPLC Dionex ICS3000 equipado con un detector UV/VIS a una longitud de onda de 272 nm con una fase móvil isocrática compuesta de 75% agua grado HPLC y 25% metanol acidificado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, que además aplicó un flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>, en una columna 120 C18 5 μm 4.6 × 150 mm (ThermoFisher® modelo Acclaim™, Sunnyvale, CA, EUA) con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, y las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso de la materia seca (% PMS).

La curva de calibración de cafeína se construyó con ocho puntos de concentración, por duplicado para comprobar la linealidad del método (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02 y 0.005%). Para la curva de calibración se utilizó cafeína ≥99% CAS 58-08-2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, EUA).

El ácido clorogénico (5-CQA) se cuantificó por HPLC-UV/VIS en un equipo (Dionex, modelo ICS3000; San José, CA, EUA) con un detector UV/VIS a una longitud de onda de 325 nm con una fase móvil isocrática con 75% agua grado HPLC y 25% metanol acidificado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, con un flujo 1.2 mL min<sup>-1</sup>, en una columna fase reversa C18 5 μm 4.6 × 150 mm (ThermoFisher®, modelo Acclaim™ 120, Sunnyvale, CA, EUA) y una guarda columna C18 5 μm, 10 × 2 mm (Agilent, modelo ZORBAX Santa Clara, CA, EUA).

Los resultados se expresaron como porcentaje de peso de la materia seca (% PMS). Las curvas de calibración se realizaron con ocho puntos de concentración, por duplicado para comprobar la linealidad del método (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02 y 0.005%). Para la curva de calibración, se utilizó ácido clorogénico ≥95% CAS 327-97-9 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EUA).

The *a*, *b* and total chlorophyll content was obtained with the formula:

$$\text{Chlorophyll } a = [12.7 (A663) - 2.69 (A645)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Chlorophyll } b = [22.9 (A645) - 4.68 (A663)] * V / (1000 * W)$$

$$\text{Total chlorophyll} = [20.2 (A645) + 8.20 (A663)] * V / 100 * W$$

where, A: absorbance, V: final volume of the extract, and W: fresh weight of the sample in g.

### Caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) contents

Caffeine was extracted using a thermoreactor (Hach, DRB200 Loveland model, CO, USA) at 135 °C for 5 min. Quantification was performed on a Dionex ICS3000 HPLC equipped with a UV/VIS detector at a wavelength of 272 nm. It included an isocratic mobile phase composed of 75% HPLC grade water and 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> acidified methanol, which also applied a flow of 1.5 mL min<sup>-1</sup> on a 120 C18 5 μm 4.6 × 150 mm column (ThermoFisher® model Acclaim™, Sunnyvale, CA, USA) with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; samples were made in triplicate. Results were expressed as a percentage of dry matter weight (% PMS).

The caffeine calibration curve was obtained with eight concentration points in duplicate to check the linearity of the method (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02, and 0.005%). Caffeine ≥99% CAS 58-08-2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, USA) was used for the calibration curve.

For the quantification of chlorogenic acid (5-CQA) we used HPLC-UV/VIS in a kit (Dionex, model ICS3000; San José, CA, USA), with a UV/VIS detector at a wavelength of 325 nm. It included a mobile isocratic phase with 75% HPLC grade water and 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> acidified methanol, plus a flow of 1.2 mL min<sup>-1</sup>, on a reversed phase C18 5 μm 4.6 × 150 mm column (ThermoFisher®, model Acclaim™ 120, Sunnyvale, CA, USA) and a C18 5 μm, 10 × 2 mm column guard (Agilent, model ZORBAX Santa Clara, CA, USA). Results were expressed as a percentage of dry matter weight (% PMS).

The calibration curve was obtained with eight concentration points in duplicate to check the linearity of the method (0.1, 0.08, 0.065, 0.05, 0.04, 0.02, and 0.005%). For the calibration curve, we used chlorogenic acid ≥95% CAS 327-97-9 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA).

