

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

**“Bioaccesibilidad, permeabilidad y efecto sobre la
microbiota intestinal *in vitro* de compuestos
nutracéuticos del café (*Coffea arabica* L.) usado”**

TESIS

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

Presenta: I.I.A. Ana Cecilia González de Cosío Barrón

Dirigido por: Dra. Rocio Campos Vega

Santiago de Querétaro, Qro. Septiembre 2016



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

“Bioaccesibilidad, permeabilidad y efecto sobre la microbiota intestinal *in vitro* de compuestos nutraceuticos del café (*Coffea arabica* L.) usado”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

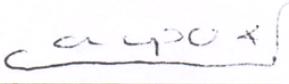
Presenta:

I.I.A. Ana Cecilia González de Cosío Barrón

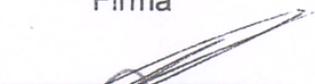
Dirigido por:

Dra. Rocio Campos Vega

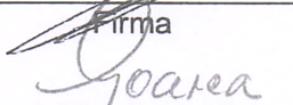
Dra. Rocio Campos Vega
Presidente


Firma

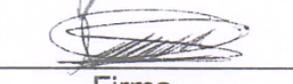
Dr. Gerardo Nava Morales
Secretario


Firma

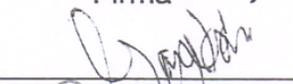
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Vocal


Firma

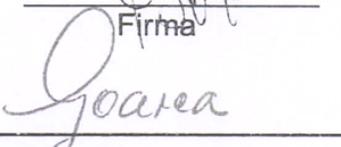
Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Suplente


Firma

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Suplente


Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2016

RESUMEN

El café es una de las bebidas más populares en el mundo, y es el resultado de un largo y complejo proceso tecnológico, desde el cultivo hasta la preparación de la bebida, siendo la segunda bebida más consumida después del agua. La industria cafetalera es una de las principales fuentes contaminantes del continente americano, debido a que solamente utiliza el 9.5 % del fruto fresco para la preparación de la bebida, quedando un 90.5 % como residuo. Entre los principales subproductos generados se encuentra el café usado (CU), el cual es el residuo sólido recuperado posterior a la preparación de la bebida y el café soluble. Debido a los compuestos bioactivos presentes en el CU, entre ellos la fibra dietaria, relacionada con beneficios prebióticos modulados por compuestos como: los oligosacáridos, compuestos fenólicos, entre otros, es importante encontrar ideas prácticas e innovadoras que permitan su uso en la industria de alimentos, dando un valor agregado a este producto de desecho, con potenciales beneficios a la salud del consumidor. El objetivo del trabajo fue determinar la bioaccesibilidad, permeabilidad y efecto sobre la microbiota intestinal *in vitro* de compuestos nutracéuticos del café (*Coffea arabica* L.) usado, tostado medio (TM) y tostado oscuro (TO), utilizando microbiota de sujeto con peso normal y uno con sobrepeso. La fibra total (soluble e insoluble) fue cuantificada y el CU fue sometido a una digestión gastrointestinal *in vitro* (boca-colon). El mayor contenido de fibra total lo presentó el CU con TM (58.1 %). Rafinosa, estaquiosa y verbascosa fueron identificados en el grano de café mientras que solo los dos últimos se encontraron en el CU (0.68 y 0.69; 0.68 y 0.66; TO y TM, mg Eq de estaquiosa y verbascosa/g muestra, respectivamente). La mayor bioaccesibilidad gastrointestinal de estaquiosa y verbascosa se logró a los 15 min de digestión en el intestino delgado. La microbiota de sujetos con sobrepeso logró la mayor bioaccesibilidad de estaquiosa y rafinosa, con los valores más altos para rafinosa (4.47 y 4.53 mg Eq/g muestra, TO y TM, respectivamente, $p < 0.05$) en comparación con el sujeto de peso normal, con la que se obtuvo la mayor bioaccesibilidad de verbascosa. La mayor bioaccesibilidad gastrointestinal de las melanoidinas se logró durante los 15 min de digestión en el intestino delgado de CU/TM (10.00g de melanoidinas/100g de muestra). El CU/TM mostró la mayor inhibición de la actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa, teniendo un efecto similar al de la inulina. Se realizó una extracción de DNA de los productos de la fermentación colónica *in vitro* con la que se obtuvo un perfil microbiano. Los resultados mostraron que el CU/TO con la microbiota de sobrepeso presentó diferencia en comparación con el TM y el control negativo. Por primera vez se aportan resultados sobre la bioaccesibilidad gastrointestinal de los oligosacáridos y melanoidinas del CU, así como la influencia de la microbiota colónica. Los resultados sugieren el potencial funcional del CU como ingrediente en la industria alimentaria. Se requieren estudios adicionales para validar los resultados de este trabajo.

