



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**Programa de Posgrado en Alimentos del Centro
de la República**

(PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Efecto *in vitro* de la fibra dietaria antioxidante de café
(*Coffea arabica L.*) usado sobre el metabolismo colónico”**

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta: L.N. Diego Antonio Hernández Montoya

Dirigido por: Dra. Rocio Campos Vega

Santiago de Querétaro, Qro, abril 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**“Efecto *in vitro* de la fibra dietaria antioxidante de café (*Coffee arabica L.*)
usado sobre el metabolismo colónico”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.N. Diego Antonio Hernández Montoya

Dirigido por:

Dra. Rocio Campos Vega.

Dra. Rocio Campos Vega

Presidente

Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández

Secretario

Firma

Dra. Sandra Mendoza Díaz

Vocal

Firma

Dr. Abraham Wall Medrano

Suplente

Firma

M.N.H. Tania Aguilar López

Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

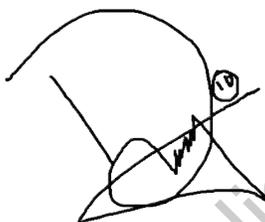
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero 2021

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



L.N. Diego Antonio Hernández Montoya

RESUMEN

El café usado (CU), un subproducto de la industria del café, tiene un gran contenido de macro/micronutrientes y fitoquímicos funcionales. Particularmente ha llamado la atención la fibra dietaria del CU, la cual está compuesta en su gran mayoría por una porción insoluble y mínimamente por una parte soluble. Se ha demostrado que esta fibra tiene capacidad antioxidante y tiene gran potencial quimiopreventivo para el cáncer de colon, esto debido a los productos del metabolismo del microbiota colónico, entre ellos los ácidos grasos de cadena corta. Así mismo se sugiere que la utilización de esta fibra por la microbiota colónica pudiera estar teniendo un efecto modulador sobre las distintas subpoblaciones bacteriana al igual que la regulación del reloj circadiano. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto *in vitro* de la fibra antioxidante de café usado (*Coffea arábica* L.) sobre la composición del microbiota colónico humana, el metabolismo de compuestos antioxidantes y fibra. Para ello se llevó a cabo la siguiente metodología: se dio un pretratamiento al CU, y mediante calentamiento óhmico (CU-OH) que ayudo a concentrar la fibra dietaria, posteriormente se redujo los diterpenos de la muestra ($\leq 1-1.5 \text{ mg. g}^{-1}$). La fibra de café usado baja en diterpenos (FCUBD), las diferentes muestras obtenidas fueron caracterizadas (proximal, fibra dietaria, composición nutraceútica y actividad antioxidante) ABTS y DPPH. Posteriormente se realizó una simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*, acoplada a una membrana de diálisis. La fracción no digerida del CU y FCUBD, fue sometida a la fermentación colónica *in vitro*, usando un inóculo fecal humano; El perfil de metabolitos microbianos (incluyendo los AGCC) derivados de la fermentación colónica simulada se realizó por HS-SPME/GC-MS. La FCUBD tuvo el doble de fibra con respecto al CU (53.1 vs 25.6 mg. g⁻¹); sin embargo, los compuestos fenólicos (34.1 vs. 162.0 mg EAG.g⁻¹) y la capacidad antioxidante [278 vs. 1274 (ABTS), 382 vs. 3152 (DPPH)] disminuyeron. La fermentación colónica *in vitro* mostro una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta para la FCUBD que para el CU en general, teniendo un mejor rendimiento de esto a las 6 horas de fermentación (3.59; 2.16 y 1.45 $\mu\text{mol Eq.g}^{-1}$) para acético, propiónico y butírico, tenido un mejor rendimiento del con respecto al CU (0.00: 0.00; 0.76 $\mu\text{mol Eq/ gr}$ de muestra). FCUBD mostro ser un ingrediente fermentable por la microbiota colónica, lo que pudiera ocasionar un ajuste de las poblaciones microbianas con un consumo frecuente de este ingrediente alto en fibra con actividad antioxidante

Palabras clave: Ácidos grasos de cadena corta, café usado, fibra de café usado baja en diterpenos, microbiota colónica.

SUMMARY

The spent coffee ground (SCG) is a by-product of the coffee industry, has a high content of macronutrients, micronutrients and functional phytochemicals. Particularity has attracted attention to the dietary fiber on the SCG. This is compound it's the major portion by insoluble part and minimum by soluble part. Fiber has been shown to have the antioxidant capacity and can be to help with the prevention of colonic cancer. This due to the production of short-chain fatty acids (SCFAs). Likewise, can suggest the utilization of this fiber by the human gut could be having a modulation effect about different sub-families bacterial like regulation of the circadian clock. The objective of this investigation is the evaluation effect in vitro of antioxidant dietary fiber from the spent coffee ground (*Coffea arabica L.*) about the composition of the human gut, the metabolism of antioxidants compounds and fiber. For them make to do the next methodology: will be given to spent coffee ground a pretreatment and about ohmic heating increment the dietary fiber concentration, subsequently decreased the amount diterpenes on the sample ($\leq 1-1.5 \text{ mg. g}^{-1}$); The dietary fiber from Spent coffee ground low on diterpenes (DF-SCG). The different samples were submitted to proximal analysis, following of nutraceutical determination; evaluated the antioxidant activity through the methods DPPH and ABTS. Subsequently to do a simulation of in vitro gastrointestinal digestion coupled to a dialysis membrane. The undigested fraction was subsequently subjected to in vitro colonic fermentation, where a human fecal inoculum was used; Subsequently, using molecular techniques, the effect of this fraction on the microbial profile and the production of short-chain fatty acids and their derivatives was determined by HS-SPME/GC-MS. Results, DF-SCG show to the double content of carbohydrates with respect to SCG (53.1 vs 25.6 mg/gr); However, the phenolics compound (34.1 vs. 162.0 mg EAG.g-1), and antioxidant capacity [278 vs. 1274 (ABTS), 382 vs. 3152 (DPPH)], decreased significantly. Colonic fermentation in vitro show to a major production of SCFAs for to DF-SCG that SCG that SCG in general, having a better yield of these to 6 hours of fermentation (3.59; 2.16 y 1.45 $\mu\text{mol Eq/ gr/ sample}$) for acetic, propionic and butyric having a better yield with respect to SCG (0.00: 0.00; 0.76 $\mu\text{mol Eq/ gr/ sample}$). DF-SCG showed to be a fermentable ingredient by human gut, that can be modulated microbial populations with a frequency consumer of this ingredient high on fiber and antioxidant capacity.

(Key Word: Human gut, spent coffee ground, diterpenes, short chain fatty acids)

Dedicatorias

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca brindada durante la realización de la Maestría.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** por aceptarme en el programa de posgrado y todo el apoyo en general.

A la **Dra. Rocio Campos Vega** por aceptarme como tesista, apoyarme en mi formación con sus consejos, su paciencia, su comprensión y buen ánimo, cuando los momentos parecían ser complicados y me ayudaba a entender que las cosas no siempre resultan lo que esperamos, pero eso no quiere decir que estemos en algo incorrecto.

A mi comité de tesis: **Dr Abraham Wall Medrano, Dra Sandra Mendoza Diaz, Dr Tania Aguilar Hernández, Dr Adres Cruz Hernández**, por siempre apoyarme con sus consejos y asesorías sin importar el día y siempre con la mejor disposición.

A mis compañeras de laboratorio **Abril, Vane, Karen** y en especial a mi hermana mayor **Eli** por apoyarme con su conocimiento en el área, con las diferentes técnicas a realizar, por su gran paciencia para poder buscar la mejor manera de realizar las diferentes tareas a realizar en el laboratorio por sus consejos cuando la situación se complicaba un poco. Además de agradecer a mis compañeros de generación y laboratorio **Fer, Norma y Rodri** que siempre se dejaban mal influenciar por un servidor, para hacer la hora del café y así sacar algo de estrés por las diferentes labores que nos demandaba la maestría.

A mis compañeros de maestría **Daniel y Andrés** que me apoyaban con la asesorías, de diferentes materias que se me llegaron a complicar, por su paciencia y siempre buena guía durante la maestría gracias.

A mis compañeros de casa **Eli Morales y Alex** por darme hospedaje, consejos, pláticas de fin de semana y sobre todo amor de familia de foráneos que tanto buscamos al llegar a un lugar nuevo.

A mis padres **Rodolfo y Gloria** por siempre apoyarme en cualquier etapa de mi vida, por siempre, aunque con miedos impulsar mi crecimiento personal y profesional, por apoyar mis sueños por más locos, lejanos o rebuscados que aparezcan siempre después de un momento de reflexión, me decían si vamos a apoyarte.

A mis hermanos **Oscar y Erika** por su apoyo, por siempre querer saber a lo que me dedico e interesarse y por siempre tener buenas dudas, que me ayudaban a buscar cosas fuera de mi horizonte de aprendizaje e incluso participar en varios de mis experimentos desde la licenciatura de manera directa e indirecta y siempre ser los mejores jueces de mi trabajo.

Al amor de mi vida, **Karen (flaquita)** por estar a mi lado desde hace más de 8 años, por apoyar mis sueños, caminar de mi mano en ese tiempo como novia y ahora como mi esposa, por enfrentarnos juntos como pareja a los buenos momentos y a las adversidades que la vida nos ha puesto y por todos los retos que la vida nos pondrá, gracias de todo corazón por ser mi compañera de vida.

A mis abuelitos **Manuel y mi keka** por apoyarme en mis primeros pasos laborales, en los cuales me inculcaron valores que hasta la fecha me han servido mucho para conducirme, por todo su amor gracias infinitas.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Generalidades del café	3
2.2 Producción	5
2.3 Subproductos del café	6
2.4.1 Café usado	8
2.5 Composición química del café usado	8
2.6 Compuestos antioxidantes del café usado	12
2.6.1 Compuestos fenólicos	13
2.6.2 Flavonoides	13
2.6.3 Taninos	14
2.7 Capacidad antioxidante	14
2.7.1 Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante	15
2.8 Diterpenos en el café usado	17
2.10 Metabolismo colónico del café usado	21
2.11 Metabolismo colónico de los compuestos antioxidantes	21
2.12 Microbiota colónica	23
2.13 Modelos <i>in vitro</i> de fermentación colónica	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1 objetivo general:	27
5.2 objetivos específicos:	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1.1 Material biológico	28
6.1.2 Reactivos	28
6.2 Métodos	30
6.2.1 Obtención de fibra	30
6.2.1.1 Pre tratamiento de café usado	30
6.2.1.2 Extracción de fibra por calentamiento óhmico en lote	30
6.2.1.3 Extracción de fibra baja en diterpenos	30
6.3.1 Análisis proximal	31
6.3.1.1 Determinación de humedad (925.23)	31
6.3.1.2 Determinación de lípidos (920.39)	31
6.3.1.3 Determinación de proteína (920.105)	32

6.3.1.4 Determinación de cenizas (945.46)	32
6.3.1.5 Determinación de carbohidratos	33
6.3.1.6 Determinación de fibra total	33
6.3.1.7 Determinación de fibra insoluble	33
6.3.1.8 Determinación de fibra soluble	34
6.4.1 Análisis nutracéutico	34
6.4.1.1 Extracto etanólico	34
6.4.1.2 Cuantificación de fenoles totales	35
6.4.1.3 Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD	35
6.5.1 Capacidad antioxidante	36
6.5.1.1 ABTS	36
6.5.1.2 Método DPPH	37
6.6.1 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	37
6.6.1.1 Simulación de las condiciones de la boca	37
6.6.1.2 Simulación de las condiciones en el estómago	38
6.6.1.3 Simulación de las condiciones en el intestino delgado	38
6.7.1 Simulación de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND	38
6.9.1 Identificación de los compuestos derivados del metabolismo colónico gases-MS/MS	39
6.10 Análisis estadístico	40
7. Resultados y discusión	41
7.1 Composición química del café usado, fibra de CU obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos	41
7.2 Contenido de fenoles totales del café usado, fibra de CU obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos	42
7.3 Determinación de capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS en el café usado, fibra de CU obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos.	44
7.5 Medición del pH durante la fermentación colónica <i>In vitro</i> del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos	46
7.6 Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación <i>in vitro</i> del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos	48
7.7 Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos secundarios de la fermentación colónica <i>In vitro</i>	51
7.7 Metabolitos colónicos asociados a la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.	55
8.0 Conclusiones	61
ANEXO I	62
ANEXO II	68

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de figuras.

Figura 1 Capas del fruto del café	4
Figura 2. Producción mundial de café, en miles de toneladas al año.....	6
Figura 3. Algunos compuestos fenólicos contenidos en el café usado.....	12
Figura 4. Reacción del DPPH con antioxidante.....	17
Figura 5. Estructuras de kahweol y Cafestol.	17
Figura 6. Posibles mecanismos propuestos para la prevención de cáncer por polifenoles	23
Figura 7. Proceso experimental.....	29
Figura 8. Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos productos de la fermentación colónica <i>In vitro</i> del café usado a las 4 y 6 horas de fermentación..	53
Figura 9. Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos producto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fibra de café usado baja en diterpeno a las 4 y 6 horas de fermentación.....	54
Figura 10. Metabolitos secundarios asociados a la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café.....	59
Figura 11. Metabolitos secundarios asociados a la fermentación colónica de la fibra de café usado bajo en diterpeno	60

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química de los subproductos del café.	7
Tabla 2. Composición química del café usado (%).	11
Tabla 3. Recomendación de consumo diario de fibra dietaria (g/día).....	19
Tabla 4. Composición química del café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).	41
Tabla 5. Determinación de fenoles totales en el café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).	43
Tabla 6. Determinación de capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en el café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).	44
Tabla 7. Compuestos fenólicos identificados por HPLC café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).	46
Tabla 8. Medición del pH durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.	47
Tabla 9. Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.	50

1. Introducción

El café es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial. El proceso al cuál se somete el grano de café para preparar esta bebida es muy importante, teniendo especial importancia el tostado ya que en él se desarrollan las características de sabor (Wei et al., 2012). Sin embargo, esta bebida solo se obtiene del grano molido y filtrado, por lo que, la mayor parte de la planta es desechada. Actualmente, se han dado pocos usos económicamente viables a este residuo biológico, por lo que dichos materiales se han considerado como un contaminante ecológico (Dorsey & Jones, 2017).

Uno de los subproductos que más genera esta industria es el café usado (CU), el cual se recupera de los filtros de las cafeteras posterior a la obtención de la bebida. El CU al ser rico en diferentes nutrientes, así como minerales, tiene un alto potencial de aplicación para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, siendo la fibra dietaria y los compuestos fenólicos asociados dos de sus componentes funcionales de mayor importancia (Jiménez-Zamora, Pastoriza, & Rufián-Henares, 2015).

Por otra parte, diversas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la diabetes mellitus tipo 2, son las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Según la organización mundial de la salud este padecimiento aumentará hasta 52 millones para el 2030, mientras que padecimientos como la obesidad están alcanzando niveles epidémicos, representando un problema a nivel mundial. El bajo consumo de fibra, el estilo de vida sedentario, además de un consumo excesivo de calorías, conducen a la obesidad lo cual provoca un estado inflamatorio crónico (Martinez-Saez & del Castillo, 2019).

México se encuentra entre los primeros países con mayor índice de obesidad y diabetes tipo 2. Lo anterior se atribuye principalmente al tipo de dieta que se lleva en el país. La obesidad inducida por la dieta y el estilo de vida se ha asociado con un aumento de 30 a 70 % en el riesgo de cáncer de colon en los hombres y está relacionada con los cambios en la microbiota intestinal. Los cambios hacia un equilibrio en la composición de la microbiota intestinal pueden

ayudar a disminuir el peso corporal, inhibir la inflamación y mejorar la permeabilidad intestinal (Ohland & Jobin, 2014; Sharon et al., 2014). Se ha demostrado que una dieta alta en fibra favorece a la salud del colon, ya que es el sitio de fermentación de la misma por el microbiota residente, generándose ácidos grasos de cadena corta (AGCC), entre otros metabolitos, los cuales son aprovechados por el epitelio intestinal para mantener su estructura y función, evitando la posible generación de cáncer de colon (Manrique Vergara & González Sánchez, 2017).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

2. Antecedentes

2.1 Generalidades del café

La palabra “café” proviene del árabe *Quahweh* y hoy en día en diferentes países se utiliza esta palabra para referirnos a la bebida. En la antigüedad los efectos estimulantes del café eran bien conocidos por los árabes quienes fueron los primeros en realizar plantaciones en regiones de Kaffa en Etiopia. Taxonómicamente, el café es una importante planta de la familia *rubiaceae* subfamilia *Cinchonoideae* y tribu *Coffeae* e incluye más de 400 géneros y de 4800 a 5000 especies. Este se da principalmente en zonas tropicales a 21°C y a los 1,900 metros sobre el nivel del mar. El grano de café se cosecha a mano y se seleccionan los frutos maduros de los verdes, al igual que los muy húmedos de los muy secos. Los granos se secan por separado para no afectar la calidad del producto final (Murphy & Naidu, 2012).

El café es una de las bebidas más populares en el mundo, hecho que eleva su valor comercial a nivel internacional (Sánchez et al., 2018). A mediados del siglo XVI el café tomó un papel importante dentro de los consumidores quienes adoptaron este producto como de uso común. El café pasó de ser un producto puro a una bebida especializada, la cual va ganando terreno en el mercado e importantes empresas han extendido su disponibilidad en casi cualquier parte del mundo. Además de su consumo a granel en muchos países, ahora se sabe que el consumo constante de esta bebida tiene efectos benéficos para la salud (Dorsey & Jones, 2017)

Desde un punto de vista comercial, el café proviene de dos especies que juntas comprenden casi toda la producción mundial. La primera es *Coffea arabica* L. también llamada arábica; esta se originó en las tierras altas del noroeste de Abisinia y sureste de Sudan, fue utilizada por primera vez por los pueblos árabes alrededor del mar rojo (Yemen). Actualmente se producen 5.1 millones de toneladas al año, teniendo un mayor valor en el mercado. La segunda especie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner var. *Robusta* llamada “robusta”, puede encontrarse aún de forma salvaje en las costas tropicales de África central. Esta se puede

producir a menor altura y en condiciones de mayor humedad debido a su adaptabilidad; a pesar de que su producción es más económica no es tan valorado en el mercado y al año se producen cerca 3.6 millones de toneladas (Colzi et al., 2017).