### Quantification of reducing sugars

Reducing sugars were quantified by using a Dionex ICS3000 HPLC equipped with an electrochemical detector and PA1 2×250 mm column (ThermoFisher®, model CarboPac, Sunnyvale, CA, USA) plus an isocratic flow of 0.5 mL min<sup>-1</sup> with HPLC grade water as mobile phase and 300 mM NaOH

### Cuantificación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó en un HPLC Dionex ICS3000 equipado con un detector electroquímico y columna PA1 2 × 250 mm (ThermoFisher®, modelo CarboPac, Sunnyvale, CA, EUA) más un flujo isocrático de 0.5 mL min<sup>-1</sup> con agua grado HPLC como fase móvil y NaOH 300 mM para la reacción electroquímica postcolumna. Los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso de la materia seca (% PMS). La curva de calibración se construyó con estándares de arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y fructuosa ≥95%, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) en nueve concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, 4 y 5%).

### Análisis de minerales

Las concentraciones de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe y B se determinaron con espectrofotometría de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (Agilent ICP-AES, modelo 725-ES; Victoria, Australia), en tanto que el contenido de N se cuantificó por el método micro-Kjeldahl. Los resultados se expresaron en g kg<sup>-1</sup> para macronutrientes y mg kg<sup>-1</sup> para micronutrientes.

### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones en un diseño unifactorial donde el factor fue las etapas del ciclo anual, y tres repeticiones por variable analizada. Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) con prueba de comparación de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Área foliar y cuantificación de clorofilas

En las variables analizadas las plantas de café mostraron diferencias estadísticas significativas entre las etapas del ciclo anual. El área foliar mayor correspondió a las etapas de floración, con 48.91 cm<sup>2</sup> y fructificación, con 48.52 cm<sup>2</sup> en plantas de *C. arabica* var. Caturra rojo injertadas sobre *C. canephora* var. Romex (Figura 1).

Durante la etapa vegetativa se encontró la mayor concentración de clorofila *a* (1.491 mg g<sup>-1</sup> PBF), *b* (0.96 mg g<sup>-1</sup> PBF) y total (1.81 mg g<sup>-1</sup> PBF) (Figura 2).

En hojas de café robusta, Marín-Garza *et al.* (2018) encontraron los valores más altos de área

for the post-column electrochemical reaction. The analyses were performed in triplicate. Results were expressed as a percentage of dry matter weight (% PMS). The calibration curve was built using arabinose, galactose, glucose, xylose and fructose standards ≥95%, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in nine concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, 4 and 5%).

### Mineral analysis

Concentrations of P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe and B were determined with coupled plasma induction atomic emission spectrophotometry (Agilent ICP-AES, model 725-ES; Victoria, Australia), and the N content was measured using the micro-Kjeldahl method. Results were expressed in g kg<sup>-1</sup> for macronutrients and mg kg<sup>-1</sup> for micronutrients.

### Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with 10 repetitions in a unifactorial design where the factor was the stages in the annual cycle, and three replications per analyzed variable. Then we performed an Analysis of Variance (ANOVA) and the Tukey's comparison test ( $p \leq 0.05$ ) with the SAS statistical software (SAS Institute, 2011).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Leaf area and chlorophyll quantification

In the analyzed variables, the coffee plants showed significant statistical differences among the stages of the annual cycle. The largest leaf area corresponded to the blooming (48.91 cm<sup>2</sup>) and fruiting (48.52 cm<sup>2</sup>) stages in *C. arabica* var. Caturra rojo grafted on *C. canephora* var. Romex (Figure 1).

During the vegetative stage, we found the highest concentration of chlorophyll *a* (1.491 mg g<sup>-1</sup> PBF), *b* (0.96 mg g<sup>-1</sup> PBF) and total (1.81 mg g<sup>-1</sup> PBF) (Figure 2).