(Palabras clave: café usado, fibra dietaria antioxidante, bioaccesibilidad, oligosacáridos, melanoidinas, microbiota, digestión gastrointestinal *in vitro*, fermentación colónica *in vitro*).

ABSTRACT

Coffee is one of the most popular beverages in the world, and it is the result of a long and complex technological process, from cultivation to the preparation of the beverage. It is the second most consumed beverage after water. The coffee industry is one of the main polluting sources in the Americas because it uses only 9.5 % of fresh fruit for the preparation of the beverage, generating 90.5 % as waste. The main subproducts generated is spent coffee grounds (SCG), it is a solid residue recovered after the preparation of the beverage and soluble coffee. Due the bioactive compounds present in SCG, including dietary fiber, with prebiotic related benefits modulated by compounds such as oligosaccharides, phenolic compounds, among the others, it is important to find innovative ideas that allow their use in the food industry, giving an added value to this waste product, with potential benefits to the health of consumers. The main objective of this work was to determinate the bioaccessibility, permeability and effect on intestinal microbiota *in vitro* from nutraceutical compounds of the spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds, light and dark roasted, using microbiota from subjects with normal weight and overweight. Total fiber (soluble and insoluble) was quantified and SCG was subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion (mouth-colon). The highest content of total dietary fiber was obtained from SCG-light roasted (58.1 %). Raffinose, stachyose and verbascose were identified in coffee beans, while only the last two compounds were found in the SCG samples (0.68 and 0.69, 0.68 and 0.66, light and dark roasted, μg equivalent of stachyose and verbascose/g sample, respectively). Small intestinal digestion (15 min) induced the highest gastrointestinal bioaccessibility of stachyose and verbascose. While microbiota from overweight subjects displayed the highest release of raffinose (for both roasting levels, compared with normal weight), up to 4.47 mg for dark and up to 4.53 mg for light samples. The highest gastrointestinal bioaccessibility of melanoidins was achieved after 15 min of small intestinal digestion of the SCG-light roasted (10 g melanoidins/100g sample). The SCG-light roasted showed the highest inhibition activity of the β -glucosidase, urease, β -glucuronidase, tryptophanase enzymes, which are considered harmful, and it have similar effect of inulin. It has been made DNA extraction from the *in vitro* colonic fermentation products, where the overweight microbiota showed difference compared to light roasted and the negative control. To our knowledge, this is the first work reporting oligosaccharides and melanoidins gastrointestinal bioaccessibility from SCG and and the influence of the colonic microbiota. The results suggest the potential functional of SCG supporting their use as ingredient into the food industry. Further studies are required to validate the results of this work.

Keywords: spent coffee, bioaccessibility, melanoidins, oligosaccharides, *in vitro* gastrointestinal digestion, *in vitro* colonic fermentation

DEDICATORIA

*A mis padres, Arturo y Cecilia,
a quienes debo mi formación personal y profesional;
además de brindarme su cariño y orientación.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante todo este trayecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme todo el apoyo durante mi estancia.

A mi familia, por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A mi asesora, Dra. Rocio Campos Vega, quien me brindo su valiosa orientación, paciencia, confianza y guía en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A todos los miembros de mi comité, Dra. Ma. Guadalupe Loarca Piña, Dr. Gerardo Nava Morales, Dra. Sandra Mendoza Díaz y a la Dra. Marcela Gaytán Martínez, por su valiosa contribución y sus conocimientos para la realización y mejoramiento del proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Toxicológica por su amistad, compañía y ayuda, así como a mis compañeros del Laboratorio de Molecular, quienes me apoyaron y formaron parte de esta investigación.

A todas las personas que en una u otra forma fueron parte de la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	iii
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE CUADROS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Café.....	4
II.1.1 Generalidades.....	4
II.1.2 Producción y exportación de café.....	7
II.1.3 Composición química.....	8
II.1.4 Subproductos.....	10
II.2 Café usado.....	12
II.2.1 Generalidades.....	12
II.2.2 Composición química.....	13
II.2.3 Compuestos bioactivos.....	15
II.2.3.1 Compuestos fenólicos.....	16
II.2.3.1.1 Perfil de compuestos fenólicos.....	18
II.2.3.1.2 Metabolismo de los compuestos fenólicos.....	20
II.2.3.1.3 Efectos sobre la salud.....	21
II.2.3.2 Fibra dietaria.....	22
II.2.3.2.1 Generalidades y consumo de fibra en México.....	22
II.2.3.2.2 Fibra dietaria antioxidante.....	24
II.2.3.2.3 Clasificación fibra dietaria.....	24
II.2.3.2.3.1 Oligosacáridos.....	26
II.2.3.2.3.2 Melanoidinas.....	27
II.2.3.3 Metabolismo de la fibra dietaria y efectos benéficos a la salud.....	29
II.2.4 Capacidad antioxidante.....	31