El fruto del café o cereza está constituido por diferentes secciones las cuales consisten, en su capa más externa, por una piel llamada pericarpio la cual puede ir de la tonalidad verde a roja, amarilla o naranja, dependiendo de la especie y su estado de madurez. Seguido de esto podemos encontrar el mesocarpio, este presenta un color amarillento, fibroso y dulce. En la tercer capa se encuentra el mucílago el cual tiene una consistencia traslúcida, delgada, incolora, viscosa y altamente hidratada; luego encontramos un endocarpio delgado de color amarillento y finalmente la piel plateada, la cual cubre cada hemisferio del grano llamado endospermo **Figura 1** (Esquivel & Jiménez, 2012).

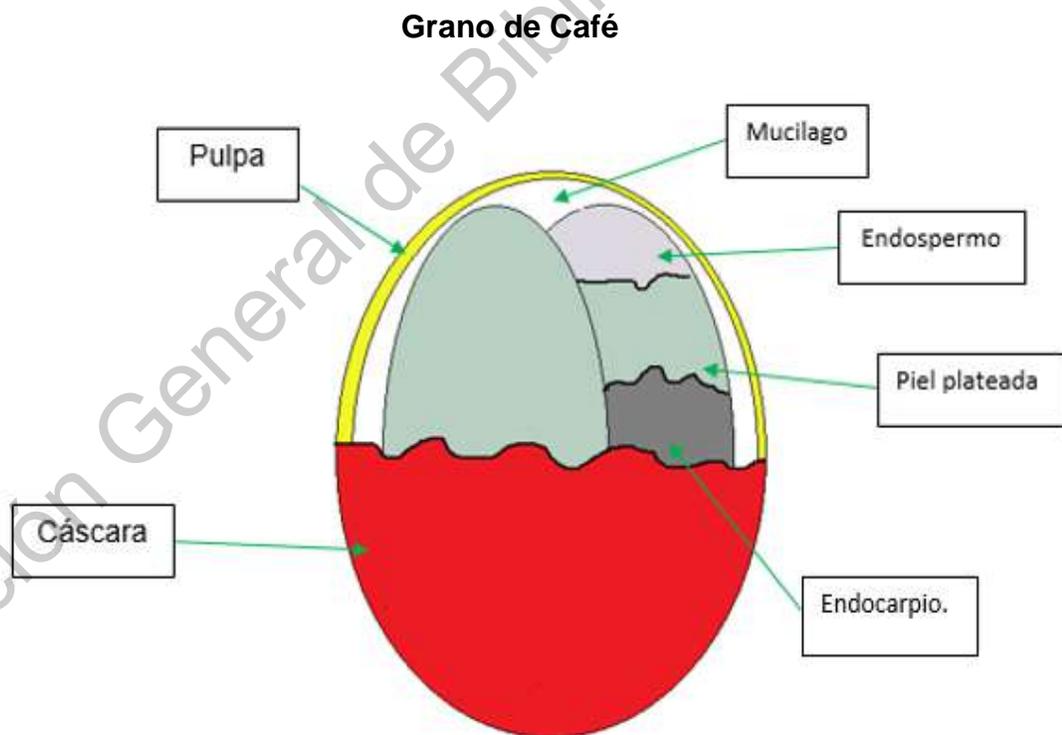


Figura 1 Capas del fruto del café (Modificado de: Esquivel & Jiménez, 2012).

El café es conocido por contener un estimulante del sistema nervioso central: la cafeína (Esquivel & Jiménez, 2012). Pero para poder ingerir la bebida, el grano tiene que pasar por un proceso de tostado, el cual va a producir una serie de reacciones, serán importantes para el desarrollo del olor, sabor, color y textura características de la bebida (Wei et al., 2012). Además de estas características, el proceso de tostado ayuda a la producción de compuestos antioxidantes, los cuales han demostrado ser potencialmente benéficos para la salud, además de contener compuestos importantes como carbohidratos, lípidos, entre otros (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

2.2 Producción

La producción de café a nivel mundial es muy importante, ya que más de 80 países lo producen y solo el petróleo se produce más que este. Esta agroindustria tuvo un crecimiento del 27 % entre 2005 y 2015 (Campos-Vega, Loarca-Piña, Vergara-Castañeda, & Oomah, 2015). Más de 25 millones de pequeños productores a nivel mundial depende del café para subsistir: Brasil, Vietnam y Colombia representan más del 50 % de la producción de este y se estima que más de 2.25 mil millones de tazas de café son bebidas todos los días (Murphy & Naidu, 2012). Europa es el continente que más consume café con un 33 % de la producción mundial, seguido de Asia y Oceanía con un 21.7 % y en último lugar esta Centro América y México quienes solo consumen el 3.2 % de la producción mundial (ICO 2017).

Según los últimos datos, en el 2018-2019 se produjeron 102,561 toneladas de café a nivel mundial, el mayor productor fue Brasil, el cual produjo en el último año 3,775 toneladas de café lo que representa el 36.8 % de la producción mundial. México ocupa el sexto lugar en producción de café en Latino América, con una producción 261.8 toneladas de café entre 2018 – 2019 , lo que representa un 2.55 % de la producción mundial y un 5.8 % de crecimiento en su producción anual (ICO, 2020) (Figura 2).



Figura 2. Producción mundial de café, en miles de toneladas al año (ICO, 2020).

2.3 Subproductos del café

La industria del café es una de las más importantes a nivel mundial, pero al mismo tiempo es una de las que más produce desechos. Se estima que cada año esta produce más de 2 billones de toneladas de subproductos generados a partir del procesamiento de los granos de café (Jiménez, Pastoriza, & Rufián, 2015).

Esto ocasiona un problema a los países con mayor producción de café como los son: Brasil, Vietnam, indonesia y Colombia, ya que no solo es un desecho industrial, sino que ecológicamente genera un impacto ambiental. Estos cuatro países producen más 6 mil toneladas de café al año, lo que representa cerca de 218 mil toneladas de subproductos, ocasionando por la descomposición gases con efecto invernadero (Dorsey & Jones, 2017).

La nueva aplicación en la gestión de residuos industriales vino a revalorizar los desechos generados por esta industria, ya que el rescate para su utilización ha generado un manejo sustentable de los mismos. Los tratamientos a través de los cuales son procesados estos subproductos permiten la recuperación de sustancias

benéficas para la salud, como antioxidantes naturales, agentes antimicrobianos y vitaminas, dándoles un valor agregado a estos productos. También se han logrado obtener: enzimas, celulosa, almidón, lípidos, proteínas y pigmentos. Todos de gran interés a la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Murthy & Naidu, 2012b). La industria del café es muy diversa, el procesamiento del café generalmente se puede describir en los siguientes pasos: sembrar, cosechar, procesar las cerezas, secar, comercializar, tostar, moler y finalmente elaborar la bebida. Es importante mencionar que la mayoría de los fitoquímicos y nutrimentos que promueven la salud se encuentran en la cereza del café y el 90 % de la cereza se desecha durante el procesamiento (De Hond et al., 2018). El medio por el cual se procesa el café, genera principalmente 4 subproductos: pulpa de café, cáscara, piel plateada y CU, todos ellos con propiedades nutricionales importantes. Por lo anterior están siendo investigado con la finalidad de generar, ingredientes de valor agregado a diferentes alimentos (Janissen & Huynh, 2018a). La composición química de los diferentes subproductos del café se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición química de los subproductos del café.

Composición (%)	Pulpa de café	Cáscara	Piel plateada	Café usado
Carbohidratos	44-50	35	21-32	82
Lípidos	5.2	5.2	2-10	6
Proteínas	10-12	9.2	7-15	13.6
Minerales	-	10.7	-	1.6
Fibra	18-21	30.8	62.4	60.5

Con informacion de : (Esquivel & Jiménez, 2012; Campos-Vega, et al., 2015; Janissen & Huynh, 2018a).

2.4.1 Café usado

El CU es resultado del percolado, con agua caliente, del café tostado y molido. Al año se genera cerca de 6 millones de toneladas de este residuo y no se consideraba de interés comercial (Dorsey & Jones, 2017). Este subproducto era raramente investigado, ya que se consideraba un desecho; sin embargo, en la se ha presentado un incremento en las publicaciones que exploran los beneficios que se pueden obtener a partir de su utilización (Campos - Vega et al., 2015).

El CU, es un subproducto de composición fina, con una alta carga orgánica y muy húmedo, por lo cual origina una gran contaminación, debido a la gran demanda de oxígeno que requiere para su descomposición (Jiménez-Zamora et al., 2015). Inicialmente la composición del CU hizo que se destinara a la producción de biocombustibles, siendo Brasil uno de los principales productores (Jenkins, Stageman, Fortune, & Chuck, 2014).

En Taiwán en el año 2009, debido a su alto contenido orgánico, como los carbohidratos, proteína, fibra, cafeína, polifenoles, taninos y pectinas, el café usado era comercializado como alimento para los animales, acondicionador del suelo y fertilizante orgánico o se reutilizaba aún más como una materia prima potencial, para realizar productos más útiles como enzimas, ácidos orgánicos, saborizantes y aromatizantes (Tsai, Liu, & Hsieh, 2012). Este subproducto, al ser rico en diversos nutrimentos, ha sido propuesto recientemente como un nuevo ingrediente funcional, con el potencial de ejercer beneficios a la salud, como terapia para pacientes con obesidad o con un efecto protector anticancerígeno, producto de la digestión de estos compuestos (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

2.5 Composición química del café usado

La composición química de los diferentes subproductos del café varía dependiendo de los procesos por los cuales atraviesa el grano de seco a húmedo y del tostado a la elaboración de la bebida. Cada uno de estos procesos va a originar pequeños cambios en la concentración de sustancias químicas (Janissen & Huynh, 2018).

Los carbohidratos contenidos en el CU representan cerca del 50 % del peso total, encontrándose hasta un 46.8 % de manosa, un 30.4 % de galactosa, un 19 % de glucosa y un 3.8 % de arabinosa, siendo los mánanos, los principales polisacáridos (Pérez-Bustillo et al. 2019). Las variaciones en las cantidades de polisacáridos contenidos en el CU podrían deberse a los métodos de extracción empleados sobre la matriz o la variedad de grano utilizada. La hidrólisis de los mánanos origina en la matriz un alto contenido de manooligosacáridos, de los cuales los principales componentes son manobiosa, manotriosa y manotetraosa. Estos estimulan el crecimiento de bifidobacterias, además de favorecer la disminución de la grasa visceral en humanos por consumo de café (Campos-Vega et al., 2015).

La proteína contenida en los granos de CU, al igual que los carbohidratos, va a depender del proceso previo y el método de extracción que se le haya dado a la matriz para la elaboración de la bebida, este contenido puede representar hasta el 10 % del peso seco (Kovalcik, Obruca, & Marova, 2018).

Algunos autores han reportado, la cantidad de proteína que puede llegar a tener el CU; si a este se le da un tostado medio o un tostado oscuro, la concentración de proteína puede ir de 15.9 a 11.2 %. Debido a esto podemos confirmar, que efectivamente, el proceso dado a la matriz tiene una influencia directa en la composición final del CU (López-Barrera, Vázquez-Sánchez, Loarca-Piña, & Campos-Vega, 2016).

La concentración de lípidos que pueda llegar a tener el CU depende del proceso que se le haya dado ya sea, tostado, secado e inclusive el método de extracción de la bebida. Al igual que los dos compuestos anteriores se puede ver diferencias dependiendo de los procesos; se han reportado intervalos de 10 hasta un 27 % de contenido lipídico, el cual puede variar ya que con extracción de éter ha llegado hasta 29 %, o de 7 a 13 % de peso seco en suspensión de heptano durante 3 horas. Comercialmente el heptano al 99.5 % ha sido usado para recuperar aceite a nivel industrial de los granos de CU, lo que ha dado un rendimiento de cerca de 26 %; sin embargo, aún no hay muchos usos comerciales que se le hayan dado a

este tipo de aceite (Campos-Vega et al., 2015). De igual manera se han hecho estudios en el contenido lipídico tanto en el grano con tostado medio como el tostado oscuro obteniendo valores de 15.1 y 15.3 % respectivamente por gramo de CU, con lo cual pone de manifiesto que todos los cambios físico-químicos aplicados a la matriz influirán en su contenido final (López-Barrera et al., 2016).

Por otra parte, las plantas tienen los elementos necesarios para poder captar los diferentes minerales para obtener de ellos moléculas orgánicas para su crecimiento (Campos-Vega et al., 2014). El café presenta un contenido variado de minerales, de estos se han reportado concentraciones totales de 0.82 a 3.52 %, de los cuales destaca el K, encontrándose también Mg, P, Ca, Na, Fe, Mn y Cu (Campos-Vega et al., 2015) **(Tabla 2)**.

Tabla 2. Composición química del café usado (%)

Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra total	Fibra Insoluble	Fibra Soluble	Autor
17.99 ± 0.23	16.54 ± 0.43	59.02 ± 0.02	51.54 ± 2.40	50.82 ± 2.48	0.71 ± 2.09	(Hernández-Arriaga, Dave Oomah, & Campos-Vega, 2017b)
15.8 ± 0.1	15.7 ± 0.1	62.5 ± 0.2	48.2 ± 1.6	42.9 ± 1.07	2.2 ± 0.2	(López-Barrera et al., 2016a)
13.6 ± 1.3	1.6 ± 0.3	71.4 ± 6.3	54.6 ± 4.3	47.1 ± 2.9	6.3 ± 1.0	(Jiménez-Zamora et al., 2015)
16.2 ± 0.20	10.10 ± 0.10	57.40 ± 0.30	53.9 ± 0.10	52.8 ± 0.00	1.10 ± 0.10	(García-Gutiérrez, et al., 2017)
16.3 ± 0.6	12.1 ± 1.4	69.4 ± 2.2	57.8 ± 1.0	56.8 ± 1.0	0.8 ± 1.0	(Vázquez-Sánchez et al., 2018)
13.6 ± 1.3	1.6 ± 0.3	71.4 ± 6.3	54.6 ± 4.3	47.1 ± 2.9	6.3 ± 1.0	(Esquivel & Jiménez, 2012)

2.6 Compuestos antioxidantes del café usado

Los antioxidantes se pueden encontrar de forma exógena o endógena. Los antioxidantes exógenos, se encuentran de forma natural en alimentos y bebidas e incluyen: fitoquímicos, vitaminas, antioxidantes sintéticos, como el hidroxitolueno butilado (BHT), el hidroxianisol butilado (BHA), entre otros. Algunas de las moléculas antioxidantes exógenas más comunes se encuentran en las frutas, verduras y otras fuentes de alimentos (Dorsey & Jones, 2017). Los subproductos pueden ser una fuente natural de compuestos antioxidantes, que podrían llegar a considerarse como seguros, a diferencia de los sintéticos. El CU es una fuente natural de estos compuestos y por lo tanto se considera su uso como seguro (Murthy & Naidu, 2012b).

El CU tiene diferentes compuestos antioxidantes como: fenoles, flavonoides, taninos, ácido clorogénico, ac. cafeico y ac. ferúlico (Figura 3). Los compuestos antioxidantes, neutralizan el exceso de radicales libres para proteger a las células contra el daño oxidativo y contribuir a la prevención de enfermedades. Además, se ha demostrado que los antioxidantes tiene actividad antimicrobiana contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Duangjai et al., 2016).



Figura 3. Algunos compuestos fenólicos contenidos en el café usado. Modificado de (Dorsey & Jones, 2017).

2.6.1 Compuestos fenólicos

El café, es fuente de compuestos fenólicos, los cuales tienen diferentes funciones en el organismo y podrían ser utilizados para la fortificación de diferentes alimentos (Murthy & Naidu, 2012b). Dentro de los fenoles con mayor concentración en la bebida podemos encontrar: ácido caféico, ac. ferúlico, ac. cumárico y ac. clorogénico, los cuales tienen actividad antioxidante (Monente, Ludwig, Irigoyen, De Peña, & Cid, 2015).

Al igual que todos los componentes del café, la concentración de compuestos fenólicos ha sido estudiada bajo diferentes procesos, en los cuales se ha podido obtener resultados interesantes. Se han realizado estudios de comparación de tostado medio y tostado oscuro. El CU, conserva una mayor cantidad de compuestos fenólicos durante el tostado medio que el tostado oscuro (38.6 % vs 27.8 %); la concentración de flavonoides puede ser de 47.5 % a 29.7 % y la taninos de 21.5 % a 17.3 % (Campos-Vega et al., 2015). En estudios más recientes, se adicionó la fibra del CU a una galleta, para evaluar los compuestos fenólicos, pero esta vez poniendo especial atención a su bioaccesibilidad. Se observó que la concentración de compuestos fenólicos durante la digestión *in vitro* de la galleta con la fibra fue más alta que la galleta comercial, lo que sugiere que la adición de este ingrediente, puede traer beneficios para la salud (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

2.6.2 Flavonoides

Los flavonoides son otro grupo de compuestos antioxidantes presente en los diferentes subproductos del café, incluido el CU. Los flavonoides son los antioxidantes más comunes en la dieta del humano, ya que se puede encontrar en una gran variedad de plantas incluyendo el café (Dorsey & Jones, 2017). Se ha demostrado que los flavonoides contribuyen a la reducción de enfermedades coronarias y ayudan al equilibrio microbiano a nivel intestinal. Estas capacidades han sido ampliamente estudiadas e inclusive se menciona, que las personas que tienen una dieta alta en flavonoides, tienen un 60 % menos probabilidad de sufrir enfermedades cardiacas que las personas que no consumen estas sustancias (Cardona, et al. 2013).

Nuevamente el CU, con tostado medio presenta una mayor concentración de estos compuestos en comparación con el tostado oscuro (Campos-Vega et al., 2015).

2.6.3 Taninos

La concentración de taninos en el CU puede ser por lo general alta, ya sea a nivel industrial o en el hogar, normalmente el CU es desechado e inclusive incinerado, lo que lo convierte, por su alto contenido de taninos, además de otras sustancias, en un material de desecho peligroso (De Melo, Barbosa, Passos, & Silva, 2014). El CU presenta niveles de taninos de 0.2 -0.3 mg/ml (Murthy & Naidu, 2012a).