In robusta coffee leaves, Marín-Garza *et al.* (2018) found the highest values of leaf area after the start and during of the blooming stage, which coincides with our results. This is because one of the functions of the leaves is to protect the buds, flowers and fruits from radiation and adverse weather conditions (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2015). Production and fruiting are related to the increase in the leaf area of the trees during the blooming and fruiting stages in coffee, and for each 100 cm<sup>2</sup> of plant leaf area there is an increase of 2.37 g of green cherry coffee (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017).

foliar después del inicio y durante la floración, lo cual coincide con nuestros resultados. Esto se debe a que una de las funciones de las hojas es proteger a las yemas, flores y frutos de la radiación y condiciones climáticas adversas (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2015). La producción y fructificación se relacionan con el aumento del área foliar de los árboles durante la etapa de floración y fructificación en café y por cada 100 cm<sup>2</sup> de área foliar en la planta hay un incremento de 2.37 g de café cereza verde (Montoya-Restrepo *et al.*, 2017).

Las plantas de café expuestas a intensidad de luz menor presentan el contenido mayor de clorofila (Encalada-Córdova *et al.*, 2016), lo cual coincide con lo encontrado por Marín-Garza *et al.* (2018) en café robusta cuya concentración mayor de clorofilas fue durante la etapa vegetativa, al igual que en café injertado donde la concentración más alta de clorofilas (*a*, *b* y total) fue en la etapa vegetativa muestreada en enero.

### Contenido de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA)

El contenido de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA) en las hojas de café mostró diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ). La concentración mayor de cafeína

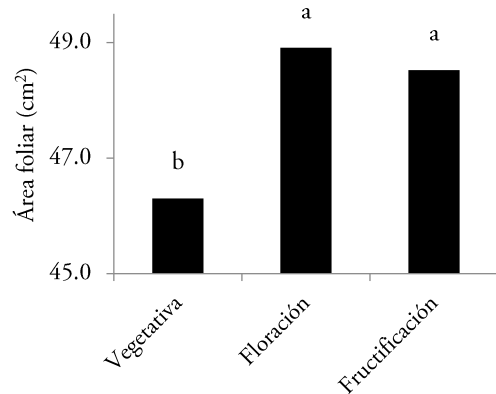


Figura 1. Área foliar de plantas de injerto de café *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas en cada columna indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Figure 1. Leaf area of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters indicate statistical differences (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Coffee plants exposed to a lower light intensity have the highest chlorophyll content (Encalada-Córdova *et al.*, 2016), which coincides with that found by Marín-Garza *et al.* (2018) in robusta

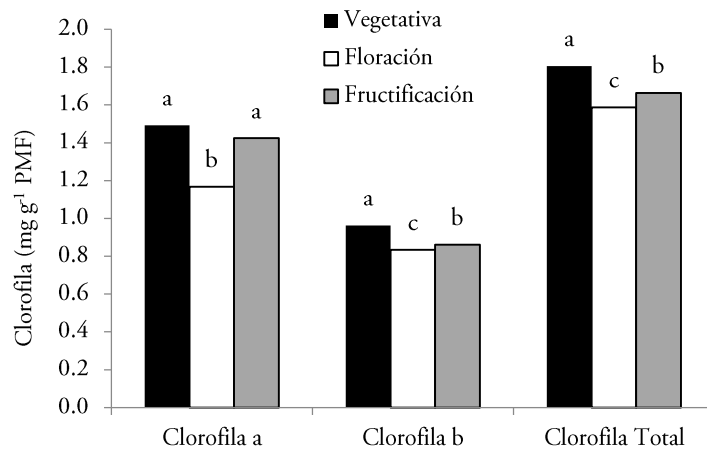


Figura 2. Concentración de clorofilas en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Figure 2. Chlorophyll concentration in graft leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the stages of the annual cycle in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters indicate statistical differences (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

(0.97%) se encontró en la etapa de floración, y de 5-CQA (0.69%) la concentración mayor se obtuvo en la etapa vegetativa (Cuadro 1).