II.2.4.1 Métodos para determinar capacidad antioxidante.....	32
II.2.4.1.1 DPPH	33
II.2.4.1.2 ABTS	34
II.3 Salud gastrointestinal	36
II.3.1 Digestión gastrointestinal	36
II.3.1.1 Bioaccesibilidad y permeabilidad	37
II.3.1.2 Modelos de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	39
II.3.1.2.1 Digestión	39
II.3.1.2.2 Modelo saco intestinal invertido	40
II.3.1.2.3 Fermentación colónica	42
II.4 Microbiota colónica.....	43
II.4.1 Generalidades	43
II.4.2 Composición de la microbiota colónica humana	46
II.4.3 Modulación de la microbiota colónica por la fracción no digerible de los alimentos	48
II.4.4 Efecto benéfico a la salud	51
II.4.4.1 Actividad enzimática.....	54
II.4.5 Métodos para determinar modulación de la microbiota.....	55
III. JUSTIFICACIÓN	58
IV. OBJETIVOS	59
IV.1 Objetivo general	59
IV.2 Objetivos particulares.....	59
V. MATERIALES Y MÉTODOS	60
V.1. MATERIALES	60
V.1.1 Materia Prima.....	60
V.1.2 Reactivos y animales	60
V.2. MÉTODOS	61
V.2.1 Composición Proximal	61
V.2.1.1 Determinación de cenizas.....	61
V.2.1.2 Determinación de humedad	61
V.2.1.3 Determinación de lípidos.....	62
V.2.1.4 Determinación de proteína.....	63
V.2.2. Composición nutracéutica.....	63
V.2.2.1 Determinación de fibra	63

V.2.2.1.1 Fibra insoluble	63
V.2.2.1.2 Fibra soluble	64
V.2.2.2 Obtención del extracto etanólico	65
V.2.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante	65
V.2.2.3.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH	65
V.2.2.3.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS	66
V.2.3 Extracción de oligosacáridos	66
V.2.3.1 Cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución	66
V.2.4 Cuantificación de melanoidinas	67
V.2.5 Digestión gastrointestinal	68
V.2.5.1 Simulación de las condiciones de la boca	68
V.2.5.2 Simulación de las condiciones del estómago	69
V.2.5.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado	69
V.2.5.3.1 Técnica del saco intestinal invertido	69
V.2.5.3.1.1 Manejo de los animales	69
V.2.5.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido	70
V.2.5.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio	70
V.2.5.3.2 Determinación del flujo de agua	71
V.2.6 Fermentación colónica	71
V.2.7 Actividad enzimática	72
V.2.7.1 Tratamiento de las muestras fecales	72
V.2.7.2 Ensayo de actividad de la β -glucosidasa	72
V.2.7.3 Ensayo de actividad de la β -glucuronidasa	72
V.2.7.4 Ensayo de actividad de la triptofanasa	73
V.2.7.5 Ensayo de actividad de la ureasa	73
V.2.8 Análisis molecular de la microbiota fecal	74
V.2.8.1 Extracción de material genético	74
V.2.8.2 Técnica molecular RISA	74
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
VI.1 Composición proximal de los granos de café y café usado con dos diferentes grados de tostado	76
VI.2 Contenido de fibra dietética de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado	80
VI.3 Capacidad antioxidante de los granos de café y café usado con diferente grado de tostado	81