Los taninos son un grupo de compuestos, que comúnmente se encuentran con mayor concentración en la corteza de las plantas y en una menor concentración en hojas, frutas, flores y semillas. Los taninos se consideran agentes anti-nutricionales, por lo que su uso es limitado como alimento para animales; sin embargo, en concentraciones bajas los taninos tienen beneficios para la salud incluyendo: actividad anti-bacterial, anti-microbiana, anti-alérgica, e inclusive su consumo frecuente puede ayudar en enfermedades cardiacas, dependiendo de la sensibilidad de cada organismo (Janissen & Huynh, 2018).

2.7 Capacidad antioxidante

Los seres humanos tenemos un sistema complejo de defensa de enzimas, antioxidantes y no enzimáticas naturales que contrarrestan los efectos dañinos de los radicales libres y otros oxidantes. Los radicales libres son responsables de causar una gran cantidad de enfermedades incluido cáncer. La protección contra los radicales libres se puede mejorar con una ingesta amplia de antioxidantes. Una evidencia sustancial indica que los alimentos que contienen antioxidantes pueden ser de gran importancia en la prevención de enfermedades (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013). Otro efecto atribuido a la actividad antioxidante es como antibacteriano, inhibiendo el crecimiento de diferentes tipos de bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Duangjai et al., 2016)

El CU es reconocido como una buena fuente de compuestos antioxidantes, extraídos principalmente en soluciones acuosas u orgánicas. Estudios sugieren que esta capacidad antioxidante es debido a la concentración de melanoidinas, las cuales se encuentran en la porción insoluble [Jiménez-Zamora et al., \(2015\)](#). En el CU se han identificado principalmente dos compuestos fenólicos más abundantes el ácido clorogénico y el ácido gálico presenta hasta un 80% del peso total de los compuestos fenólicos, de igual manera se realizó una comparación entre tostado medio y oscuro presentando una concentración de ácido gálico de 2.5 mg/g y 5.6 mg/g de ácido clorogénico el doble del tostado oscuro [\(López-Barrera et al., 2016\)](#).

2.7.1 Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante

ABTS (Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

La capacidad antioxidante de un compuesto, puede ser medida por la técnica ABTS [\(Jiménez-Zamora et al., 2015\)](#). Esta técnica utiliza un espectrofotómetro de diodos para poder medir la pérdida de color que se puede observar cuando se agrega un antioxidante al cromóforo azul-verde ABTS^{•+}. Si se produce actividad antioxidante este reducirá al ABTS^{•+}, lo cual produce una decoloración. Esta técnica se prepara agregando dióxido de magnesio sólido a una solución acuosa 5mM ABTS, se puede utilizar a la par un análogo soluble con vitamina E, como un estándar antioxidante. Produciendo una curva de calibración para el Trolox a concentraciones de 0 a 350 μM con intervalos de 50 μM [\(Alam et al., 2013\)](#). La absorción disminuye a medida que se termina el catión radical ABTS. Este ensayo mide los antioxidantes HAT (transferencia de átomos de hidrogeno), pero puede utilizarse para sistemas acuosos y lipofílicos. Este tipo de ensayo reacciona a la estequiometría de la vitamina E soluble en agua y al Trolox (2:1 del radical a Trolox). La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (informada en unidades equivalentes de Trolox) es una medida de la fuerza antioxidante basada en Trolox. Los resultados del ensayo ABTS se informan típicamente de una manera dependiente de la dosis (moles de cationes radicales ABTS consumidos / moles de antioxidante por un intervalo de tiempo determinado [\(Dorsey & Jones, 2017\)](#)).

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Esta es una de las técnicas que contiene radicales cromógenos, que reacciona directamente con antioxidantes (Echavarría, Pagan, & Ibarz, 2013).

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo o DPPH, es un radical libre orgánico que posee un electrón que se deslocaliza a través del sistema de electrones pi. Esta molécula absorbe luz a 519 nm en etanol. Cuando se agrega un antioxidante a una solución que contiene DPPH, la absorción de DPPH, a 519 nm, disminuye a medida que el radical DPPH se termina con la adición de antioxidante. El radical DPPH se puede determinar con los mecanismos HAT (transferencia de átomos de hidrogeno) y SET (transferencia de electrones); por lo tanto, esta técnica es incapaz de diferenciar entre los dos mecanismos. Los datos de los ensayos DPPH se reportan típicamente como tasas cinéticas (moles DPPH consumidos /Tiempo / mol antioxidante). Se podría decir que, según el tipo de mecanismo antioxidante (HAT o SET), pero no se puede diferenciar una de otra. El ensayo DPPH se reporta como (moles de DPPH consumido tiempo / mol antioxidante) (Dorsey & Jones, 2017). La deslocalización de los electrones también da lugar a un color violeta profundo, caracterizado por una banda de absorción en una solución de etanol centrada a aproximadamente 517 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de un sustrato (AH) que puede donar a un átomo de hidrógeno (**Figura 4**), esto da lugar a la forma reducida de este color violeta (Alam et al., 2013).

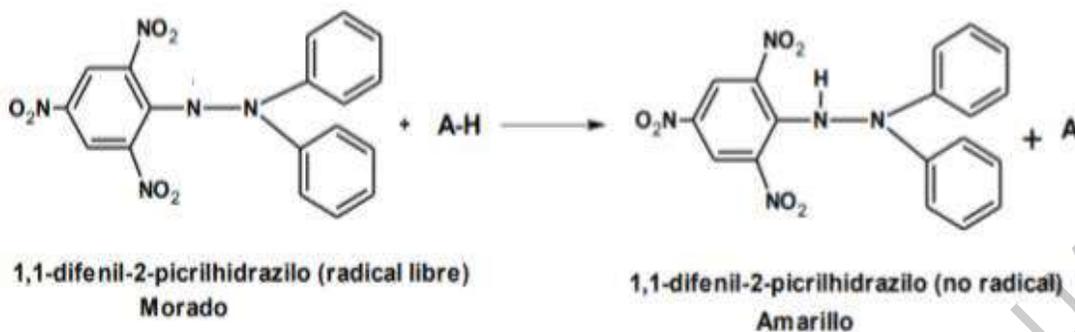


Figura 4. Reacción del dpph con antioxidante. Tomada de (Alam et al., 2013).

2.8 Diterpenos en el café usado

Los granos de café contiene en su fracción lipídica: triacilglicerolos, esterolos, tocoferoles y diterpenos (Esquivel & Jiménez, 2012). Los diterpenos son derivados de isopreno, los cuales se encuentran en los seres vivos y son importantes, para la creación de diferentes sustancias tales como: esterolos, retinol y fitol (Dorsey & Jones, 2017).

Los diterpenos están contenidos en la porción insaponificable del aceite de los granos del café verde. Al igual que otros compuestos, su concentración va a depender de los procesos a los cuales sea sometido el grano. El café tiene dos diterpenos importantes que son el kahweol y cafestol Los cuales tienen una estructura similar (pentacíclica) (Figura 5) (Campos-Vega et al., 2015).

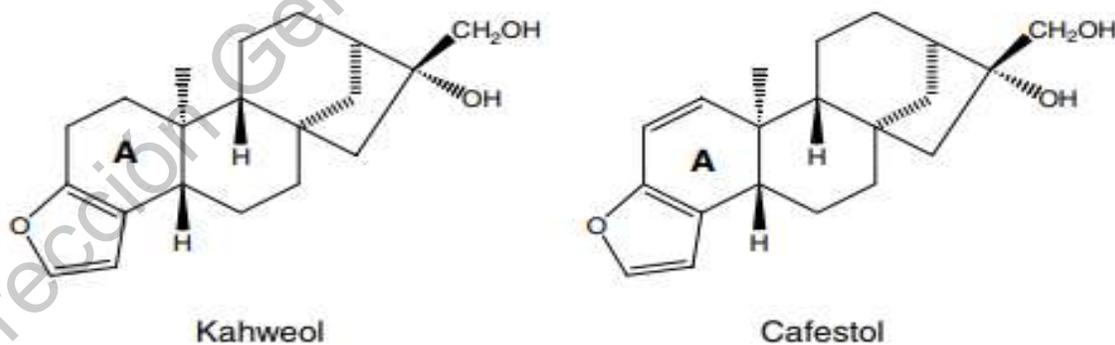


Figura 5.Estructuras de kahweol y Cafestol. Tomada de (Kim, Jung, & Jeong, 2004).

Estas dos diterpenos tienen diferentes efectos a la salud. Se ha reportado su poder antiinflamatorio mediante la expresión de iNO ciclooxigenasa-2 (COX-2). En cultivos celulares inhibe la respuesta inflamatoria de los macrófagos y disminuye la

degradación de la proteína inhibidor del factor nuclear kB (NFkB), lo que puede llegar a explicar esta capacidad antiinflamatoria. La propiedad anticancerígena se asocia a la supresión de la proteína específica 1, que tiene actividad en la diferenciación celular, el crecimiento celular, la apoptosis y en la respuesta inmunitaria. Se ha observado que el kahweol también puede presentar efectos neuroprotectorer en las neuronas dopaminérgicas, al hacer que se produzca oxigenasa-1 mediante las vías PI3K y P98. También tienen efectos sobre el metabolismo del colesterol, la presión arterial, y el síndrome metabólico. Sin embargo, se han observado efectos adversos a la salud, ante un consumo excesivo de estos; se ha reportado un aumento del colesterol sérico LDL, un aumento de los niveles de homocisteína, ambos asociados al incremento en el riesgo de enfermedad coronaria (Dorsey & Jones, 2017).

2.9 Fibra dietaria

La fibra dietaria es una mezcla heterogénea de polisacáridos como: celulosa, hemicelulosa, β – glucanos, pectinas, mucilagos y gomas entre otros. Gran parte de estos polisacáridos no son digeridos en el lumen del intestino delgado, ya que las enzimas del ser humano no son capaces de degradar todos los enlaces contenidos en esta fibra. La fibra es clasificada como fibra dietaria soluble e insoluble, porque contienen una porción soluble e insoluble en agua. La parte de la fibra insoluble se encuentra principalmente en la pared celular de los vegetales y esta contiene celulosa, lignina y hemicelulosa. Este tipo de fibra puede tener efectos benéficos para la salud, reduciendo el tránsito gastrointestinal. La porción soluble constituida por pectina, gomas y mucilagos, retrasa el vaciado gástrico, reduce la absorción de glucosa y disminuye los niveles de colesterol sérico (Dias, 2015).

Según la Organización mundial de la salud (OMS), la ingesta diaria recomendada de fibra dietética total para adultos es de 25 g/día o se recomienda consumir 400 gr de frutas y verduras al día, lo que sería un equivalente a los 25 gr de fibra. La recomendación de consumo de fibra en diferentes países alrededor del mundo va de 21-40 g/día. En México de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana: NOM-043-SSA2-2005. “En Servicios básicos de salud, promoción y educación para

la salud en materia alimentaria” se brindan criterios para la orientación alimentaria. En esta se consideran fuentes de fibra dietética a los cereales, verduras y frutas (de preferencia crudas y con cáscara), leguminosas y otros alimentos como frutos secos, almendras y nueces. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Nutrición y salud (ENSANUT), del año 2018, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población escolar fue de un 33.2 %, manteniéndose la prevalencia del 2012 ya que a pesar de que hubo una disminución del 1 %, esta no fue significativa. En adultos de 20 a más años de edad la prevalencia de sobrepeso y obesidad, fue de 72.5 % que con respecto al 2012 incrementó del 1.3 %. Al hablar de esta condición de sobrepeso y obesidad por género, encontramos que el sobrepeso tuvo un incremento del 1 % para mujeres y una reducción del 0.3 % en los hombres; Sin embargo, esta reducción no es significativa ya que la obesidad en hombres incremento un 3.7 %, lo que nos estaría indicando una migración de personas con sobrepeso a obesidad. Por otro lado, las mujeres tuvieron un incremento de 2.7 por ciento, mostrando un comportamiento similar. Todo esto nos habla de un patrón, previamente descrito en la población mexicana, caracterizado por baja actividad física, repetitivo en alimentos con bajo contenido de fibra dietaria, aunado a el consumo elevado de alimentos altos en grasa y altos de azúcares refinados (ENSANUT, 2018) (Tabla 3).

Tabla 3. Recomendación de consumo diario de fibra dietaria (g/día)

Grupos de edad	Hombres	Mujeres
Niños 2-4 años	14	14
Niños 5-8 años	18	18
Niños 9-13 años	22	22
Adolescentes 14 – 18 años	30	26
Adultos 19 – 50 años	35	30
Adultos mayores de 50 años.	30	26

Modificada de (Bourges, Casanueva & Rosado, 2008).

El CU es rico en fibra dietaria, reportándose hasta 57.6 % del total de los carbohidratos, por gramo de muestra (Vázquez-Sánchez et al., 2018). Inclusive, se ha reportado que la bebida del café pudiera ser también fuente de fibra dietaria con alrededor de 0.47– 0.75 g / 100 ml de bebida (Esquivel & Jiménez, 2012). La fibra dietaria del CU contiene un 84 % de fibra insoluble y 16 % de fibra soluble, en relación con la fibra dietética total. La fibra dietaria retiene compuestos antioxidantes, lo que puede ser benéfico para el tratamiento de diversas enfermedades como la diabetes tipo dos, o como anti-cancerígeno. A nivel del colon se produce la fermentación de la fibra por acción de la microbiota colónica humana, generándose AGCC, promoviendo actividad antioxidante y antiinflamatoria. Debido a esto entre otros beneficios, la fibra del CU se ha sugerido como un ingrediente en la industria alimentaria para incrementar el consumo de fibra en la población (López-Barrera et al., 2016).

La fibra dietaria del CU presenta en su composición almidón resistente, el cual se define como la suma del almidón y los productos de los diferentes almidones no absorbidos en el intestino delgado de un individuo sano. La resistencia a ser digerido se atribuye a la proporción de amilosa y amilopectina, los dos polisacáridos que conforman los gránulos de almidón. La concentración de estos polisacáridos varían de un alimento a otro y está relacionada con su estructura física; entre más compacta sea la molécula de almidón, más difícil será la hidrólisis enzimática (Fuentes-Barría, Muñoz, Aquilera, González, 2018). En el CU se han reportado cantidades de almidón resistente para el tostado medio y el tostado oscuro de 5.6 y 6.2 % por gramo de materia seca, respectivamente (López-Barrera et al., 2016). El almidón resistente se ha recomendado para utilizarlo en diferentes aplicaciones en la industria: especialmente para envolturas de alimentos, lo que contribuye a alargar la vida de anaquel de los productos. Se ha observado que una concentración de 8 % en recubrimientos ha tenido buenos resultados (Dalgleish et al., 2007).

Las melanoidinas consideradas fibra *de facto*, también contribuyen con la capacidad antioxidante en el CU (Vázquez-Sánchez et al., 2018). Hay autores que han reportado que normalmente las melanoidinas se crean durante el tostado

oscuro formados en las últimas etapas de la reacción de Maillard. Estas melanoidinas son de alto peso molecular y se creó que provienen de una parte de la fibra dietaria hidrolizable. Se estima que la cantidad de melanoidinas contenidas en el CU es de alrededor del 20 al 30 % del peso total (Jiménez-Zamora et al., 2015).

2.10 Metabolismo colónico del café usado

La fibra dietaria está fuertemente asociada a la actividad de la microbiota colónica humana, ya que esta se encarga de fermentar la fibra dietaria y producir AGCC. Es aquí donde los AGCC se absorben y se distribuyen, de los cuales se obtienen beneficios para la salud como por ejemplo efectos antiinflamatorio. A través de la simulación *in vitro* de la fermentación colónica humana del CU, se ha confirmado que su utilización genera AGCC: acético, propiónico y butírico. La producción obtenida, mediante un estudio *in vitro*, fue de 29.4 y 18.8 mmol/l de acético en el CU tostado medio y oscuro respectivamente, propiónico de 10.6 y 10.4mmol/l respectivamente y butírico de 7.9 y 7.8 mmol/l respectivamente (López-Barrera et al., 2016a).

La producción de estos diferentes AGCC durante la fermentación de la parte no digerible del CU, podría contribuir a promover un aumento en la población de las bacterias colónicas lo cual es positivo para la salud, ya que ayudan a la prevención de cáncer. Estos ácidos grasos inducen apoptosis y estrés oxidativo en células de cáncer de colon humano (Hernández-Arriaga et al., 2017b).

2.11 Metabolismo colónico de los compuestos antioxidantes

El café tiene diversos compuestos antioxidantes como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido ferúlico y la cafeína entre otros (Esquivel & Jiménez, 2012). Parte de estos compuestos permanece unida a la fibra del café que, al llegar al colon es fermentada, ocasionándose la liberación y metabolización de estos antioxidantes. En un ensayo *in vitro*, en dónde se tomaron muestras fecales de sujetos con normo

peso y sobre peso, se realizó una simulación de la fermentación colónica, observándose el comportamiento de los diferentes compuestos antioxidantes al cabo de 24 h. El 35 % del ácido gálico fue utilizado, el ácido clorogénico fue metabolizado rápidamente con una degradación a ácido caféico de hasta del 33 %, casi un tercio del contenido original; el ácido caféico se metabolizó completamente después de 12 horas de fermentación; la microbiota presente en la materia fecal del sujeto con normo peso, presentó una mejor utilización del sustrato, inclusive los productos de la fermentación de esta muestra indujeron de manera efectiva la apoptosis, al aumentar el estrés oxidativo en la células HT-29 (adenocarcinoma del colon humano) (Hernández-Arriaga et al., 2017a).

Los AGCC son producidos en el colon por la degradación de la fibra dietaria, por acción del microbiota. Estos pueden llegar a contener de 2 a 6 átomos de carbono, siendo tres los principales: el ácido acético, el propiónico y el butírico. A causa de varias situaciones clínicas se puede afectar la capacidad de generar o utilizar estos ácidos grasos en el epitelio intestinal, como fuente de energía, lo cual pudiera llegar a ocasionar patologías graves (Manrique Vergara & González Sánchez, 2017).

En otros estudios se ha informado que la fermentación colónica humana de granos usados de café produce AGCC, los cuales ejercen actividad antiinflamatoria al suprimir la producción de óxido nítrico y la modulación de citoquinas en macrófagos murinos (López-Barrera et al., 2016). La producción de estos AGCC también se asocia al contenido de mananos, galactomananos y arabinogalactomananos en el café (Nguyen, Cho, Lee, & Bae, 2019).