En hojas de café arábica de diferentes edades Chen *et al.* (2018) encontraron concentraciones de 0.89% de cafeína en hojas jóvenes, la cual disminuyó con la madurez de la hoja hasta llegar a concentraciones de 0.54% de cafeína. En esta investigación se muestrearon hojas del tercer par después de las hojas apicales, aquellas ya estaban en madurez. Por lo tanto, es probable que se encuentren aun concentraciones mayores de cafeína en hojas jóvenes de plantas de café injertado. Campa *et al.* (2017) observaron que la intensidad de luz interfiere con el contenido de ácidos clorogénicos y clorofila en hojas de café arábica.

Chen *et al.* (2018) encontraron que la edad de la hoja del café arábica no afectó las concentraciones del 5-CQA (2.1 a 0.26%). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra investigación, la etapa fenológica del cultivo afecta las concentraciones del 5-CQA en los injertos en plantas de café. La concentración mayor de 5-CQA se encontró en la etapa vegetativa (0.69%), probablemente porque para iniciar la floración en las plantas se requieren niveles elevados de ácidos clorogénicos, por lo tanto la concentración de estos ácidos aumenta, poco antes de la floración (Çtrak *et al.*, 2007).

### Contenido de azúcares

Durante la etapa vegetativa, las hojas de café injertado presentaron concentraciones mayores en glucosa (10.48%) y fructuosa (0.99%) (Cuadro 2). Los contenidos de arabinosa, galactosa y xilosa no presentaron diferencias estadísticas entre la etapa vegetativa y la fructificación. Pero hubo una disminución durante la etapa de floración en todos los azúcares en las hojas de las plantas de café injertado.

La disminución de azúcares en las hojas, principalmente glucosa y fructuosa, se debe a su función en el mantenimiento y desarrollo de tejidos no fotosintéticos como flores y frutos (Rennie y Turgeon, 2009). Los metabolitos primarios como azúcares mostraron un aumento constante en flores y una disminución en hojas durante la floración de *Camellia sinensis*, lo cual se tradujo en un aumento de la concentración de cafeína en hojas y su disminución en flores. Entre el contenido de azúcares y la cafeína hay una correlación negativa (Jia *et al.*, 2016).

**Cuadro 1. Contenido porcentual de cafeína y ácido clorogénico (5-CQA) en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México.**

**Table 1. Percentage content of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) in leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico.**

Etapa	Cafeína %	5-CQA
Vegetativa	0.72 b	0.69 a
Floración	0.97 a	0.65 b
Fructificación	0.68 c	0.27 c

Medias con letra distinta en una hilera indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Los valores se presentan como porcentajes con base en el peso de materia seca (PMS) ♦ Means with different letter in a row indicate statistical differences (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Values are presented as percentages based on the weight of dry biomass (PMS).

coffee, whose highest concentration of chlorophylls occurred during the vegetative stage. As well as in grafted coffee where the highest concentration of chlorophylls (*a*, *b* and total) was recorded in the vegetative stage sampled in January.

### Caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) contents

The content of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) in the coffee leaves showed statistical differences ( $p \leq 0.05$ ). We found the highest concentration of caffeine (0.97%) in the blooming stage, and the highest 5-CQA (0.69%) in the vegetative stage (Table 1).

In Arabica coffee leaves of different ages Chen *et al.* (2018) found concentrations of 0.89% caffeine in young leaves, which decreased with leaf maturity until reaching concentrations of 0.54% caffeine. In this study, we sampled leaves of the third pair (after the apical leaves), which were already mature. Therefore, even higher concentrations of caffeine are likely to be found in young leaves of grafted coffee plants. Campa *et al.* (2017) observed that light intensity interferes with the content of chlorogenic acids and chlorophyll in *Coffea arabica* leaves.

**Cuadro 2. Contenido porcentual de azúcares reductores en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México.**

**Table 2. Percentage content of reducing sugars in graft leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico.**

Etapa	Arabinosa	Galactosa	Glucosa %	Xilosa	Fructosa
Vegetativa	3.69 ab	2.43 a	10.48 a	2.71 ab	0.99 a
Floración	3.14 b	2.12 a	2.45 b	2.36 b	0.66 b
Fructificación	4.12 a	2.21 a	1.94 c	3.10 a	0.49 c

Medias con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Los valores se calcularon como porcentaje con base en el peso de biomasa seca (PMS) ♦ Means with different letters in each column indicate statistical differences (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Values were calculated as a percentage based on the dry biomass weight PMS.