VI.4 Contenido de oligosacáridos del grano de café y café usado con dos diferentes grados de tostado.....	84
VI.5 Contenido de melanoidinas del grano de café y café usado con dos diferentes grados de tostado.....	87
VI.6 Capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos diferentes grados de tostado	89
VI.7 Capacidad antioxidante durante la absorción <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.....	93
VI.8 Contenido de oligosacáridos de los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos diferentes grados de tostado.....	94
VI.9 Coeficiente de permeabilidad aparente de los oligosacáridos del café usado digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.....	101
VI.10 Determinación de las melanoidinas en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos diferentes grados de tostado.....	102
VI.11 Coeficiente de permeabilidad aparente de las melanoidinas del café usado digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.....	105
VI.12 Flujo de agua durante el ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i> del café usado usado de dos diferentes grados de tostado.....	107
VI.13 Efecto de los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND del café utilizado con diferentes grados de tostado sobre pH.....	109
VI.14 Actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado.....	112
VI.15 Perfiles microbianos de los los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado.....	121
VII. CONCLUSIONES	125
VIII. BIBLIOGRAFÍA	126
ABREVIATURAS	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición del café	5
Figura 2. Estructura de compuestos fenólicos	17
Figura 3. Estructura química del radical DPPH y su reacción con un agente de barrido.	34
Figura 4. Estructura de ABTS	35
Figura 5. Actividad de la β -glucuronidasa en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso.....	114
Figura 6. Actividad de la β -glucosidasa en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso.....	116
Figura 7. Actividad de la ureasa en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso	117
Figura 8. Actividad de la triptofanasa en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso.....	119
Figura 9. Perfiles microbianos de los los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado sobre la microbiota intestinal	122
Figura 10. Árbol filogenético de los perfiles microbioanos	123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción anual de café de los años 2009 a 2014	8
Tabla 2. Composición química de los granos de café.....	9
Tabla 3. Composición química del café usado.....	13
Tabla 4. Composición mineral del café usado	15
Tabla 5. Compuestos fenólicos presentes en el café usado por el método de filtración.....	19
Tabla 6. Capacidad Antioxidante del café usado	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del grano grano de café y café usado con dos diferentes grados de tostado.....	76
Cuadro 2. Contenido de fibra dietética del grano y café usado de dos diferentes grados de tostado.	80
Cuadro 3. Capacidad antioxidante en grano de café y café usado con diferentes grados de tostado.	82
Cuadro 4. Contenido de oligosacáridos, determinados por HPLC, en el grano de café y café usado	84
Cuadro 5. Contenido de melanoidinas en el grano de café y café usado.....	87
Cuadro 6. Capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado de dos diferentes grados de tostado.	89
Cuadro 7. Capacidad antioxidante de los compuestos del café usado que fueron permeables/absorbidos <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.	93
Cuadro 8. Bioaccesibilidad de los oligosacáridos, determinados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado.	95
Cuadro 9. Cantidad de oligosacáridos, determinados por HPLC, en los productos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado, así como de la inulina.	99
Cuadro 10. Coeficiente de permeabilidad aparente de los oligosacáridos, determinados por HPLC, del café usado, con dos grados de tostado, digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.....	101
Cuadro 11. Bioaccesibilidad de las melanoidinas en los productos de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado con dos grados de tostado.	103
Cuadro 12. Coeficiente de permeabilidad aparente de las melanoidinas, del café usado, con dos grados de tostado, digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.	106

Cuadro 13. Flujo de agua durante el ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i> (saco intestinal invertido) del café usado.....	108
Cuadro 14. Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado de dos diferentes grados de tostado sobre el pH del medio de incubación.....	111

I. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más populares en el mundo, siendo la segunda bebida más consumida, después del agua. El café es el resultado de un largo y complejo proceso tecnológico, desde el cultivo hasta la preparación de bebidas. Aunque actualmente la producción más grande se realiza en países como Brasil, Vietnam o Colombia, su origen es Etiopía y Arabia (Esquivel y Jiménez, 2012; Murthy y Naidu, 2010).

La Organización Internacional del Café (ICO, por sus siglas en inglés), estimó un número de 145 millones de sacos de café producidos en el mundo entre el 2014 y el 2015. Casi el 50 % de la producción mundial de café se procesa para la preparación de café soluble generando alrededor de 6 millones de toneladas de CU por año (Mussatto *et al.*, 2011c). Además, está estimado que el consumo de café aumentó en 1.8 % en el año 2014, por lo que este producto se ha convertido en una demanda importante para muchos países, especialmente en los mercados tradicionales (Canadá, la Unión Europea, Japón, Noruega, Suiza y Estados Unidos), pero el mayor potencial está en los mercados emergentes (Argelia, Australia, Rusia, Corea del Sur, Turquía y Ucrania, entre otros), así como en los países exportadores de café.

El café es una bebida que se obtiene a partir de la mezcla en agua caliente de los granos tostados de la planta de café (*Coffea* de la familia Rubiaceae, conocida como cafeto). Su popularidad se debe a sus efectos estimulantes causados principalmente por la cafeína, la cual representa alrededor del 0.75 al 1.5 % del peso del grano (Belitz y Grosch, 1999).

La industria cafetalera es uno de los principales contaminadores del continente americano, debido a que durante el procesamiento del café únicamente se emplea el 9.5 % del fruto fresco para la preparación de la bebida, quedando un 90.5 % como subproductos. Entre los principales subproductos generados durante los procesos de industrialización del café se encuentra la pulpa fresca, el mucilago, pergamino y el CU (Rodríguez-Valencia, 2010), este último retiene material orgánico, cafeína, taninos y polifenoles, entre otros compuestos, que se han

convertido en un problema de contaminación ambiental (Bravo *et al.*, 2012; Mussatto *et al.*, 2011c).