En estudios similares del metabolismo colónico de los compuestos antioxidantes, se ha observado su participación en actividad antiinflamatoria (Dorsey & Jones, 2017). Inclusive, se ha reportado que pudiera haber diferentes mecanismos por los cuales los polifenoles de la dieta pudieran llegar a regular la disminución de carcinogénesis en colon (**Figura 6**) Cardona et al., (2013).

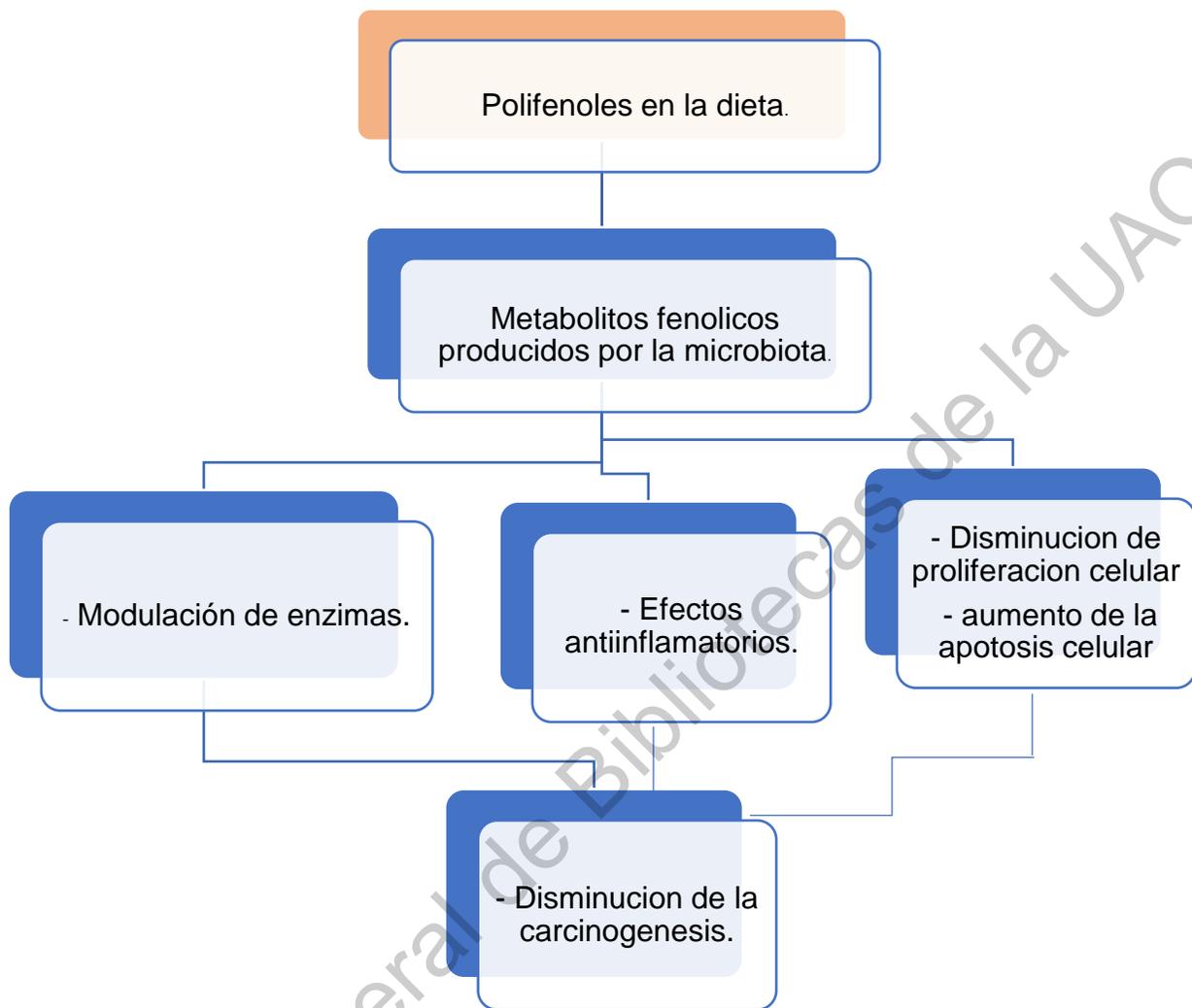


Figura 6. Posibles mecanismos propuestos para la prevención de cáncer por polifenoles. Modificado de (Cardona et al., 2013)

2.12 Microbiota colónica

La microbiota es el conjunto de microorganismos vivos que conviven en una simbiosis con el ser humano; se estima que la microbiota del tracto gastrointestinal puede llegar a tener un promedio de 10^{12} a 10^{14} células; este número sería incluso mayor que las células humanas. La microbiota colónica contiene alrededor de 800 a 1000 especies en un individuo, y se estima que el 50 % de la materia fecal está constituida por bacterias, principalmente de 4 filum: Firmicutes, Bacteroidetes,

Actinobacteria y Proteobacteria, con un predominio de las dos primeras con casi un 90 % (Icaza-Chávez, 2013).

La microbiota ha tomado un papel importante en los últimos, ya que una de sus principales funciones es proteger al organismo contra patógenos que pudieran llegar a ingresar al tracto gastrointestinal. Uno de los más grandes avances que se han hecho en el conocimiento del microbiota intestinal se dio en el año 2011, al definirse los enterotipos en los adultos, entendiéndose como las diferentes agrupaciones de la microbiota intestinal de acuerdo con diferentes estados de equilibrio. Cada enterotipo se diferencia por la variación en los tres tipos bacterianos predominantes: *Bacteroides* (enterotipo tipo 1), *Prevotella* (enterotipo tipo 2) y *Ruminococcus* (enterotipo tipo 3). El enterotipo 1 se asocia con una dieta rica en proteína y grasa, mientras que el enterotipo 2 está más asociado con el consumo de carbohidratos. En personas europeas el tipo 1 fue más prevalente hasta en un 53 %, seguido del tipo dos con un 31 % (Sebastián & Sánchez, 2017).

La microbiota colónica tiene diferentes funciones, una de ellas es la fermentación anaeróbica de los carbohidratos en su porción no digerible, transformándolos en AGCC, como se mencionó previamente. Los AGCC son efectivamente absorbidos por la mucosa del huésped, como promoviendo el estado fisiológico como fuentes de energía para los colonocitos, reguladores de la expresión génica y como moléculas de señalización reconocidas por receptores específicos. Recientemente se ha visto la actividad de estos ácidos grasos en la promoción del efecto antiinflamatorio, además de proveer un efecto anticancerígeno (Louis & Flint, 2017).

Una importante herramienta para el estudio de las bacterias es el ARN ribosomal (ARNr), la macromolécula más ampliamente usada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. La secuenciación de las regiones variables del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr, identifica el parecido filogenético de las bacterias y las arqueas, y permite clasificarlas sin el uso de cultivos. La información genética obtenida del microbioma por medio del ARNr 16S se agrupa en las llamadas unidades taxonómicas operacionales, de acuerdo con el porcentaje

de semejanza de sus ARNr 16S. Cuando hay una semejanza en el ARNr 16S del 95% se habla de género, y cuando la semejanza es del 97 %, se habla de especie (Icaza-Chávez, 2013).

2.13 Modelos *in vitro* de fermentación colónica

Las principales fuentes de carbono y energía para las bacterias intestinales son los almidones resistentes, los polisacáridos de la pared celular de las plantas y los mucopolisacáridos del huésped, junto con varios oligosacáridos, proteínas y péptidos. Las bacterias intestinales son capaces de fermentar estas sustancias a AGCC, ácidos orgánicos hidroxilo y dicarboxílicos, H₂, CO₂ y otros productos finales neutros, ácidos y básicos. El metabolismo de los hidratos de carbono es cuantitativamente más importante que la fermentación de aminoácidos en el colon, particularmente en el intestino proximal, donde la disponibilidad de sustratos es mayor (Macfarlane & Macfarlane, 2004).

El método de fermentación *in vitro* ha mostrado grandes ventajas respecto al modelo *in vivo*, por el tiempo en el cual puede ser producido, además de su alto nivel de reproducibilidad y su bajo costo en comparación a otros (Alam et al., 2013). Uno de los estudios más utilizados para estimar la actividad de la microbiota colónica es el modelo *in vitro* de fermentación colónica. La disponibilidad cada vez mayor de secuencias genómicas y metagenómicas es un recurso muy útil para incrementar la comprensión del metabolismo microbiano en el intestino, cómo interactúan entre sí y cómo podemos modular el sistema por medios dietéticos para optimizar la producción de AGCC (Louis & Flint, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

México ocupa el segundo lugar de obesidad en adultos a nivel mundial y el primer mundial de obesidad en niños. Esto se atribuye a diferentes factores entre los más importantes a destacar se encuentran: el cambio de hábitos de alimentación, al adoptar tendencias de países industrializados en donde se opta más por el consumo de la comida rápida, que de la comida preparada en casa. El sedentarismo cotidiano, donde cada vez más gana terreno las horas pantalla que la actividad física; el bajo consumo de alimentos ricos en fibra como frutas, verduras, tubérculos y leguminosas. Diversos problemas de salud que se pueden desencadenar a partir de hábitos nocivos, como enfermedades crónicas degenerativas: diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia y diferentes tipos de cáncer entre los que destaca el de colon.

Las enfermedades acarrear grandes problemas tanto para los pacientes, como para el sistema de salud, ya que esto representa un gran gasto a nivel nacional. Según el instituto nacional de salud, el cáncer de colon, es el 4to tipo con mayor frecuencia y se estima que, 700 mil personas mueren al año a causa de esta enfermedad. Es de vital importancia mantener la salud colónica ya que aquí se absorben algunos nutrimentos y agua de los alimentos. De igual manera la fibra dietaria es fermentada en esta parte del organismo, donde con ayuda de la microbiota colónica se pueden llegar a producir y aprovechar metabolitos secundarios, como los ácidos grasos de cadena corta y sus derivados que puede servir en un sistema simbiótico a la salud colónica y de la microbiota.

Se ha visto que los alimentos con alto contenido de fibra dietaria pueden ayudar a prevenir el cáncer de colon. Uno de los subproductos del café como lo es el CU ha mostrado ser rico en este tipo de fibra; que, al ser incorporado a una matriz alimentaria, puede llegar a colon y producir los efectos benéficos antes mencionados.

4. HIPÓTESIS

La fibra dietaria antioxidante de café usado (CU) baja en diterpenos, será fermentada por la microbiota colónica humana *in vitro* y este efecto estará asociado a la generación de AGCC y metabolitos asociados.

5. OBJETIVOS

5.1 objetivo general:

Evaluar el efecto *in vitro* de la fibra antioxidante de café usado (*Coffea arábica* L.) sobre el metabolismo colónico.

5. 2 objetivos específicos:

1. Obtener y determinar la composición química y nutracéutica de la fibra antioxidante de café usado.

2. Someter a digestión gastrointestinal *in vitro* la fibra y el café usado

3. Determinar la producción de AGCC durante la fermentación colónica *in vitro* del café usado y la fibra de café.

4. Identificar compuestos volátiles derivados del metabolismo colónico de la fibra antioxidante de café usado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 Material biológico

Se utilizó CU el cual se obtuvo a partir de granos de café de la variedad arábica con tostado medio (americano), recuperado de capsulas de cafetera después de su percolación para la preparación de la bebida.; El CU se protegió de la luz y se almacenó hasta su uso ([Vázquez-Sánchez et al., 2018](#)).

6.1.2 Reactivos

Los reactivos y solventes que se emplearon en los diferentes ensayos fueron de grado analítico y estos fueron adquiridos de las marcas Sigma-Aldrich, Roche, Merck y J. T. Baker.

6.1.3 Proceso experimental

Con la final de que se lleven a cabo los objetivos propuestos, se realizó el proceso experimental descrito en la **Figura 7**.

Estrategia General

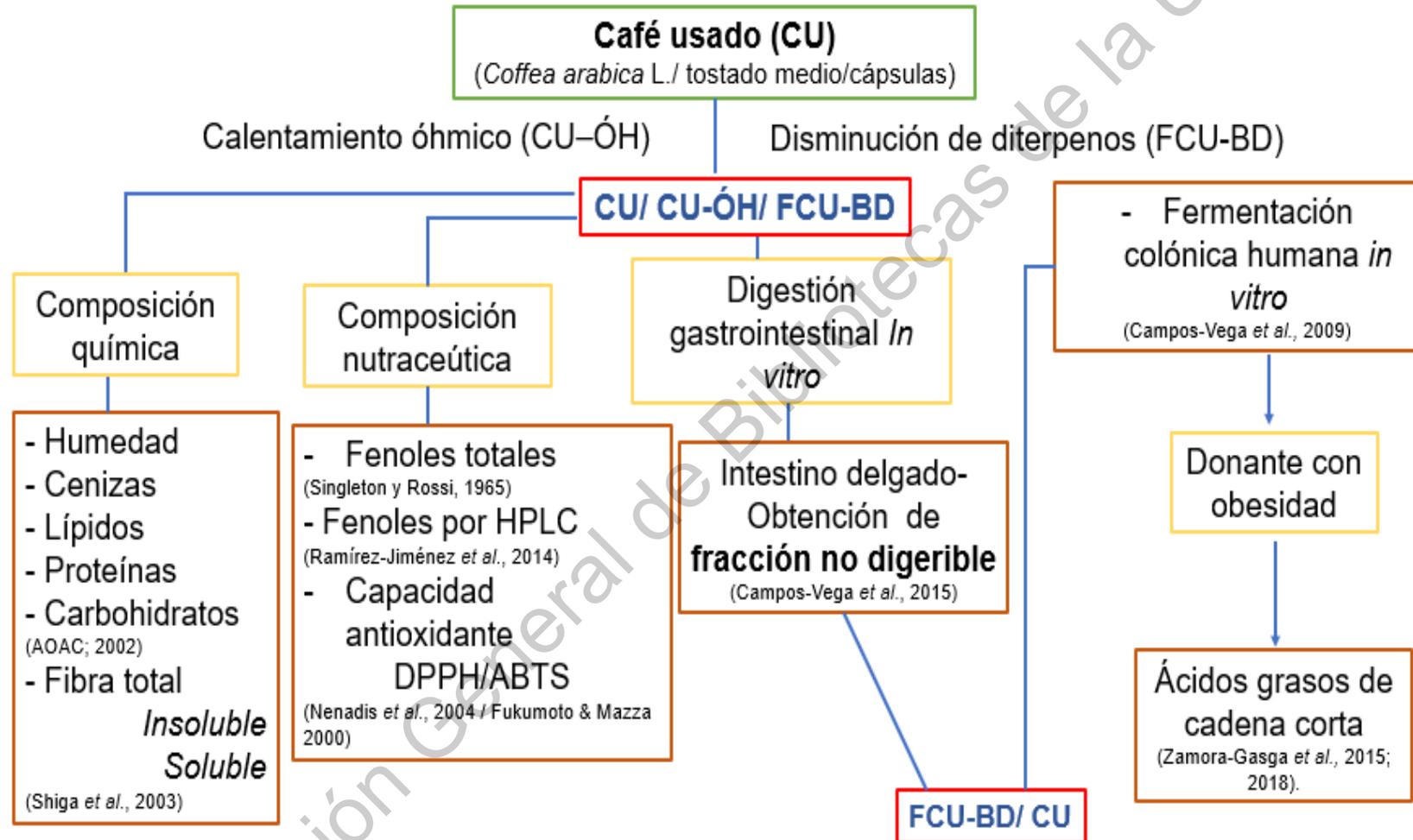


FIGURA 7 PROCESO EXPERIMENTAL

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de fibra

6.2.1.1 Pre tratamiento de café usado

Para extraer la fibra del CU se llevó a cabo un tratamiento previo por calentamiento óhmico por lote. Brevemente, el CU se secó y se tamizó en una malla número 40. Se pesaron 140g de CU seco y se sometieron a calentamiento con 4 L de agua (80 °C, 1 h), con agitación continua; se utilizó la mezcla para ser llevada al calentamiento óhmico (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

6.2.1.2 Extracción de fibra por calentamiento óhmico en lote

El CU previamente pre-tratado se colocó en una celda de acrílico y se sometió a calentamiento óhmico por medio de dos electrodos de acero inoxidable conectados a una fuente de voltaje (VARIAC). Se usó un valor de 200 V hasta llegar a 90 °C y se dejó enfriar. El voltaje y corriente fueron monitoreados con un multímetro. Se filtró y se secó a 43 °C en un horno de flujo de aire, durante 24h. La fibra fue almacenada en refrigeración a 7 °C y fue protegida de la luz hasta su análisis (Vázquez-Sánchez et al., 2018).

6.2.1.3 Extracción de fibra de café usado baja en diterpenos.

La fibra de CU, obtenida por calentamiento óhmico molido por lote (OHML), fue procesada para disminuir el contenido de diterpenos (cafestol y kahweol) hasta niveles seguros para el consumo humano (1-1.5mg/g) (Urgert et al., 1997). Se utilizaron dos solventes aprobados para su uso en alimentos (FDA, 2018). La fibra de CU baja en diterpenos (FCU-BD) fue almacenada en refrigeración a 7 °C y protegida de la luz hasta su análisis.

6.3.1 Análisis proximal

Los análisis proximales se realizaron al CU y a la fibra obtenida después del tratamiento con calentamiento óhmico (CU-OH) y la fibra de CU baja en diterpenos (FCU-BD).

6.3.1.1 Determinación de humedad (925.23)

Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula (a peso constante). Las cápsulas se colocaron en una estufa a 130 °C por 2 horas, posteriormente se colocaron en un desecador para permitir que las muestras se enfriaran durante 40 min. Finalmente, las muestras se pesaron y se realizó el cálculo correspondiente empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = (\text{peso inicial muestra} - \text{peso final muestra}) * 100$$

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca / g de muestra (923.25. AOAC; 2002).

6.3.1.2 Determinación de lípidos (920.39)

Los lípidos totales se determinaron por el método 920.39 (extracto etéreo) descrito por la AOAC (2002). En un cartucho de celulosa se colocaron 3 g de muestra, se cubrieron con algodón y se colocaron en el compartimento de extracción de Soxhlet, donde el matraz (a peso constante), contenía 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo. Se mantuvo la extracción a 10 reflujos / hora durante 5 horas. Posteriormente, se dejó evaporar el solvente, el matraz se secó en estufa con la finalidad de retirar la humedad y residuos de solvente. El matraz se pesó y se calcularon los resultados con la siguiente formula:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{\text{peso final del matraz} - \text{peso inicial del matraz}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra (920.39. AOAC; 2002).