### Concentraciones nutrimentales en hojas

La concentración mayor de macronutrientes, excepto Mg se presentó durante la etapa de fructificación y la concentración menor fue en la etapa vegetativa (Figura 3).

Durante la etapa de floración se presentó la concentración mayor de Fe ( $123.05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y Zn ( $10.90 \text{ mg kg}^{-1}$ ). En la etapa de fructificación el Cu ( $7.75 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $205.20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y B ( $25.65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) destacaron de la planta. Durante la etapa vegetativa las hojas de café presentaron la concentración menor de todos los micronutrientes analizados (Figura 4).

Marín-Garza *et al.* (2018), en hojas de café Romex, observaron que las concentraciones mayores de N, P y K en la etapa de fructificación fue similar a los resultados obtenidos en nuestro experimento; sin embargo, las concentraciones de Ca y Mg fueron más altas durante la floración. Marín *et al.* (2000) observaron que en árboles de guayabo hay diferencias entre variedades e injertos de esas variedades, principalmente por la interacción que existe en las características de la combinación vástago - patrón y el ambiente.

Las hojas finalizan su expansión y durante el inicio de la fructificación, los nutrientes se acumulan en las hojas porque éstas se convierten en exportadores probables de nutrientes minerales y fotoasimilados hacia los frutos (Ramírez *et al.*, 2002) lo cual coincide con lo encontrado en hojas de café injerto. De acuerdo con Reis *et al.* (2009), debido al agotamiento

Chen *et al.* (2018) found that the age of the *Coffea arabica* leaf did not affect the concentrations of 5-CQA (2.1 to 0.26%). However, according to the results obtained in our research, the phenological stage of the crop affects the concentrations of 5-CQA acid in the coffee plant grafts. The highest concentration of 5-CQA was found in the vegetative stage (0.69%), probably because high levels of chlorogenic acids are required to start blooming in plants; therefore, these acids concentration increases just before blooming (Çırak *et al.*, 2007).

### Sugars content

During the vegetative stage, grafted coffee leaves showed higher concentrations of glucose (10.48%) and fructose (0.99%) (Table 2). Arabinose, galactose and xylose contents showed no statistical differences between the vegetative stage and fruiting. But there was a decrease in all sugars during the blooming stage in the leaves of grafted coffee plants.

Sugar decreases in leaves, mainly glucose and fructose, is due to their role in maintenance and development of the non-photosynthetic tissues such as flowers and fruits (Rennie and Turgeon, 2009). The primary metabolites such as sugars showed a constant increase in flowers and a decrease in leaves during the *Camellia sinensis* blooming, which resulted in an increase in the concentration of caffeine in leaves and a decrease in flowers. There is a negative correlation between sugar content and caffeine (Jia *et al.*, 2016).

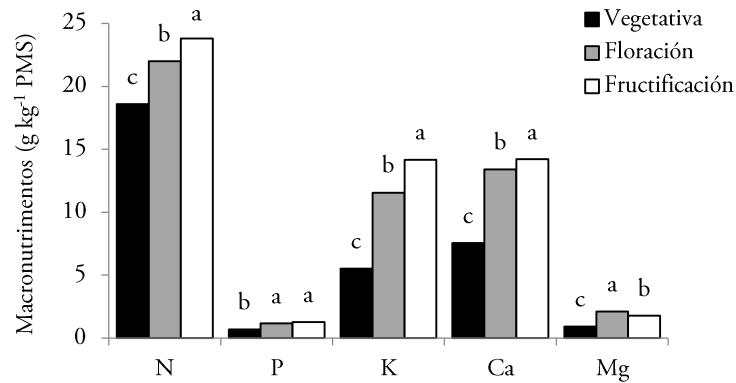


Figura 3. Concentración de macronutrientes en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Peso de materia seca (PMS).