El café tostado-molido usado, o café usado, es el principal subproducto generado durante la producción de café instantáneo mediante extracción con agua caliente, a partir de granos de café tostado. Éste contiene varios compuestos relacionados con la salud, como son: fibra dietaria, compuestos fenólicos, melanoidinas, diterpenos, xantinas y vitamina, entre otros. Los compuestos fenólicos del café han atraído mucho interés en los últimos años debido a sus fuertes propiedades antioxidantes y quelantes de metales. Los ácidos clorogénicos (CGA, por sus siglas en inglés) son los principales componentes de la fracción fenólica de semillas de café verde, son altamente biodisponibles, son de fácil absorción y/o son metabolizados en todo el tracto gastrointestinal (Farah *et al.*, 2005). Durante el tostado del café las altas temperaturas ocasionan una reducción de los CGA, por transformación en quinolactonas y melanoidinas. Las melanoidinas son compuestos de color marrón con alto peso molecular, procedentes de la reacción de Maillard entre grupos amino y grupos carbonilo, los cuales presentan capacidad antioxidante. Además en estudios recientes se ha reportado que modulan el crecimiento de bacterias en el colon y tienen efectos antiinflamatorios (Esquivel y Jiménez, 2012; Panusa *et al.*, 2013).

Una de las principales características de los subproductos vegetales es su fuente de fibra, la cual es de gran importancia debido a que participan en la prevención de desórdenes gastrointestinales (movilidad y el tiempo de tránsito, síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, estreñimiento, etc.), enfermedad cardíaca coronaria, efecto prebiótico, saciedad y disminución de la obesidad. Además de su importancia en el mantenimiento del colon, mejorando el sistema inmunológico (Slavin, 2013; Slavin, 1987).

La fibra dietaria se define como los restos de alimentos de origen vegetal que quedan después de la hidrólisis por las enzimas del sistema digestivo, clasificándose tanto en solubles como insolubles. Esta proporciona sustratos para la fermentación a las bacterias en el intestino grueso, produciendo diversos compuestos finales como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC; acétato,

propiónato y butirato, principalmente), así como amoníaco, gases, H₂, CO₂, aminos y fenoles (Saura-Calixto, 1998, 2011) .

Hoy en día existe una gran demanda por productos alimenticios libres de aditivos o productos nutricionales y/o saludables, que induce a la industria alimentaria a encontrar nuevas fuentes de antioxidantes y de compuestos bioactivos. Es por esto que el conocimiento, uso y beneficios de los compuestos bioactivos extraídos del residuo de café se vuelve un tema de interés buscando que estos tengan un beneficio para la salud de la población.

II. ANTECEDENTES

II.1 Café

II.1.1 Generalidades

El café ha sido consumido durante más de 1.000 años y hoy es la bebida más consumida en el mundo; alrededor de 400 mil millones de tazas de café son consumidas al año (Infographic, 2015). El café es uno de los productos alimenticios más importantes del mundo y ocupa el segundo lugar, después del petróleo crudo, entre todos los productos básicos. Alrededor de 60 países tropicales y subtropicales producen café ampliamente, siendo para algunos de ellos el principal producto de exportación agrícola (Lashermes *et al.*, 2008). En 2008, de acuerdo a la "Organización Internacional del Café", la producción de café ascendió a cerca de 680 millones de toneladas (Reffas *et al.*, 2010).

El cafeto o arbusto del café pertenece a la familia *Rubiaceae*. Los granos del café se producen de la planta de *Coffea L.*, de los cuales hay más de 70 especies. Sin embargo, sólo dos de estas especies se exploran en el comercio mundial: *Coffea arabica* (arabica), considerada como la más noble de todas las plantas de café, proporcionando el 75 % de la producción mundial; y *Coffea canephora* (robusta), considerada más ácida, pero más resistente a plagas, la cual proporciona el 25 % de la producción mundial. *C. arabica* es un arbusto originario de Etiopía y se desarrolla bien en altitudes altas (600-2000 m), mientras que las plantaciones de *C. canephora* se adaptan en altitudes por debajo de 600 m (Belitz y Grosch, 1999; Etienne, 2005).

La economía principal del café se debe a la bebida, una infusión preparada a partir de granos tostados y molidos. Las bebidas mayormente, consumidas alrededor del mundo, son producidas por las especies *Coffea arabica* (arabica) y *Coffea canephora* (robusta) (Bertrand *et al.*, 2003).

Las cerezas son la fruta cruda de la planta de café, que se componen de dos granos de café cubiertos por un pergamino delgado como casco y además rodeado de pulpa, como se muestra en la Figura 1 (Mussatto *et al.*, 2011c).