6.3.1.3 Determinación de proteína (920.105)

La proteína total se determinó empleando el método 920.105 (Kjeldhal) descrito por la AOAC (2002). En un tubo de digestión tipo Kjeldhal se colocó 1 g de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio, 0.4 g de sulfato de cobre y se adiciono 15 ml de ácido sulfúrico. El tubo en el digestor se colocó durante cuatro horas hasta el cambio de color de la muestra a verde claro, se dejó enfriar la muestra y se agregaron 100 ml de agua en cada tubo.

Los tubos se colocaron en el destilador donde se adiciono hidróxido de sodio al 40 %. El destilador se colocó un matraz EM de 250 ml que contenía 25 ml de ácido bórico (4 %) y se emplearon como indicadores rojos de metilo y verde de bromocresol. Se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta que se presentó un vire de color de verde a rosa. Finalmente, se determinó el nitrógeno (N) total multiplicado por un factor de conversión equivalente al % de proteína presente en el alimento. Los cálculos que se realizaron son los siguientes:

$$\% N = \frac{A * B * C}{D} * 100$$

Dónde: **A** = ml HCl que se usó en la titulación de la muestra; **B** = concentración del ácido clorhídrico a emplear; **C** = meq N₂ 0.014; **D** = peso de la muestra.

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra. (920.105. AOAC; 2002).

6.3.1.4 Determinación de cenizas (945.46)

La determinación de cenizas se realizó de acuerdo a la metodología (945.46) descrita por la AOAC (2002). Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana, previamente fue lavado y llevado a peso constante. La muestra fue calcinada en una mufla a 550 – 560 °C durante 5 horas hasta conseguir cenizas completamente blancas. Los crisoles se colocaron en un desecador hasta que se llegó a

temperatura ambiente para poder pesarlos. Los cálculos correspondientes se obtuvieron empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{peso del residuo de cenizas}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra. (945.46. AOAC; 2002).

6.3.1.5 Determinación de carbohidratos

El cálculo del contenido de carbohidratos de la muestra, fue realizado por diferencia de peso, con respecto al porcentaje de las determinaciones anteriores (proteína, lípidos, cenizas y humedad).

La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

6.3.1.6 Determinación de fibra total

La fibra total se determinó como la suma de las fracciones obtenidas de fibra insoluble y fibra soluble, a continuación, se detallan los procedimientos que se siguieron para cada una.

6.3.1.7 Determinación de fibra insoluble

Se siguió la metodología establecida por (Shiga et al., 2003). Se pulverizó y desgraso la muestra, se adicionaron 50 ml de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100 µL de una solución de α-amilasa. El matraz con el que se trabajó fue cubierto con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, se incubó en baño a 95 °C por 30 min, con agitación continua. Cuando llegue a temperatura ambiente, la muestra se ajustó el pH a un valor de 7.5. Se adicionaron 100 µL de proteasa (5 mg/ml) y se incubó en baño a 60 °C por 30 min con agitación continua.

Al finalizar la incubación, se permitió que la muestra se enfriara a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.0. Posteriormente se adiciono 300 μ L de amiloglucosidasa y se incubo durante 30 min a 60 °C con agitación continua.

Después de incubar se filtró con papel Whatman No. 4 a peso constante, y se realizaron 2 lavados con 15 ml de agua destilada a 60 °C, el filtrado obtenido después de los lavados se recuperó y almacenó para la determinación de fibra soluble, como se describe más adelante. Por otro lado, el papel filtro junto con la muestra se secó en estufa a 60 °C por 24 h, hasta peso constante y finalmente se pesó la muestra. La fibra insoluble es lo que se obtuvo en el filtro. La determinación fue realizada por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de base seca/g de muestra.

6.3.1.8 Determinación de fibra soluble

De la prueba anterior, se conservó el residuo del filtrado, al cual se adiciono un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó precipitar por 24 h. El precipitado fue filtrado en papel Whatman No. 42 (peso constante). Se realizaron 2 lavados con 15 ml de etanol al 80 % y 2 con 15 ml de acetona. Se dejó secar el papel filtro por 24 h a 60 °C, hasta peso constante. Finalmente se pesó el papel filtro, obteniendo así el contenido la fibra soluble. La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresarán en porcentaje de base seca / g de muestra.

6.4.1 Análisis nutracéutico

6.4.1.1 Extracto etanólico

La obtención del extracto etanólico se llevó acabo de acuerdo a la metodología descrita por [\(Campos-Vega et al., 2015\)](#), se empleó un horno de microondas convencional. Un gramo de muestra fue suspendido en 9 ml de etanol (20 %), posteriormente se sometió a un calentamiento en el horno de microondas, en dos ocasiones, durante 20 s con un poder del 80 % (1200 W). Se centrifugo a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue usado para las siguientes pruebas.

6.4.1.2 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó basándose en la metodología de (Singleton & Rossi 1965). Se mezcló 40 µL del extracto etanólico con 460 µL de agua. Se les añadió el reactivo Folin-Ciocalteu (1:10; 125 µL), y la reacción de oxidación se neutralizó con carbonato de sodio (7 %); se mantuvo en reposo durante 2 h en un frasco protegido de la luz. Se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (UV-visible).

Mediante los resultados obtenidos y una curva de calibración de ácido clorogénico se calcularon los fenoles totales en las muestras expresados como mg equivalentes de ácido clorogénico/g de muestra.

6.4.1.3 Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD

Esta determinación se realizó a partir del extracto etanólico descrito anteriormente. Los extractos se filtraron a través de un acrodisco de 0.45 µm para jeringa y se inyectaron en el HPLC bajo las siguientes condiciones. Se empleó cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD); el análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5.0 micras). La temperatura de la columna se controló con ayuda de un termostato a 35 ± 0.6 °C y la velocidad de flujo se ajustó a 1 ml/min. La fase móvil constó de dos disolventes. El disolvente A fue agua grado HPLC y se ajustó con ácido acético al 0.1 %; el disolvente B fue acetonitrilo 100 %. Se empleó un gradiente lineal como se describe a continuación: una concentración del disolvente A del 80 – 83 % durante 7 min, de 83 – 60 % durante 5 min, de 60 – 50 % durante 1 min y finalmente 50 – 85 % durante 2 min. La detección se realizó a 280 nm con una velocidad de adquisición de 1 s. Se inyectó un volumen de 20 µL y las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con los estándares comerciales de: (+)-

catequina, rutina, quercetina y ácido clorogénico, caféico, p-cumárico, ferúlico, gálico y ascórbico (Ramírez-Jiménez et al., 2014).

6.5.1 Capacidad antioxidante

6.5.1.1 ABTS

Se utilizó la técnica de (Nenadis et al., 2004), para la aplicación del método de ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), y de esa manera se determinó la capacidad antioxidante. Primeramente, se mezclaron 5 ml de una solución acuosa de ABTS 7mM y 88 µL de una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 140 mM, conservándose en un lugar oscuro durante 12 hrs, para la generación del radical. Terminado el tiempo, a 500 µL de la solución se le agregó de 20-25 ml de etanol. La absorbancia deberá de estar entre 0.7 y 1 y será medida a 734 nm.

El extracto etanólico de la muestra (20 µL) se adicionó a una microplaca de 96 pozos, así como etanol como (Blanco). Se le agregó 0.23 ml de solución ABTS, y se leyó al tiempo 0 y 6min a 734 nm en un lector ELISA. Las placas se mantuvieron cubiertas (evitando contacto con la luz) a una temperatura de 27 °C.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{(100|1 - A_{muestra})}{A_{control}}$$

Donde,

% inhibición es la actividad antioxidante de la muestra

$A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra a 734 nm

$A_{control}$ es la absorbancia del control a 734 nm

Se realizó una curva de calibración de trolox y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como µmol equivalentes de trolox/g de muestra.

6.5.1.2 Método DPPH

Se siguió el método descrito por [Fukumoto & Mazza \(2000\)](#). Este método se basa en el decremento de la absorbancia del radical DPPH• cuando es reducido por compuestos antioxidantes ([Carvalho et al., 2016](#)). Brevemente, el extracto etanólico (20 µL) se adiciona a una microplaca de 96 pozos, así como etanol (blanco). Se les agrego 200 µl de solución DPPH (150 µM), y se leyó en un espectrofotómetro MultiSkan Go a una longitud de onda de 520 nm. Se realizó una curva de calibración de 50-800 µM de Trolox y se calculó el % de inhibición con la formula previamente descrita.

6.6.1 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Las muestras de CU se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*, la cual consta de las siguientes fases: boca, estómago, intestino y colón. A continuación, se describe brevemente la metodología, la cual involucra la participación de individuos humanos sanos y el uso de una membrana de diálisis de celulosa. El ensayo se realizó con previa aprobación por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, tomando en cuenta las disposiciones para el manejo correcto de animales de laboratorio establecidas en la NOM-062-ZOO-1999 **Anexo I** y acorde a la declaración de Helsinki de 1964.

6.6.1.1 Simulación de las condiciones de la boca

Se realizó la metodología adaptada y descrita por [Campos-Vega \(2015\)](#). Se invitaron a 4 individuos sanos al estudio, proporcionándoles previamente un consentimiento informado por escrito **Anexo 1**; los cuales después de cepillarse los dientes sin pasta dental, masticaron 1 g de la muestra de CU durante 15 veces por 15 segundos vaciando el contenido en un vaso con 5 ml de agua destilada. Inmediatamente los voluntarios se enjuagaron la boca con 5 ml de agua destilada 15 veces por 15 segundos para después depositarla en el mismo vaso. Al finalizar se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un vaso, es importante tomar en cuenta que se incluyó un blanco (mezcla sin muestra de CU y/o fibra) el cual contenía agua destilada en lugar de la muestra de café.

6.6.1.2 Simulación de las condiciones en el estómago

Para la digestión gástrica se tomó una alícuota de 10 ml de la fase anterior, la cual fue ajustada a pH 2 usando solución de HCl (150 mM, 2-81 ml). Se añadió una solución de pepsina (0.055 g en 0.94 ml de HCl 20 mM) a cada muestra y se incubó durante 2 h a 37 °C.

6.6.1.3 Simulación de las condiciones en el intestino delgado

Se preparó un extracto intestinal, 30 minutos antes de su uso, disolviendo 3 mg de hiel de buey y 2.6 mg de pancreatina de páncreas porcino en 5 ml de una solución amortiguadora Krebs-Ringer (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 11 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM con pH 6.8). Esta solución (5 ml) fue añadida a cada muestra y al blanco procedente de la digestión gástrica; la suspensión (15ml), fue transferida a un recipiente que contenía una diálisis de filtración de 7 cm de largo que fue anudada por los dos lados, la cual fue incubada por 30 minutos a 37°C.

6.7.1 Simulación de la fermentación colónica *in vitro* de la FND

La fermentación colónica *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por (Campos-Vega et al., 2009). Se empleó inulina (100 mg) como control positivo de carbohidrato fermentable; mientras que, como control negativo se consideró el blanco del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mencionado anteriormente, sin carbohidrato disponible para ser fermentado. Se utilizó inóculo fecal humano como fuente del microbiota representativo del colon, el cual fue obtenido de la primera evacuación de al menos 2 individuos voluntarios sanos, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra (**Anexo II**).

Se prepararon tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal que tenían (g/L): Agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato difásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, carbonato de sodio 2.0,

cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 ml y hematina 0.2 (previamente diluida en 5 ml de NaOH). Los tubos se sellaron y mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H_2 - CO_2 - N_2 10:10:80 volumen) durante 24 horas. El inóculo fecal (3 g) se homogenizó con 27 ml de solución de fosfato de sodio 1 M a pH 7. Los tubos con el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 ml de homogenizado fecal, además se adicionó fracción no digerible proveniente de la digestión intestinal (0.5 g del precipitado sólido y 0.5 ml del sobrenadante líquido), del blanco 1 ml, e inulina 100 mg. Los tubos se agitaron con vortex durante 30 s y se incubaron en un baño de agua a 37 °C. El flujo de la mezcla de gases se mantuvo continuo hasta el término de la fermentación. Durante la fermentación se determinó el pH a las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas. Los productos de la fermentación colónica se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

6.9.1 Identificación de los compuestos derivados del metabolismo colónico gases-MS/MS

Los AGCC y los metabolitos relacionados se determinaron mediante microextracción en espacio de cabeza-cabeza (HS-SPME) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), según el método descrito por [\(Zamora-Gasga et al. 2015\)](#). Brevemente, cada muestra de la fermentación colónica se centrifugó a 3500 G / 15 min / 4 °C (Hermle Z 323 K; Wehinger, Alemania), luego se transfirieron 20 µL de los sobrenadantes a viales de vidrio ámbar y se colocaron en un inyector automático Gerstel MPS [\(Zamora-Gasga et al., 2018\)](#).

Las extracciones (por triplicado) se llevaron a cabo utilizando 2 cm de 50/30 µm de divinilbenceno / carboxeno / polidimetilsiloxano (DVD / CAR / PDMS; Supelco Co., Bellefonte, PA) en un baño de agua con agitación constante (250 rpm) durante 120 min a 45 °C. Las muestras se resorbieron térmicamente de DVD / CAR / PDMS en el puerto de inyección GC a 240 ° C durante 10 min. El análisis de metabolitos se realizó en un Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) acoplado a un Agilent 597C VL MS y una muestra automática MPS2XL (Gerstel). La separación de la muestra se realizó en una columna capilar DB-5MS (60 m x 250 µm x 0.25 µm; Agilent). La temperatura del horno se ajustó a 40 °C durante 5 min, aumentando 5 °C / min, hasta alcanzar 200 °C, se mantuvo constante durante 2 min

y se elevó nuevamente a una velocidad de 2 °C / min hasta 230 °C durante 15 min. Se utilizó helio como gas acarreador a 1 ml / min; la temperatura del inyector y de la fuente de iones será de 250 °C y 150 °C, respectivamente. El modo splitless se usó para inyección. Se construyeron curvas de calibración estándar para AGCC principales (acético, propiónico y butírico) ($R^2 \geq 98$) y se usaron para cuantificar sus niveles de todas las muestras durante la fermentación. La identificación provisional de otros metabolitos relacionados menores se realizó con el software MSD ChemStation (Agilent G1701EA, versión E.02.00.493) y se registró el área bajo la curva para cada metabolito.

6.10 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm el error estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias se analizaron por la prueba de Tukey; se empleó el programa estadístico JMP 8.0.

Se realizó un perfil de análisis metabolómico global no dirigido para las muestras de la fermentación colonica *in vitro* de todos los tiempos utilizando el software Metaboanalyst.ca. 4.0. los mapas de calor se generaron utilizando componentes normalizados por suma de cuadrados y se utilizó el algoritmo de agrupamiento de Ward. Los datos normalizados por suma de cuadrados se analizaron mediante un análisis, de enriquecimiento para evaluar el conjunto de metabolitos y su asociación con diferentes vías metabólicas

7. Resultados y discusión

7.1 Composición química del café usado, fibra de CU obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos.

En la **Tabla 4** se presenta la composición química del CU, el café usado con calentamiento óhmico (CU-ÓH) y la fibra de CU baja en diterpenos (FCU-BD). Los carbohidratos fueron mayoritarios en las muestras, con un 60.5 % para el CU, 67.4 % para el CU-ÓH y 78.95 % para la FCU-BD. Estos datos son similares a lo previamente reportado por nuestro grupo de trabajo (Campos-Vega., 2015; Vásquez-Sánchez et al., 2018; López-Rodríguez et al., 2018).

Tabla 4. Composición química del café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).

Determinación	CU	CU-ÓH	FCU- BD
Carbohidratos	60.15 ± 0.60 ^c	67.4 ± 0.49 ^b	78.95 ± 0.22 ^a
Lípidos	11.9 ± 0.07 ^b	12.9 ± 0.44 ^c	0.25 ± 0.13 ^a
Proteínas	16.3 ± 0.30 ^a	14.8 ± 0.24 ^b	16.1 ± 0.30 ^a
Geniza	4.61 ± 0.28 ^a	1.74 ± 0.02 ^b	1.54 ± 0.05 ^b
Humedad	6.93 ± 0.01 ^a	5.26 ± 0.09 ^b	5.69 ± 0.09 ^c
Fibra total	25.6 ± 0.55 ^c	38.8 ± 0.44 ^b	53.1 ± 1.63 ^a
Fibra insoluble	24.4 ± 0.53 ^b	38.4 ± 0.43 ^a	51.9 ± 1.07 ^a
Fibra soluble	1.19 ± 0.29 ^a	0.42 ± 0.02 ^b	0.85 ± 0.16 ^b

Cada valor representa la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje (%) por gramo de muestra en base seca. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa (Tukey, α 0.05)

De los carbohidratos, en estudios previos se han reportado que el componente principal dentro de ellos son los galactomananos los cuales se ha reportado tener efectos benéficos la microbiota colónica, ya que tiene un efecto probiótico, en los cuales se sugiere un tratamiento por hidrólisis al CU para favorecer la utilización del polisacárido por las bacterias (Pérez - Burillo et al 2019).

La fibra dietaria total representa el 25.6, 38.8 y 53.1 % CU, CU-ÓH y FCU-BD, respectivamente. La fibra dietaria total se compone principalmente de la porción insoluble, llegando a ser de hasta un 95 % para la FCU-BD. Considerando que la fibra insoluble en el CU es de 24.4 % y posteriormente a los tratamientos el valor que se logró alcanzar de 51.9 % para la FCU-BD, representa un incremento en la concentración de un 214 % (2.2 veces más que el contenido en el CU). Sin embargo, este contenido de fibra insoluble es inferior a lo reportado por (López-Rodríguez et al 2018); las diferencias pueden ser atribuidas a la muestra utilizada.

La fracción lipídica representa el 11.9 % en el CU, mientras que en la FCU-BD es de solo 0.25 %. Esto es debido a que, como parte del tratamiento para la disminución del contenido de diterpenos en la fibra, se realiza un proceso de desgrasado. Los diterpenos han sido relacionados con el incremento de colesterol sérico, por lo que su disminución a niveles seguros es de suma importancia, especialmente para poder utilizar este ingrediente para consumo humano (Vásquez-Sánchez et al., 2018; López-Rodríguez et al 2018).