Figure 3. Macronutrient concentration in leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters in each column indicate significant statistical differences (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Dry biomass weight (PMS).

de las reservas foliares de nutrimentos en especial el N y K, el café tiene un año de producción mayor, seguido por uno de producción baja, por la relación fuerte que tienen los nutrimentos de la hoja al fruto.

Bustos *et al.* (2008) mencionaron que los minerales tienen funciones determinadas en el metabolismo de las plantas, que van desde osmorreguladores, constituyentes de estructuras orgánicas, hasta activadores de reacciones enzimáticas. Por lo tanto, la de Fe en cloroplastos, mitocondrias y citosol es mayor durante etapas diferentes del melocotón (Song *et al.*, 2016); esto concuerda con nuestros resultados en que

### Nutritional concentrations in leaves

The highest concentration of macronutrients, except Mg, occurred during the fruiting stage and the lowest in the vegetative stage (Figure 3).

During the blooming stage, the highest concentration of Fe ( $123.05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and Zn ( $10.90 \text{ mg kg}^{-1}$ ) occurred. In the fruiting stage, Cu ( $7.75 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $205.20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and B ( $25.65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) stood out. During the vegetative stage, the coffee leaves presented the lowest concentration of all the micronutrients analyzed (Figure 4).

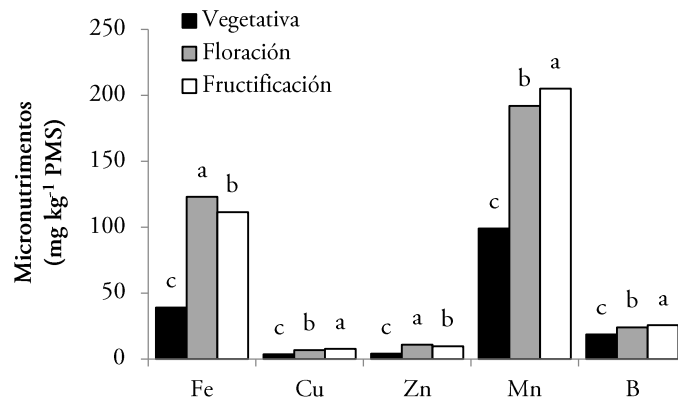


Figura 4. Concentración de micronutrientes en hojas de injerto de *Coffea arabica* var. Caturra rojo sobre *Coffea canephora* var. Romex durante las etapas del ciclo anual en Tlaltetela, Veracruz, México. Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Peso de materia seca (PMS).

Figure 4. Concentration of micronutrients in leaves of *Coffea arabica* var. Caturra rojo grafted on *Coffea canephora* var. Romex during the annual cycle stages in Tlaltetela, Veracruz, Mexico. Different letters in each column indicate statistical differences (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Dry biomass weight (PMS).

la concentración mayor de Fe y el Zn fue durante la floración.

En las hojas de café injerto las variaciones también se deben probablemente a los requerimientos nutrimentales diferentes de las etapas fenológicas en el ciclo anual de la planta. Sadeghian y Salamanca (2015) observaron que la concentración de micronutrientes, como Cu, Mn y B en hojas de café, aumentó de la floración a la cosecha. Estos nutrientes se caracterizan por ser de movilidad baja vía floema y su migración va desde el tercer o cuarto par de hojas que se muestrean en café hacia los frutos. La migración principal de nutrientes foliares hacia los frutos ocurre desde las hojas más cercanas hasta las drupas (o cerezas).

## CONCLUSIONES

Las hojas de café durante la fructificación y en la etapa vegetativa tienen mayor probabilidad de utilizarse con fines nutraceuticos y funcionales porque el área foliar, contenido de clorofila, ácido clorogénico (5-CQA), glucosa y fructuosa son mayores.