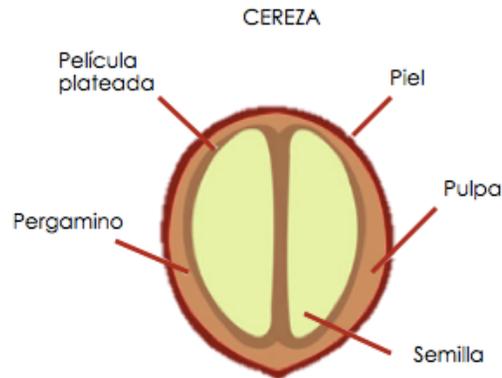


Figura 1. Composición del café

(“Café Gila,” 2014)

La cereza tiene un blando y duro pericarpio, de color verde, que se vuelve rojo-violeta o rojo intenso al madurar. El pericarpio cubre el mesocarpio exterior, es decir, la pulpa amarillenta, fibrosa y dulce. Esto es seguido por una capa traslúcida, incolora, delgada, viscosa y altamente hidratada de mucílago (también llamada la capa de pectina). Luego continúa una capa delgada y amarilla llamada pergamino. Y por último la película plateada, que cubre el hemisferio del grano de café (Berbert *et al.*, 2001).

Estas cerezas se cosechan generalmente después de 5 años de plantación de los árboles de café y cuando el fruto se vuelve rojo. El procesamiento del café inicia con la conversión de las cerezas de café en granos de café verde, eliminando la pulpa y el pericarpio utilizando un método húmedo o seco. Dependiendo del método de procesamiento de cerezas de café, es decir, el proceso húmedo o seco, los residuos sólidos obtenidos tienen diferentes terminologías: pulpa o cáscara, respectivamente. El método en seco, comúnmente utilizado para robusta, es tecnológicamente más simple en comparación con el método húmedo, que se utiliza generalmente para los granos de café arabica. En el método seco los frutos de café recolectados se secan al sol y luego mecánicamente son descascarados eliminando las capas (piel, pulpa, y pergamino) que rodean las semillas, todo esto en un solo paso (Vaast *et al.*, 2006). En cambio para el método húmedo, la pulpa y el pergamino se retiran mientras la cereza está todavía fresca; este proceso implica

varias etapas que comprenden cantidades considerables de agua y también incluye una etapa de fermentación microbiana, con el fin de eliminar cualquier mucílago unido a los granos (Arya y Rao, 2007; Gonzalez-Rios *et al.*, 2007).

El tostado de los granos de café es un paso muy importante en el procesamiento del mismo, ya que las propiedades organolépticas específicas (sabores, aromas y color) se desarrollan en esta etapa, afectando la calidad del café y por lo tanto de la bebida. Este proceso depende del tiempo/temperatura, provocando varios cambios en la composición química y las actividades biológicas de café, como resultado de la transformación de los constituyentes polifenólicos de origen natural en una mezcla compleja de productos de la reacción de Maillard, así como la formación de compuestos orgánicos resultantes de la pirolisis. Los compuestos azufrados también se cambian por la oxidación, degradación térmica, y/o hidrólisis, además el contenido de vainillina aumenta considerablemente durante el proceso de tostado. Las reacciones químicas durante el tostado del café, la pérdida de humedad y otros cambios (color, volumen, masa, forma, pH, densidad, y los componentes volátiles) ocurren, mientras que el CO₂ es generado. Por lo tanto, el tostado del café es un proceso complejo, teniendo en cuenta la importancia del calor transferido al grano. Después del proceso de tostado, los granos de café deben enfriarse rápidamente para detener las reacciones exotérmicas y prevenir un calentamiento excesivo, lo que podría poner en peligro la calidad del producto. Posteriormente, los granos tostados se muelen, generalmente por molinillos de múltiples etapas. Algunos granos tostados se empaquetan y se envían como granos enteros. Finalmente, el café molido es empacado y sellado al vacío (Franca *et al.*, 2009a; Franca *et al.*, 2009b; Fujioka y Shibamoto, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Kumazawa y Masuda, 2003).

Por lo tanto las propiedades y la calidad del café, así como su composición y muchas características del grano dependen tanto de la especie (*C. arabica* o *C. canephora*), condiciones de cultivo de las plantas (sombra, poda, fertilización, el suelo, la altitud, la exposición al sol, la lluvia y la temperatura), el grado de madurez en la cosecha, el método de cosecha, el método de procesamiento (seco o húmedo) y las condiciones de tostado (Esquivel y Jiménez, 2012).

La producción de granos de café verde trae por consiguiente la generación de varios subproductos según el método de procesamiento realizado. El subproducto principal del procesamiento en seco está compuesto por la piel, pulpa, mucílago y el pergamino, todos juntos en una sola fracción (cáscara de café). El procesamiento húmedo, en contraste, potencialmente permite la recuperación de la piel y la pulpa en una fracción (43.2 % p/v de la fruta entera), mucílago y azúcares solubles en una segunda fracción, cuando no se utiliza la fermentación (11.8 % p/v) y, finalmente, el pergamino (6.1 % p/v) (Esquivel y Jiménez, 2012).