La cantidad de proteína que se reporta en las tres muestras es de 16.3 % para el CU, 14.8 para el CU-ÓH y de 16.1 % para la FCU-BD, en estos datos podemos observar que en el primer proceso, al que se somete hay una disminución, esto podría deberse a la afinidad que tienen ciertas proteínas con el agua, pero que posteriormente a el tratamiento óhmico al que es sometida la FCU-BD, incrementa la concentración esto pudiera deberse a la liberación de algunas melanoidinas por el efecto de la electroporación y la eliminación en el lavado para la eliminación de la parte lipídica, como se sugiere por (López-Rodríguez et al.,2018).

7.2 Contenido de fenoles totales del café usado (CU), fibra de CU obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos (FCU-BD).

En la (Tabla 5) se muestra el contenido de fenoles totales en las diferentes muestras. La muestra con el mayor contenido de compuestos fenólicos (mg eg ac. gálico/g muestra) es el CU (162 mg), seguido del CU-ÓH (43.9 mg), y la FCU-BD

(34.1 mg). Con estos resultados sugerimos que el tratamiento de las muestras, tanto en medio acuoso (CU-ÓH) como en medio oleoso (FCU-BD), tienen efecto el contenido total de fenoles. En trabajos previos confirmamos que los compuestos fenólicos migran hacia la fase acuosa durante el calentamiento óhmico, explicando en parte la disminución encontrada en este trabajo (Hurtado-Hernández *et al.*, 2018). Además, tanto el pretratamiento como el calentamiento óhmico se llevan a cabo a temperatura elevada, cercana a los 100 °C, la cual pudiera también estar afectando en el contenido de fenoles ya que algunos de ellos son termo-sensibles (Mayanga-Torres *et al.*, 2017).

Tabla 5. Determinación de fenoles totales en el café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).

Determinación	CU	CU-OH	FCU-BD
Fenoles totales	162.0 ± 10.7 ^a	43.9 ± 1.84 ^b	34.1 ± 2.89 ^b

Cada valor representa la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados se expresan en mg eq. Ácido gálico por gramo de muestra. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa (Tukey, α 0.05).

Cabe mencionar que el contenido de fenoles reportados en este trabajo para la FCU-BD, es menor a lo previamente reportado por (López-Rodríguez *et al.*, 2018). Sin embargo, estas diferencias podrían ser atribuidas al origen de la muestra, ya que en el trabajo realizado por López-Rodríguez se utilizó CU procedente de una percolación y en el presente trabajo se recuperó de cápsulas comerciales para preparación instantánea. Al comparar el contenido de fenoles totales de la FCU-BD con otras fibras antioxidantes podemos decir que la fibra que obtuvimos se localiza con un contenido medio de fenoles totales ya que mostro un contenido mayor que fibra de polvo de cocoa, la pulpa de guayaba o la hoja de col por hasta 20 mg eq de ácido gálico, sin embargo también mostro valores menores a la piel de mango, piel de guayaba o Jamaica los cuales mostraron valores del doble o triple del contenido de la FCU-BD (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

7.3 Determinación de capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS en el café usado, fibra de CU obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos.

La capacidad antioxidante, que se presenta en la **Tabla 6**, fue determinada por los métodos DPPH y ABTS. Los mayores valores en las diferentes muestras, se presentaron en el CU de 3 a 7.3 veces más capacidad antioxidante para el método de ABTS y DPPH respectivamente, esto es mayor por lo previamente reportado por (Campos-Vega et al., 2015).

Tabla 6. Determinación de capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en el café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).

Determinación	CU	CU-ÓH	FCU-BD
ABTS	1274.4 ± 32.0 ^a	333.4 ± 33.2 ^b	277.8 ± 15.3 ^b
DPPH	3151.7 ± 80.3 ^a	400.4 ± 11.5 ^b	381.5 ± 9.63 ^b

Cada valor representa la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados se expresan en: $\mu\text{mol eq. trolox}$ por gramo muestra. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa (Tukey, α 0.05).

Posteriormente al ser sometido al tratamiento de calentamiento óhmico y a la disminución de la parte lipídica, la capacidad antioxidante disminuyó respecto a la muestra inicial de CU, para las dos pruebas de hasta 4.5 veces para el ABTS y hasta 8.2 veces para el método DPPH. Esta reducción podría estar relacionada con la disminución de los fenoles totales en la muestra (Tabla 5) ya que los fenoles totales reducen hasta un 55% del CU hasta el ingrediente FCU-BD, como resultado del procesamiento. Sin embargo, a pesar de la disminución de la capacidad antioxidante, esta sigue siendo superior que lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo, para tratamientos similares en el CU y la fibra del CU (López-Rodríguez et al., 2018). Cabe destacar que el ingrediente obtenido como la FCU-BD sigue correspondiendo con la definición de fibra dietaria antioxidante establecida por (Saura-Calixto et al., 1998) la cual menciona que la capacidad antioxidante debe provenir de la matriz de manera natural, un 50% de fibra por gramo en base seca y una capacidad de eliminar radicales libres equivalente a, al menos, 50 mg de vitamina E (medida por el método DPPH).

7.4 Identificación de compuestos fenólicos, por HPLC, en el café usado, fibra de café usado obtenida mediante calentamiento óhmico y la fibra de café usado baja en diterpenos.

Para la identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC (**Tabla 7**). Se lograron identificar 4 de los 12 estándares incluidos. De los compuestos identificados en las diferentes muestras como lo fueron el ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico y (+)-catequina, el que presento mayor concentración a través del procesamiento fue el ácido clorogénico. El CU-ÓH presentó el mayor contenido de este compuesto, seguido del CU y la FCU-BD (2.37mg/g de muestra). Los resultados para CU son similares a lo reportado por ([López-Barrera; Vázquez-Sánchez: Loarca-Piña & Campos-Vega., 2016](#)) y CU-ÓH el rendimiento fue inferior para el ácido clorogénico pero mayor para el ácido gálico con respecto a lo reportado por ([Vázquez-Sánchez et al., 2018](#)). El contenido de compuestos fenólicos en la muestra es importante ya que pueden atravesar el tracto gastrointestinal y llegar a colon, ejerciendo efectos anti-proliferativos (células cáncer colon humano, *in vitro*) y anti-inflamatorio ([Campos-Vega et al 2015;](#), [Vázquez-Sánchez, et al., 2015;](#) [López-Barrera et al., 2016;](#) [García- Gutiérrez et al.,2017;](#) [Hernández-Arriaga et al., 2017](#)). En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, el ácido clorogénico posterior a la digestión gastrointestinal *in vitro* mostro un incremento de un 83%, en la fracción no digerible del intestino delgado, con lo cual esta fibra por medio de la fermentación colónica, pudiera estar utilizándose este ácido que se libera de la matriz e incluso seguir liberándose y tener así un efecto prebiótico ([Vázquez-Sánchez et al.,2018](#)).

Tabla 7. Compuestos fenólicos identificados por HPLC café usado (CU), fibra del café usado obtenida por calentamiento óhmico (CU-ÓH) y fibra del café usado baja en diterpenos (FCU-BD).

Muestra	Ácido gálico	Ácido clorogénico	Ácido caféico	(+)-Catequina
Café usado	0.217 ± 0.02 ^a	6.64 ± 2.62 ^a	0.017 ± 0.004 ^a	1.460 ± 0.40 ^a
CU- ÓH	0.191 ± 0.00 ^a	9.81 ± 0.38 ^a	0.012 ± 0.004 ^a	0.298 ± 0.01 ^b
FCU-BD	0.189 ± 0.02 ^a	2.37 ± 0.46 ^b	0.001 ± 0.000 ^b	0.316 ± 0.01 ^b

Cada valor representa la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados se expresan en: mg por gramo muestra. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey, α 0.05).

7.5 Medición del pH durante la fermentación colónica *In vitro* del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.

Las diferentes muestras obtenidas fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*, y posteriormente la fracción no digerible del CU y la FCU-BD fueron sometidas a la fermentación colónica *in vitro*. En este procedimiento se utilizó microbiota de un donador con las siguientes características: 23 años de edad, de sexo masculino con un peso 123.5 kg, una talla de 1.65 metros y teniendo un IMC de 45.3, clasificándose como obesidad tipo III, teniendo así un donador totalmente diferente a los participantes de estudios previos. Se evaluó el pH a través de los diferentes tiempos de fermentación (**Tabla 8**). Cabe mencionar que la FCU-BD nunca había sido sometido a este tipo de ensayo, a diferencia del CU que ha sido previamente fermentado con microbiota de un donador con normo-peso y con sobrepeso (De Cosío-Barrón et al., 2020).

Tabla 8. Medición del pH durante la fermentación colónica *in vitro* del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.

Compuesto Tiempo	Blanco	Control+ (Rafinosa)	CU	FCU-BD
0h	7.48 ± 0.01 ^a	7.33 ± 0.26 ^a	7.32 ± 0.00 ^a	7.16 ± 0.14 ^a
2h	7.15 ± 0.00 ^a	5.64 ± 0.03 ^b	7.05 ± 0.01 ^c	7.06 ± 0.00 ^b
4h	7.13 ± 0.01 ^a	5.18 ± 0.01 ^c	7.02 ± 0.00 ^c	7.02 ± 0.02 ^b
6h	7.26 ± 0.16 ^a	5.59 ± 0.11 ^b	7.08 ± 0.02 ^c	7.04 ± 0.01 ^b
12h	7.45 ± 0.02 ^a	4.88 ± 0.02 ^d	7.18 ± 0.01 ^b	7.14 ± 0.02 ^a
24h	7.22 ± 0.02 ^a	4.52 ± 0.01 ^d	7.19 ± 0.01 ^b	7.13 ± 0.02 ^a

Cada valor representa la media ± la desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. Los resultados expresan el PH identificado en las diferentes muestras. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey, α 0.05).

La FCU-BD tuvo un comportamiento sobre el pH similar al del CU al disminuir el pH en las horas iniciales, sin embargo, no alcanzo a disminuir los mismos valores de pH que el CU a través del ensayo, ya que la mayor disminución en la fermentación colónica con el CU y la FCU-BD se alcanzó a las 4 h pero la disminución fue de solo 4.09 % para el CU y de 1.95 % para la FCU-BD, con respecto al pH inicial sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa. El efecto del CU sobre el pH, fue menor a lo reportado, tanto en la etapa inicial como final, por (Hernández-Arriaga, Dave Oomah, Campos-Vega., 2017). Para la fermentación de CU, pero cabe mencionar que el microbiota utilizada en este estudio procedía de una persona con normopeso y otra con sobrepeso, donde se alcanzó la disminución de hasta un 9 % con respecto al pH inicial. Es importante la medición en el pH a través de la fermentación colónica ya que la disminución en el pH tiene una relación directa con el metabolismo bacteriano al momento de estar fermentando la fibra y así generar AGCC y otros metabolitos. Además, que un cambio de pH a 5.5 nos podría indicar la presencia de organismos butirógenicos. Si bien no se alcanza un disminución pronunciada en el pH con el CU o la FCU-BD, la literatura también menciona que los cambios leves en el pH, podrían indicar la utilización de estos sustratos por las familias bacterianas, al instante de su producción (Walker, Duncan, McWilliam Leitch, Child, & Flint, 2005 ;Umemura et al.,

2004). La mayor reducción para las dos muestras el CU y la FCU-BD se produce a las 4 horas de fermentación; si bien en la literatura se menciona que la producción de AGCC disminuyen el pH, esta máxima reducción no corresponde con el máximo pico de producción de AGCC tanto para el CU y FCU-BD (**Tabla 9**).

7.6 Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación *in vitro* del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.

La producción de AGCC para el CU y la FCU-BD se muestra en la **Tabla 9**; estos son productos del metabolismo bacteriano colónico. Los ácidos acético, propiónico y butírico presentaron su pico máximo de producción, a partir de la fermentación del CU, a las 12, 4 y 6 horas, respectivamente, con valores inferiores a las reportadas previamente (24 horas, 3 a 6 nmol por litro, de los AGCC principales) por (González de Cosío-Barrón, Hernández-Arriaga & Campos-Vega, 2020). Sin embargo, en ese estudio la microbiota era de una persona con sobrepeso. Para la FCU-BD la producción máxima de los ácidos acético y propiónico se dio a las 6 horas y para el butírico a las 12 horas (7.79 nmol por litro).

La producción de ácido butírico a partir de la FCU-BD es mayor a lo previamente reportado para el CU (6 nmol por litro); sin embargo, esta fibra como se había mencionado no había sido sometido a fermentación colónica, y en los estudios previos la fermentación se realizó con microbiota con sobrepeso (Cosío-Barrón, Hernández-Arriaga & Campos-Vega 2020). Las personas con sobrepeso u obesidad tienen una mayor capacidad de producir AGCC lo que se asocia a la disbiosis. Dado que los AGCC representan entre un 5 y 10 % del requerimiento energético de la dieta humana, una mayor producción indica una mayor absorción, por lo que en su podrían llevar a una mayor acumulación de grasa (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, & Bäckhed, 2016; Gomes, Hoffmann, & Mota, 2018). Sin embargo, la producción correcta de AGCC mediante un sustrato como lo puede ser la FCUBD, podría llevar a una correcta modificación de las familias bacterianas y así equilibrar la producción de ácido acético propiónico y butírico; estos cambios podrían ser observados mediante un consumo prolongado de este ingrediente. Una

producción mayor de ácido butírico no fue observada en el CU ya que después de la fermentación colónica el ácido que más se produjo fue el acético, este ácido se ha visto relacionado con la producción de Acetil-CoA la cual está relacionada en el metabolismo de glucosa (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, & Bäckhed, 2016).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Tabla 9. Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación colónica *in vitro* del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.

Tiempo (h)	Ácido Acético		Ácido propiónico		Ácido butírico	
	CU	FCU-BD	CU	FCU-BD	CU	FCU -BD
4	Nd	Nd	0.48 ± 0.01 ^{aD}	0.92 ± 0.06 ^{bC}	0.68 ± 0.05 ^{aB}	1.81 ± 0.00 ^{bB}
6	Nd	3.59 ± 0.00 ^{aA}	Nd	2.16 ± 0.00 ^{aA}	0.76 ± 0.00 ^{aB}	1.45 ± 0.61 ^{aB}
12	1.10 ± 0.00 ^{bC}	1.43 ± 0.00 ^{aB}	Nd	1.81 ± 0.00 ^{aB}	0.29 ± 0.01 ^{bB}	7.79 ± 3.11 ^{aA}
24	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	2.32 ± 0.00 ^{aB}

Cada valor representa la media ± la desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. Los resultados expresan como mol/l en las diferentes muestras. Letras diferentes por columna y renglón indican diferencia significativa (Tukey, α 0.05).

Dirección General de Bibliotecas de UAQ

7.7 Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos secundarios de la fermentación colónica *In vitro*.

En la fermentación colónica *in vitro*, tanto del CU como de la FCU-BD, se identificaron los metabolitos secundarios (MS). En las **Figura 8 y 9** se muestra las diferentes rutas asociadas a la fermentación de estos sustratos a las 4 y 6 horas, se tomaron estos tiempos debido a que fueron los tiempos donde se observó mayor producción de AGCC **tabla 9**. Al igual, que el efecto que podrían llegar a tener los diferentes MS identificados en este ensayo, sobre la modulación de la microbiota colónica, donde en una primera instancia podemos observar que las rutas asociadas en uno y en otro. Para el CU y la FCUBD las rutas con mayor predominancia son el metabolismo del sulfato/sulfito la cual esta asociada al catabolismo de los compuestos fenólicos en colón, podría llevarse a cabo en la fase II del metabolismo fenólico principalmente por el citocromo p450, donde en la sulfatación de los compuestos fenólicos se ven involucradas las enzimas sulfotransferasas, sin embargo esta ruta tiene una mayor expresión para la FCU-BD que para el CU ([F. Shahidi & Peng, 2018](#)). Otra vía metabólica asociada tanto para el CU como la FCU-BD, es el metabolismo del butirato el cual es la principal fuente de energía para los coloncitos, además de que promueven la reparación celular y el mantenimiento correcto del epitelio celular ([J. Sebastián & C. Sánchez, 2017](#)). La beta oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga es una de las rutas asociadas para el CU, lo cual podría ser benéfico en pacientes con obesidad ya que ayudaría a disminuir la cantidad de estos convirtiéndolos en acetil-COA para obtener energía a partir de ellos incluso el acetil-COA esta involucrado en el metabolismo del ácido butírico y ácido propiónico ([Vishwanath, 2016](#); [P. Louis & H. Flint, 2017](#)).

La biosíntesis de los ácidos grasos, es una vía asociada al metabolismo de la FCU-BD, esta asociación es importante debido a que se observa que a partir de la fermentación de nuestro ingrediente se puede seguir con la sugerencia de la modulación positiva de las familias bacterianas a partir de la FCU-BD. La fermentación a partir de la FCU-BD, con respecto al CU, tiene una mayor tendencia a la producción de ácido butírico, así como de los diferentes AGCC. Esto es relevante ya que la FCU-BD podría contribuir a combatir la disbiosis que se presenta

con frecuencia en las personas con sobrepeso y obesidad. Esta disbiosis se asocia a diferentes factores, entre ellos una baja ingesta de fibra dietética, por lo que las poblaciones bacterianas utilizan como sustrato proteínas o grasas que llegan hasta al colon generando la disbiosis colónica (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, & Bäckhed, 2016). Otra de las cosas importantes que podemos observar a partir de la fermentación de la FCU-BD es la ruta asociada al metabolismo de la vitamina K, ya que esto es un indicativo de que tanto como fenoles libres como ligados son utilizados por la microbiota colónica, convirtiéndolos así en compuestos bioactivos que pueden ir desde carbohidratos, proteínas, AGCC, vitamina B por supuesto vitamina K, sin embargo, esto habría que corroborarlo (F. Shahidi & Peng, 2018).