La concentración mayor de cafeína, Mg, Fe y Zn fue en la floración, y en la etapa de fructificación se observó el contenido más alto de arabinosa, xilosa N, P, K, Ca, Cu Mn y B.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a la investigación (No. 445756) y a la finca "La Laja", Tlaltetela, Veracruz; por el material vegetal donado.

## LITERATURA CITADA

- Bustos, F., M. González, P. Donoso, V. Gerding, C. Donoso, y B. Escobar 2008. Efecto de distintas dosis de fertilización de liberación controlada (Osmocote®) en el desarrollo de plantas de coigüe, raulí y ulmo. *Rev. Bosque* 29: 155-161.
- Campa, C., L. Urban, L. Mondolot, D. Fabre, S. Roques, S. Roques, Y. Lizzi, J. Aarouf, S. Doulebeau, J. C. Breitler, C. Letrez, L. Toniutti, B. Bertrand, P. La Fisca, L. P. R. Bidet, and H. Étienne. 2017. Juvenile coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase. *Front. Plant Sci.* 8: 1-16.
- Chen, X. M., Z. Ma, and D. D. Kitts. 2018. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chem.* 240: 143-153.
- Çırak, C., J. Radušienė, V. Janulis, and L. Ivanauskas. 2007. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *Bot. Helvetica* 117: 29-36.

Marín-Garza *et al.* (2018) observed in Romex coffee leaves that the highest concentration of N, P and K in the fruiting stage was similar to the results obtained in our experiment; however, Ca and Mg concentrations were higher during blooming. Marín *et al.* (2000) observed that in guava trees there are differences between varieties and grafts of these varieties, mainly due to the interaction between the stem-pattern combination and the environment.

Once the leaves finish their expansion, and at the beginning of the fruiting stage, nutrients accumulate in the leaves. This occurs because leaves become probable exporters of mineral nutrients and are photoassimilated towards the fruits (Ramírez *et al.*, 2002), which coincides with what was found in grafting coffee leaves. According to Reis *et al.* (2009), due to the depletion of foliar nutrient reserves, especially N and K, coffee has a higher production year followed by one of lower production, due to the strong relationship between leaf and fruit nutrients.

Bustos *et al.* (2008) mentioned that minerals have certain functions in plant metabolism, ranging from osmoregulators, constituents of organic structures, to activators of enzymatic reactions. Therefore, Fe in chloroplasts, mitochondria, and cytosol is higher during the different stages of the peach (Song *et al.*, 2016); this agrees with our results in that the highest concentration of Fe and Zn occurred during blooming.

In the grafted coffee leaves, variations are also probably due to the different nutritional requirements of the phenological stages in the annual cycle of the plant. Sadeghian and Salamanca (2015) observed that the concentration of micronutrients such as Cu, Mn and B in coffee leaves increased from blooming to harvest. These nutrients are characterized for being of low mobility via phloem, and their migration goes from the third or fourth pair of leaves sampled in coffee towards the fruits. The main migration of foliar nutrients to the fruits occurs from the closest leaves to the drupes (or cherries).

## CONCLUSIONS

Coffee leaves during fruiting and vegetative stages are more likely to be used for nutraceutical and functional purposes because the leaf area, chlorophyll content, chlorogenic acid (5-CQA), glucose and fructose are higher in the vegetative stage.