II.1.2 Producción y exportación de café

El café es uno de los principales productos de origen agrícola que se comercializa en los mercados internacionales, teniendo gran importancia en cuanto a la economía y la política de muchos países en desarrollo. Según la OIC, la producción total en el año cafetero 2013/14 se presenta alrededor de 145.8 millones de sacos, lo que representa un ligero aumento con respecto a la producción del año 2012/13. En la actualidad, el café se produce en un gran número de países de alrededor del mundo; sin embargo, los diez principales países productores de café son responsables de aproximadamente el 80 % de la producción mundial. De este porcentaje, América del Sur participa con alrededor del 43 %, Asia con el 24 %, América Central 18 % y África con un 16 %. Brasil, Vietnam, Colombia e Indonesia son los mayores productores mundiales, responsables de más de la mitad de la oferta mundial de café. En la Tabla 1 se observa la producción anual de café en los diferentes países ("International Coffee Organization," 2014).

Tabla 1. Producción anual de sacos de café entre el 2009 al 2014

(000 sacos)

Pais	Tipo de café	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Brasil	(A/R)	39 470	48 095	43 484	50 826	49 152	45 342
Colombia	(A)	8 098	8 523	7 652	9 927	12 124	12 500
Costa Rica	(A)	1 304	1 392	1 462	1 571	1 418	1 508
El Salvador	(A)	1 065	1 814	1 152	1 360	742	680
Etiopia	(A)	6 931	7 500	6 798	6 233	6 527	6 625
Guatemala	(A/R)	3 835	3 950	3 840	3 743	3 159	3 500
Honduras	(A)	3 603	4 331	5 903	4 537	4 568	4 650
India	(R/A)	4 806	4 728	4 921	4 977	5 075	5 746
Indonesia	(R/A)	11 380	9 129	7 288	13 048	11 667	9 000
México	(A)	4 109	4 001	4 563	4 327	3 916	4 000
Nicaragua	(A)	1 871	1 634	2 193	1 890	2 017	2 000
Uganda	(R/A)	2 845	3 203	2 817	3 698	3 665	4 000
Vietnam	(R/A)	17 825	20 000	26 500	25 000	27 500	27 500

A: *arabica*

R: *robusta*

(“International Coffee Organization,” 2014)

En cuanto a la exportación, la cantidad de café exportado ha sido, en promedio, de 90 millones de sacos de 60 kg por año, siendo Brasil el mayor exportador con una participación del 28 % en el mercado. El consumo mundial durante los últimos cuatro años ha mostrado una tendencia a la alza en 142 millones de sacos en el año 2012 en comparación con 139 millones de sacos en el año 2011, esto se atribuye al crecimiento del consumo interno en países en desarrollo y el consumo de exportación en los mercados emergentes (International Coffee Organization, 2014).

II.1.3 Composición química

La cafeína es el componente más conocido presente en los granos de café. En el café arabica verde, la cafeína puede encontrarse en valores que varían entre 0.8 y 1.4 % (p/v), mientras que para la variedad robusta estos valores varían entre 1.7 y 4.0 % (p/v). Sin embargo, el grano de café está constituido por otros componentes entre los que se encuentran la celulosa, minerales, azúcares, lípidos,

taninos y polifenoles. Dentro de los minerales se incluyen: potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso, rubidio, zinc, cobre, estroncio, cromo, vanadio, bario, níquel, cobalto, plomo, molibdeno, titanio y cadmio. Entre los azúcares, sacarosa, glucosa, fructosa, arabinosa, galactosa y manosa están presentes. Varios aminoácidos tales como: alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina también se pueden encontrar en estos granos. Así mismo, los granos de café contienen vitaminas del complejo B como la vitamina B3 y B5. También se puede encontrar el ácido clorogénico en proporciones que pueden variar de 7 a 12 %, es decir, tres a cinco veces más que la cafeína. En la Tabla 2 se muestra la composición química de los granos de café de las variedades arabica y robusta (Belitz, 2009; Grembecka *et al.*, 2007; Santos y De Oliveira, 2001).

Tabla 2. Composición química de los granos de café

Constituyente	Arabica *	Robusta*	Componentes
Carbohidratos solubles	9-12.5	6-11.5	
Monosacáridos	0.2-0.5		Fructosa, glucosa, galactosa y arabinosa (trazas)
Oligosacáridos	6-9	3-7	Sacarosa (>90%), rafinosa (0-0.9%) y estaquiosa (0-0.13%)
Polisacáridos	3-4		Polímeros de galactosa (55-65%), manosa (10-20%), arabinosa (20- 35%) y glucosa (0-2%)
Polisacáridos insolubles	46-53	34-55	
Hemicelulosa	5-10	3-4	Polímeros de galactosa (65-75%), arabinosa (25-30%) y manosa (0- 10%)
Celulosa β (1-4) mananos	41-43	32-40	
Ácidos y fenoles			
Acidos volátiles	0.1		
Ácidos alifáticos no volátiles	2-2.9	1.3-2.2	Ácidos cítrico, málico, quínico
Ácido clorogénico	6.7-9.2	7.1-12.1	Ácido dicafeoyl y feruloylquinico
Lignina	1-3		
Lípidos	15-18	8-12	
Cera	0.2-0.3		
Aceite	7.7-17.7		Principales ácidos grasos: 16:0 y 18:2 (9,12)