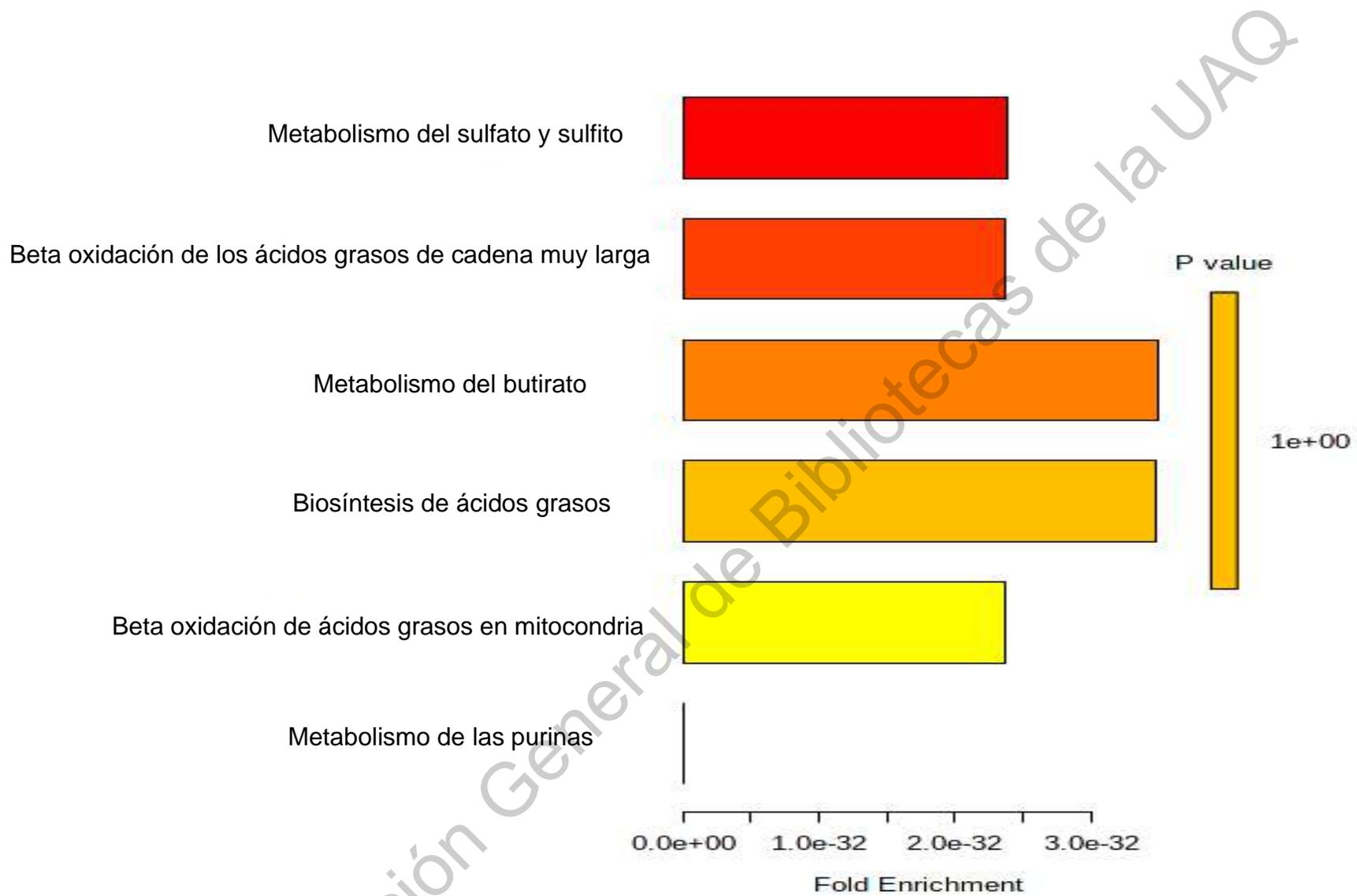


Figura 8. Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos, producto de la fermentación colónica *In vitro* del café usado a las 4 y 6 horas de fermentación.

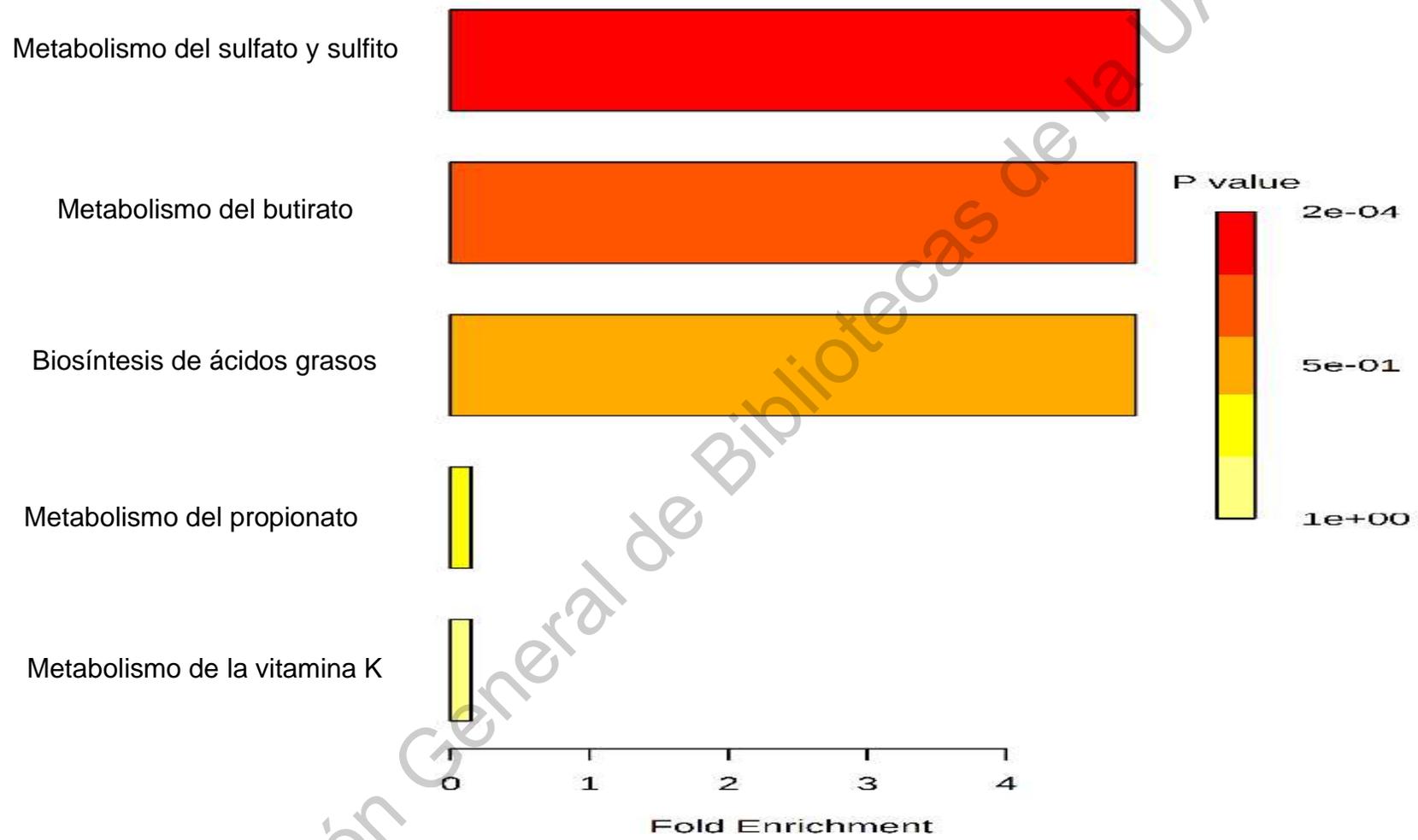


Figura 9. Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos, producto de la fermentación colónica *in vitro* de la fibra de café usado baja en diterpenos a las 4 y 6 horas de fermentación.

7.7 Metabolitos colónicos asociados a la fermentación colónica *in vitro* del café usado y la fibra de café usado baja en diterpenos.

Producto de la fermentación colónica *In vitro* del CU y de la FCU-BD, se identificaron los metabolitos secundarios (MS). Los MS pueden provenir del metabolismo de proteínas, carbohidratos e incluso de compuestos fenólicos liberados de la matriz por efecto de la digestión intestinal o del metabolismo bacteriano; además los compuestos pueden tener un potencial efecto, tanto local como a la salud del hospedero (Knirsch, Alves dos Santos, Martins de Oliveira, & Vessoni, 2010).

En las **Figura 10 y 11** podemos observar la lista de los 40 MS más abundantes tanto para la fermentación colónica *in vitro* del CU y la FCU-BD a diferentes tiempos (0, 2, 6, 12 y 24 h). Sin embargo, no son los únicos ya que se lograron identificar 394 y 391 MS respectivamente. La closterización para el CU nos indica lo siguiente, las 0 y 6 h muestran una relación entre ellas de una manera más directa y estas a su vez se relacionan con los metabolitos secundarios de las 2 y 4 h, esto nos podría indicar que la metabolización y utilización de estos por la microbiota tienen una relación directa, que con los metabolitos secundarios de las 12 y 24 h. Para la FCU-BD las 4 y 6 h, son el tiempo que tienen mayor relación entre ellos esto pudiera tener relación con que a este mismo tiempo, se producen más AGCC, lo cual pudiera ocasionar una mayor producción de MS en la muestra, el tiempo que menor relación muestra con los tiempos mencionado es 24h, sin embargo en este encontramos una concentración elevada de fenol, el cual puede provenir de la fermentación de la fibra al igual que diferentes derivados de AGCC, los cuales pudieran producirse por efecto de la microbiota colónica. Al discutir diferentes MS podemos encontrar al ácido malónico el cual es un precursor de AGCC y un componente estructural de algunas plantas derivado de flavonoides, como se discutió en secciones anteriores el incremento de estos AGCC se ve incrementado con las horas de fermentación, como podemos observar este MS presenta su mayor concentración en el tiempo cero, disminuye a las 2 horas y posteriormente a ellas no puede ser localizado por lo cual podríamos sugerir que es utilizado para el metabolismo de AGCC. Otro MS que podemos observar es el fenol

el cual se ve involucrado en el metabolismo de la FCU-BD aparece a partir de las 4 horas se mantiene a las durante la fermentación alcanzando su pico máximo a la 24 horas, para el CU este compuesto se identifica en todos los tiempos de fermentación incrementando y disminuyendo sin llegar a escasear, se habían reportado principalmente dos compuestos ácido cafeoilquinico y ácido clorogénico los cuales se han visto involucrados en efectos benéficos a la salud como la reducción de índice de diabetes y aterosclerosis, inducen la apoptosis de las células cancerígenas como HT-29 y SW480 además de participar en la prevención del cáncer de colon, además de que hay algunos géneros de bacterias que utilizan los compuestos fenólicos como sustrato algunos son *Bacteroides spp*, *Clostridium orbiscindens*, *Butyrivibrio sp. C3*, and *Eubacterium oxidoreducens*. (Jiménez, Pastoriza, & Rufián, 2015; Hernández-Arriaga, Dave Oomah, & Campos-Vega, 2017b; García-Gutiérrez, et al., 2017; F. Shahidi & Peng, 2018). Diferentes MS por metabolismo del fenol fueron localizados para el CU ácido 3-Hidroxi-3-fenilpropanoico el cual es localizado a las 4 y 6 horas de fermentación, al igual que para la FCU-BD se pudo localizar MS derivados de los compuestos fenólicos como (Hidroxitolueno butilado y ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxipropilo) el primer compuesto de estos últimos es localizado a partir de las 2 horas y alcanza su pico a las 24 horas, mientras que el segundo compuesto alcanza su pico a las 12 horas del metabolismo colónico, este tipo de hidroxilación es característica del metabolismo bacteriano en la fase II donde participa el complejo P450 y los colonocitos los cuales no solo utiliza fenoles como sustrato sino que biotransforman compuestos como carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos para convertirlos en compuestos fenólicos más simples (F. Shahidi & Peng, 2018).

Otros MS identificados dentro de la fermentación del CU, en los 40 más abundantes, relacionados a las vías metabólicas principales mostradas en la **Figura 8** (Disulfuro-dimetil, sulfuro de 2-cloroetil n-propilo, trisulfuro de dimetilo) estos se encuentran relacionados al metabolismo de los sulfitos y sulfato al igual que MS relacionados a con el metabolismo del butirato dentro de los cuales encontramos a los siguientes (2,4-Di-terc-butilfenol, 2,6-Di-terc-butil-4-hidroxi-4-metilciclohexa-2,5-dien-1-ona, 2-Metil-6-terc-butilfenol, 2-terc-butil-4-metilfenol, tert-butildimetilsilil éter

butildimetilsilil éter, 2-tert-butil-6-metil-fenol, terc-butildimetilsilil éter, 3-cloropropano-1,2-diol, bis (terc-butildimetilsilil) éter, Ácido butanoico, éster butílico, ácido propanoico, éster 2-metil-, 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentílico, cianamida, dibutilo). De estos el 2-tert-butil-6-metil-fenol el cual presenta su mayor concentración en el tiempo 4 y 6 h, sin embargo este ya esta presente en al tiempo 0 h, por lo cual podría ser un compuesto ya expuesto, desde las etapas de digestión previas, de estos MS el que más concentración presenta es el Cianamida, dibutil el cual es localizado a partir de las 4 h, teniendo su mayor pico a las 24 h, alimentos ricos en cianamida se han sugerido con beneficios a la salud como antioxidantes, disminución de los niveles de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol, además de ayudar a la absorción del calcio y magnesio en el colon, estimulando así el crecimiento bacteriano (Iriondo-DeHondo et al., 2018).

Dentro de los MS localizados en los primero 40 podemos encontrar algunos procedentes de la FCU-BD que se relaciona con una de las vías principales mostrada en la **figura 9** como lo son (1-butanol, ácido butanoico, 2-metil-, cianidina dibutilo) los cuales se involucran en el metabolismo de butirato. Dentro de esos metabolitos secundarios el 1-butanol es característico de la fermentación de carbohidratos de manera anaerobia por lo que la concentración de este MS a las 2 y 12 horas, este MS puede ser producido por *E.coli* (Zheng et al., 2009). Uno de los MS encontrado tanto en el CU como en la FCU-BD es el índole es cual es producto del metabolismo de aminoácidos aromáticos como tirosina, triptófano y fenilalanina, este compuesto es importante debido a que este se ve involucrado en el metabolismo de la melatonina y pudiera participar en la modulación del ciclo circadiano de las personas con sobrepeso u obesidad, además de que el indol ha sido asociado a la inhibición de cáncer (Macfarlane & Macfarlane, 2004; Zhao et al., 2019)

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

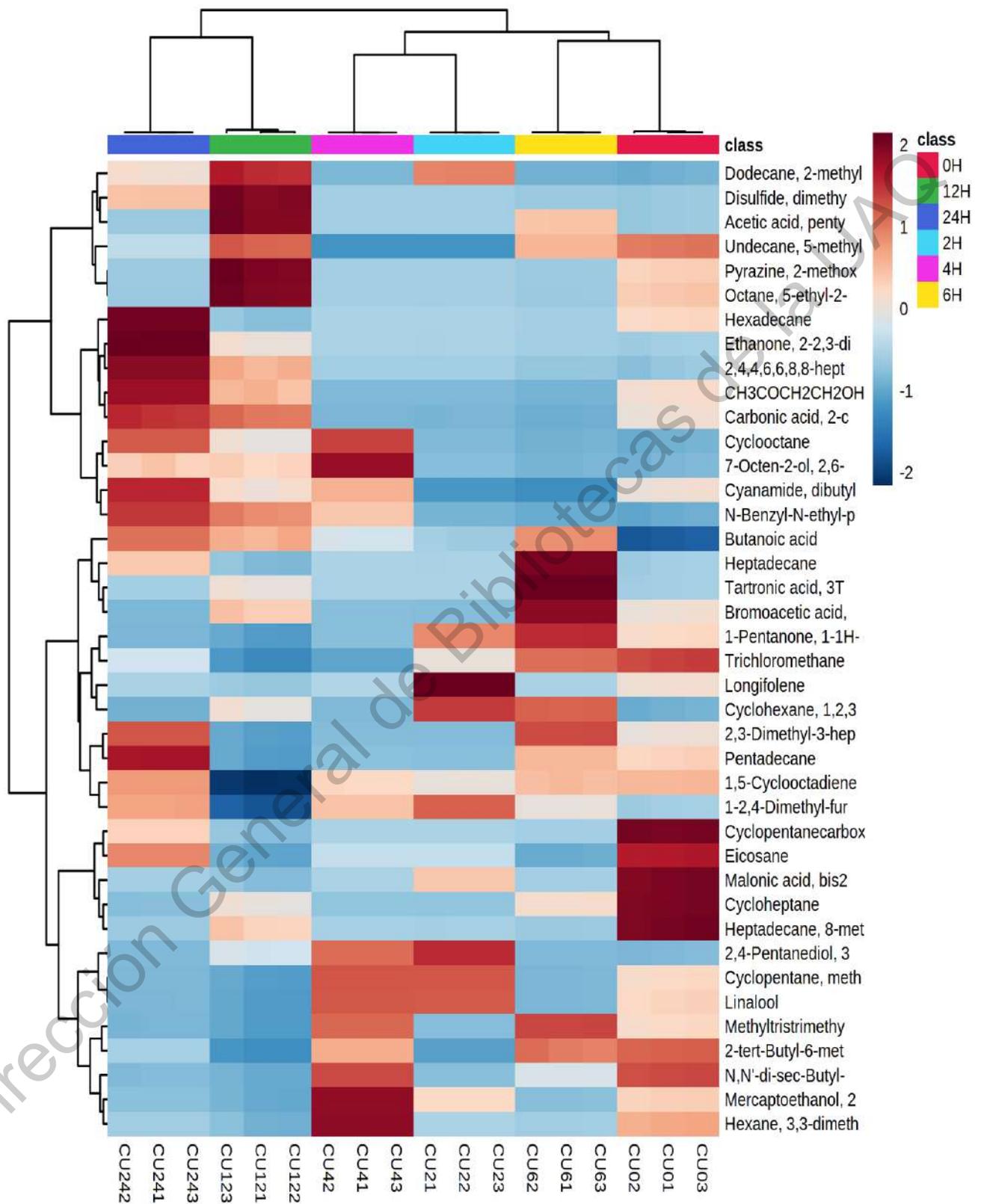


Figura 10. Metabolitos secundarios asociados a la fermentación colónica in vitro del café