- Encalada-Córdova, M., F. Soto-Carreño, D. Morales-Guevara, e I. Álvarez-Bello. 2016. Influencia de la luz en algunas características fisiológicas del café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra) en condiciones de vivero. *Cultivos Trop.* 37: 89-97.
- Fortunato, A. S., F. C. Lidon, P. Batista-Santos, A. E. Leitão, I. P. Pais, A. I. Ribeiro, and J. C. Ramalho. 2010. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *J. Plant Physiol.* 167: 333-342.
- Hečimović, I., A. Belščak-Cvitanović, D. Horžić, and D. Komes. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem.* 129: 991-1000.
- Hernández-Martínez, G, S. Escamilla-Femat, T. Velázquez-Premio, y J. L. Martínez-Marín. 2013. Análisis de la cadena de suministro del café en el Centro de Veracruz: situación actual, retos y oportunidades. *In: López-Morgado, R., V. Sosa-Fernández, G. Díaz-Padilla, y H. A. Contreras-Hernández (comps). Cafeticultura en la Zona Centro del Estado de Veracruz Diagnóstico, productividad y servicios ambientales, INIFAP, México.* pp: 8-36.
- Hernández-Solabac, J. A. M., M. E. Nava-Tablada, S. Díaz-Cárdenas, E. Pérez-Portilla, y E. Escamilla-Prado. 2011. Migración internacional y manejo del café en dos comunidades del Centro de Veracruz. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 14: 807-818.
- Jia, S., Y. Wang, J. Hu, Z. Ding, Q. Liang, Y. Zhang, and H. Wang. 2016. Mineral and metabolic profiles in tea leaves and flowers during flower development. *Plant Physiol. Biochem.* 106: 316-326.
- Marín, M., A. Casassa, A. Rincón, J. Labarca, y Y. Hernández. 2000. Comportamiento de tipos de guayabo (*Psidium guajava* L.), injertados sobre *Psidium friedrichsthalianum* Berg-Niedenzu. *Rev. Fac. Agron.* 17: 384-392.
- Marín-Garza, T., F. C. Gómez-Merino, N. Aguilar-Rivera, J. Murguía-González, L. I. Trejo-Téllez, M. C. Pastelín-Solano, y O. Castañeda-Castro. 2018. Variaciones en área foliar y concentraciones de clorofilas y nutrimentos esenciales en hojas de café robusta (*Coffea canephora* P.) durante un ciclo anual. *Agroproductividad* 11: 36-41.
- Maqueira-López, L. A., W. Torres de la Noval, S. Pérez-Mesa A., O. Roján-Herrera, y R. Morejón R. 2016. Behavior of growth and agricultural yield of two sorghum varieties (*Sorghum bicolor* L. Moench) in the dry season in Los Palacios town. *Cultivos Trop.* 37: 103-108.
- The highest concentration of caffeine, Mg, Fe and Zn occurred during blooming, and in the fruiting stage we observed the highest content of arabinose, xylose N, P, K, Ca, Cu Mn and B.

—End of the English version—



- Montoya-Restrepo, E., J. Hernández-Arredondo, C. Unigarro-Muñoz, y C. Flórez-Ramos. 2017. Estimación del área foliar en café variedad Castillo a libre exposición y su relación con la producción. *Rev. Cenicafé* 68: 55-61.
- Ramírez, F., F. Bertsch, y L. Mora. 2002. Consumo de nutrimentos por los frutos y bandolas de café Caturra durante un ciclo de desarrollo y maduración en Aquiares, Turrialba, Costa Rica. *Agron. Costarric.* 26: 33-42.
- Reis, A. R., J. L. Favarin, L. A. Gallo, E. Malavolta, M. F. Moraes, and J. L. Junior. 2009. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 33: 315-324.
- Rennie, E. A., and R. Turgeon 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14162-14167.
- Rodríguez-Cabello, J., Y. Díaz-Hernández, A. Pérez-González, L. R. Fundora, y P. Rodríguez-Hernández. 2015. Análisis del crecimiento de un genotipo silvestre de *Carica papaya* L. cultivado *ex situ* y cv. "Maradol Roja". *Cultivos Trop.* 36: 96-105.
- Sadeghian, S., y A. Salamanca. 2015. Micronutrimentos en frutos y hojas de café. *Rev. Cenicafé* 66: 73-87.
- San Clemente, M., y E. Peña. 2008. Crecimiento y la eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (*Onagraceae*) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Rev. Acta Biol. Colomb.* 13: 175-186.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. 178 p.
- Song, A.Z., B.B. Zhang, C.H. Zang, R.J. Mai, and M.L. Yu. 2016. Differential expression of iron-sulfur cluster biosynthesis genes during peach flowering. *Biol. Plant.* 60:79-85.