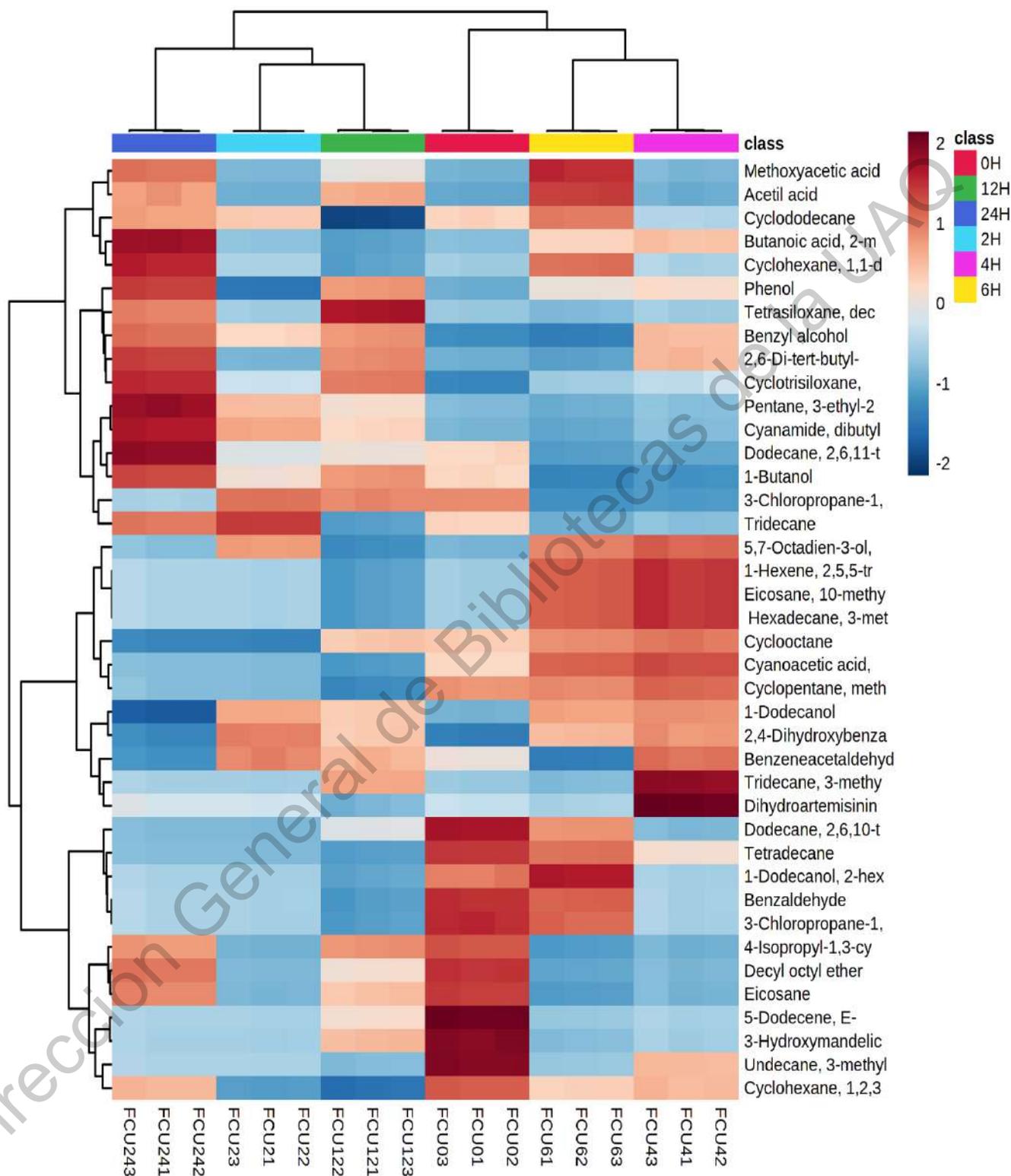


Figura 11. Metabolitos secundarios asociados a la fermentación colónica de la fibra de café usado bajo en diterpenos

8.0 Conclusiones

Dentro de la composición química de la FCU-BD mostro tener un contenido elevado de fibra superior al 50% con respecto a los carbohidratos, además de que en su composición nutraceútica mostro tener carácter de fibra dietaria antioxidante lo que la convierte en un ingrediente con potenciales beneficios a la salud. Para el ensayo de la fermentación colónica *in vitro* de la FCU-BD, hasta este trabajo era desconocido su comportamiento en este ensayo y al ser comparada con el CU se observó mayor producción de AGCC a partir de este sustrato en especial ácido butírico. Además de observar que a partir de la fermentación por la producción de diversos metabolitos secundarios y mediante un análisis metabolómico, se pudo observar que se activan vías metabólicas secundarias como la biosíntesis de ácidos grasos, producción de ácido butírico y estaría por comprobarse el metabolismo de la vitamina K, lo cual ha podría mostrar tener una modulación positiva de la microbiota colónica además de observar que esta también se utilizan compuestos fenólicos de la muestra libres o que se liberan producto de la fermentación con lo cual se pudiera sugerir que partir del consumo de esta fibra personas con sobre peso y obesidad podrían tener una modulación positiva de las poblaciones microbianas, sin embargo habría que corroborarlo.

ANEXO I

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Posgrado de Alimentos, Facultad de Química
“Carta consentimiento para participar en el proyecto de investigación”

Título del protocolo:

**“Efecto *in vitro* de la fibra dietaria antioxidante de café (*Coffea arabica* L.)
usado sobre la microbiota colónica humana y sus metabolitos”**

Investigador principal: Dra. Rocio Campos Vega
Sede donde se realizará el estudio: Departamento de Investigación y Posgrado de
Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

INVITACIÓN

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como *consentimiento informado*. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La fibra del café usado ha sido asociada a diferentes efectos benéficos a la salud, lo cual ha sido atribuido a la fermentación de la fibra en la región colónica. Para dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos es importante comprender como son transformados durante la digestión gastrointestinal, ya que en base a su forma química pueden o no ser aprovechados y cumplir su función en las células de destino, o ser desechados por el organismo.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Evaluar el efecto *in vitro* de la fibra antioxidante de café usado (*Coffea arabica* L.) sobre la composición de la microbiota colónica humana, el metabolismo de compuestos antioxidantes y la fermentación de la fibra dietaria.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá conocer el efecto de la fibra dietaria contenida en el café usado sobre la microbiota colónica del ser humano.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio usted seguirá el siguiente procedimiento:

1. Se aplicará un breve cuestionario para determinar su historia clínica y sus hábitos de alimentación.
2. Usted tendrá que asistir el día y hora señalados al laboratorio de Bioquímica Toxicológica del Posgrado de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Deberá haber consumido su último alimento al menos 90 minutos antes del inicio del ensayo. Además, cepillarse los dientes, sin pasta dental o cualquier otro producto para el aseo bucal, solamente con agua natural. Antes de iniciar el ensayo, se le pedirá enjuagarse la boca con agua. Se le solicitará que mastique 1 gramo de muestra (fibra dietaria de café usado) 15 veces, durante 15 segundos, descargando el contenido en un vaso. Inmediatamente después, se enjuagará la boca por 15 segundos con otros 5 mL de agua destilada, depositando el líquido en el vaso anterior. Esto se repetirá en dos días diferentes.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de 1 sola fase en la que masticará fibra dietaria de café usado. De no expresar alergia o intolerancias previas a este producto, este procedimiento no implica ningún riesgo para usted.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos del apartado 6.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, se le proporcionará el cuidado médico apropiado, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio, previamente valorado por el médico.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable al teléfono: 1921200 ext: 5585
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza. En caso de que tenga cualquier pregunta acerca del proyecto o en caso de una emergencia, llame al número 4921713983, con el L. N. Diego Antonio Hernández Montoya.

8. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha de la firma

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y

beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

9. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo:

Investigador principal:

Sede donde se realizará el estudio:

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Opcional)

Nombre del participante

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha de la firma

ANEXO II

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Posgrado de Alimentos, Facultad de Química
“Carta consentimiento para participar en el proyecto de investigación”

Título del protocolo:

“Efecto *in vitro* de la fibra dietaria antioxidante de café (*Coffea arábica* L.) usado sobre la microbiota colónica humana y sus metabolitos”

Investigador principal: Dra. Rocio Campos Vega
Sede donde se realizará el estudio: Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

INVITACIÓN

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como *consentimiento informado*. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La fibra del café usado ha sido asociada a diferentes efectos benéficos a la salud, lo cual ha sido atribuido a la fermentación de la fibra en la región colónica. Para dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos es importante comprender como son transformados durante la digestión gastrointestinal, ya que en base a su forma química pueden o no ser aprovechados y cumplir su función en las células de destino, o ser desechados por el organismo.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Evaluar el efecto *in vitro* de la fibra antioxidante de café usado (*Coffea arábica* L.) sobre la composición de la microbiota colónica humana, el metabolismo de compuestos antioxidantes y fibra.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá conocer el efecto de la fibra dietaria contenida en el café usado sobre la microbiota colónica del ser humano.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

1. Se aplicará un breve cuestionario para determinar su historia clínica y sus hábitos de alimentación.
2. Un día antes del ensayo, usted tendrá que asistir en la hora señalada al laboratorio de Bioquímica Toxicológica del Posgrado de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se le entregará un vaso para muestra estéril en el cual deberá coleccionar su primera deposición del día y traerla al laboratorio señalado anteriormente.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de 1 sola fase en la que se hará una donación de inóculo fecal, el cual será utilizado como fuente de la microbiota representativa del colon. Este procedimiento no implica ningún riesgo para usted.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, se le proporcionará el cuidado médico apropiado, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio, previamente valorado por el médico.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.

- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable al teléfono: 1921200 ext: 5585
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza. En caso de que tenga cualquier pregunta acerca del proyecto o en caso de una emergencia, llame al número 49217139830, con el L. N. Diego Antonio Hernández Montoya.

8. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha de la firma

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

9. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo:

Investigador principal:

Sede donde se realizará el estudio:

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Opcional)

Nombre del participante

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha de la firma

ANEXO III

Los experimentos con animales serán realizados por una persona capacitada, en el manejo de animales. A continuación, se muestra la constancia del curso de manejo de animales que lo avala.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

Santiago de Querétaro, Qro., 05 Marzo del 2019.

Comité de Bioética de la Facultad de Química

Facultad de Química

PRESENTE

Por medio de la presente hago de su conocimiento que la alumna Elisa Dufío Hurtado, perteneciente al programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos asistió a la sesión teórico-práctica de "manejo de animales de laboratorio, vías de administración y tomas de muestra", que se llevó a cabo el día 13 de febrero del 2019 en las instalaciones de la facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, con apoyo del MVZ. José Martín García Servín, responsable del Bioterio del INB, UNAM; quedando en espera de la constancia de capacitación por parte del MVZ.

Sin otro particular, quedo a su disposición,

Atentamente

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Coord. Lic. Químico Farmacéutico Biólogo
Facultad de Química, UAQ
Tel: 1921200 Ext. 5572



Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Santiago de Querétaro, Qro., México. C.P. 76010
Tel. 01 (442) 192 12 67 Fax 192 13 02

Bibliografía

- (ICO), I. C. O. (2018). Report on coffee total production by all exporting countries in thousand 60Kg bags, (April), 1. Retrieved from www.ico.org/prices/po-production.pdf
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Amaya-Cruz, D. M., Perez-Ramirez, I. F., Ortega-Diaz, D., Rodriguez-Garcia, M. E., & Reynoso-Camacho, R. (2018). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) by-product as functional ingredient: effect of thermal processing and particle size reduction on bioactive constituents and functional, morphological, and structural properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 135-144.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77, 156-161.
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Castaneda, H. A., & Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 24-36.
- Campos-Vega, R., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Gaytán-Martínez, M., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2014). Natural foods as biosystems to face noncommunicable chronic diseases: an overview. In *Biosystems engineering: Biofactories for food production in the century XXI* (pp. 289-318). Springer, Cham.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>

- Colzi, I., Taiti, C., Marone, E., Magnelli, S., Gonnelli, C., & Mancuso, S. (2017). Covering the different steps of the coffee processing: Can headspace VOC emissions be exploited to successfully distinguish between Arabica and Robusta?. *Food chemistry*, 237, 257-263.
- Dalgleish, T., Williams, J. M. G. ., Golden, A.-M. J., Perkins, N., Barrett, L. F., Barnard, P. J., ... Watkins, E. (2007). Bioactive starch foam composite enriched with natural antioxidants from spent coffee ground and essential oil. *Journal of Experimental Psychology: General*, 136(1), 23–42.
- De Melo, M. M. R., Barbosa, H. M. A., Passos, C. P., & Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of spent coffee grounds: Measurement of extraction curves, oil characterization and economic analysis. *Journal of Supercritical Fluids*, 86, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.12.016>
- Dias, João S. (2015). *vegetable breeding for nutritional quality and health benefits*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5114.4804>
- Dorsey, B. M., & Jones, M. A. (2017). Healthy components of coffee processing by-products. In *Handbook of coffee processing by-products* (pp. 27-62). Academic Press.
- Duangjai, A., Suphrom, N., Wungrath, J., Ontawong, A., Nuengchamnon, N., & Yosboonruang, A. (2016). Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*, 5(4), 324-331.
- Echavarría, A. P., Pagán, J., & Ibarz, A. (2013). Optimization of Maillard reaction products isolated from sugar-amino acid model system and their antioxidant activity. *Afinidad*, 70(562).
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488-495.

- Fuentes-Barria, H., Munoz Pena, D., Aguilera Eguia, R., & Gonzalez Wong, C. (2018). Influence of the bioactives compounds of beetroot (*Beta vulgaris* L) on the cardioprotective effect: A narrative review. *Revista Chilena de Nutrición*, 45(2), 178-182.
- García-Gutiérrez, N., Maldonado-Celis, M. E., Rojas-López, M., Loarca-Piña, G. F., & Campos-Vega, R. (2017). The fermented non-digestible fraction of spent coffee grounds induces apoptosis in human colon cancer cells (SW480). *Journal of Functional Foods*, 30, 237-246.
- Gomes, A. C., Hoffmann, C., & Mota, J. F. (2018). The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes*, 9(4), 308-325.
- Hernández-Arriaga, A. M., Oomah, B. D., & Campos-Vega, R. (2017a). Microbiota source impact in vitro metabolite colonic production and anti-proliferative effect of spent coffee grounds on human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 97, 191-198.
- Hernández-Arriaga, A. M., Oomah, B. D., & Campos-Vega, R. (2017b). Microbiota source impact in vitro metabolite colonic production and anti-proliferative effect of spent coffee grounds on human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 97, 191-198.
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240-248.
- Iriondo-DeHond, A., Garcia, N. A., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Escobar, F. V., Blanch, G. P., ... & del Castillo, M. D. (2019). Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 194-204.
- Janissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 128, 110-117.

Jenkins, R. W., Stageman, N. E., Fortune, C. M., & Chuck, C. J. (2014). Effect of the type of bean, processing, and geographical location on the biodiesel produced from waste coffee grounds. *Energy & Fuels*, 28(2), 1166-1174.

Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. A. (2015). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 12-18.

Knirsch, M. C., Dos Santos, C. A., de Oliveira Soares, A. A. M., & Penna, T. C. V. (2010). Ohmic heating—a review. *Trends in food science & technology*, 21(9), 436-441.

Kim, J. Y., Jung, K. S., & Jeong, H. G. (2004). Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS letters*, 569(1-3), 321-326.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345.

Kovalcik, A., Obruca, S., & Marova, I. (2018). Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 104-119.

López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food chemistry*, 212, 282-290.

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 19(1), 29-41

Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (1997). Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(sup222), 3-9.

Manrique Vergara, D., & González Sánchez, M. E. (2017). Ácidos grasos de cadena

corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, 34, 58-61.

Martínez Sáez, N., & Castillo, M. (2019). Development of sustainable novel foods and beverages based on coffee by-products for chronic diseases.

Mayanga-Torres, P. C., Lachos-Perez, D., Rezende, C. A., Prado, J. M., Ma, Z., Tompsett, G. T., ... & Forster-Carneiro, T. (2017). Valorization of coffee industry residues by subcritical water hydrolysis: recovery of sugars and phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 75-85.

Monente, C., Ludwig, I. A., Irigoyen, A., De Pena, M. P., & Cid, C. (2015). Assessment of total (free and bound) phenolic compounds in spent coffee extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(17), 4327-4334.

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012a). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58.

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012b). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 897-903.

Nguyen, Q. A., Cho, E. J., Lee, D. S., & Bae, H. J. (2019). Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds. *Bioresource technology*, 272, 209-216.

Pérez-Burillo, S., Pastoriza, S., Fernández-Arteaga, A., Luzón, G., Jiménez-Hernández, N., D'Auria, G., ... & Rufián-Henares, J. A. (2019). Spent coffee grounds extract, rich in manno-oligosaccharides, promotes a healthier gut microbial community in a dose-dependent manner. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(9), 2500-2509.

Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Alvarez-Parrilla, E., ... & González-Aguilar, G. A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and

possible effect after ingestion. *Food & function*, 5(6), 1063-1072.

Sanchez, P. M., Pauli, E. D., Scheel, G. L., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2018). Irrigation and light access effects on *Coffea arabica* L. leaves by FTIR-chemometric analysis. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 29(1), 168-176.

Sebastián Domingo, J. J., & Sánchez Sánchez, C. (2018). *From the intestinal flora to the microbiome* (No. ART-2018-104369).

Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11-68.

Tsai, W. T., Liu, S. C., & Hsieh, C. H. (2012). Preparation and fuel properties of biochars from the pyrolysis of exhausted coffee residue. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 93, 63-67.

UMEMURA, M., FUJII, S., ASANO, I., HOSHINO, H., & IINO, H. (2007). Effect of small dose of manooligosaccharides from coffee mannan on defecating conditions and fecal microflora. *Food science and technology research*, 10(2), 174-179.

Vázquez-Sánchez, K., Martínez-Saez, N., Rebollo-Hernanz, M., del Castillo, M. D., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2018). In vitro health promoting properties of antioxidant dietary fiber extracted from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. *Food chemistry*, 261, 253-259.

Vishwanath, V. A. (2016). Fatty acid beta-oxidation disorders: a brief review. *Annals of neurosciences*, 23(1), 51-55.

Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2012). Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: Time course of changes in composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 1005-1012.

WHO. (2018). Alimentación sana. 02/06/2019, de WHO Sitio web:

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>

Zhao, D., Yu, Y., Shen, Y., Liu, Q., Zhao, Z., Sharma, R., & Reiter, R. J. (2019). Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants. *Frontiers in endocrinology*, 10, 249.

Zheng, Y. N., Li, L. Z., Xian, M., Ma, Y. J., Yang, J. M., Xu, X., & He, D. Z. (2009). Problems with the microbial production of butanol. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(9), 1127-1138.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