Compuestos nitrogenados	11-15		
Aminoácidos libres	0.2-0.8		Principales aminoácidos: Glutamina, y asparagina
Proteínas	8.5-12		
Cafeína	0.8-1.4	1.7-4.0	Trazas de teobromina y teofilina.
Trigonelina	0.6-1.2	0.3-0.9	
Minerales	3-5.4		

* Valores en % de sólidos
(Belitz, 2009)

Entre las sustancias presentes en la composición química de café, sólo la cafeína es termoestable, es decir, no se destruye por un tostado excesivo. Otras sustancias tales como proteínas, azúcares, CGA, trigonelina y grasas se pueden conservar o incluso ser destruidos y transformados durante el proceso de tostado de café (Rawel y Kulling, 2007; Ginz *et al.*, 2000).

II.1.4 Subproductos

Debido a que el café es el segundo producto más comercializado en el mundo y teniendo en cuenta que casi el 50 % de la producción mundial de café se procesa para el café soluble, la industria del café es responsable de la generación de gran cantidad de residuos. En la última década, el uso de este tipo de residuos ha sido objeto de varios estudios (Nabais *et al.*, 2008). Dentro de los subproductos de café encontramos la pulpa de café, cascara de cereza, piel de pergamino, película plateada y el café usado, siendo los últimos dos los principales subproductos de esta industria. La película plateada de café es obtenida como un subproducto del proceso de tostado; éste es un residuo con una alta concentración de fibra dietaria soluble (86 % de fibra dietética total) y con alta capacidad antioxidante, probablemente debido a la concentración de compuestos fenólicos en los granos de café, así como a la presencia de otros compuestos formados por la reacción de Maillard durante el proceso de tostado, tales como melanoidinas. El CU es un residuo obtenido durante el tratamiento de polvo del café molido con agua caliente o vapor para la preparación de café instantáneo (Ramalakshmi *et al.*, 2009; Tokimoto *et al.*, 2005).

Algunos de los subproductos de la industria del café no son desechados correctamente, convirtiéndose en una preocupación ambiental debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos con diversas propiedades funcionales. Tradicionalmente los residuos se han considerado como desechos, o en algunas ocasiones se han utilizado como fertilizante. Durante las últimas décadas, a nivel industrial se ha buscado desarrollar diversas aplicaciones para darle un valor agregado a los subproductos del café, provenientes del fruto tostado (la pulpa de café, la cascara y la testa) y del café soluble (café usado) (Esquivel y Jiménez, 2012). Debido a esto, la gestión de los residuos de café ha sido el centro de acontecimientos recientes, con el objetivo de implementar enfoques tanto ecológicos, como en el desarrollo de alternativas de valor agregado (Mussatto, Machado, *et al.*, 2011c). Los residuos de café han demostrado un enorme potencial de reutilización para diversas aplicaciones, incluso mayor que la esperada debido a su mayor riqueza en componentes nutritivos y bioactivos (Bravo *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2012).

Desafortunadamente más del 50 % de la fruta del café no se utiliza para la producción del mismo; estos desechos se han utilizado en la industria, principalmente en la producción de energía, la adsorción de compuestos y la fabricación de productos industriales, tales como tableros de partículas, etanol, ácido giberélico y α -amilasa. Extractos comercializados a partir de los frutos de café, que contienen proantocianidinas, ácido clorogénico, es decir, ácido quínico y ferúlico, han mostrado resultados interesantes en el cuidado de la piel del rostro. Sin embargo, a pesar de los altos niveles de compuestos fenólicos y fitonutrientes del fruto del café, el progreso en su uso como ingrediente funcional es limitado (Heimbach *et al.*, 2010; Franca *et al.*, 2009a; Franca *et al.*, 2009b; Kondamudi *et al.*, 2008; Farris, 2007).

La cascara de café obtenida de un procesamiento en seco, compuesta de la piel exterior del fruto del café, la pulpa y el pergamino, es rica en hidratos de carbono (35 %), proteínas (5.2 %), fibras (30.8 %) y minerales (10.7 %). Debido a los factores antifisiológicos y/o antinutricionales (por ejemplo, taninos, cafeína, polifenoles, ácido clorogénico, cafeico, entre otros) de estos subproductos, no han

sido de uso directo para la alimentación animal. Sin embargo, cáscaras de café, piel y pulpa, pueden ser una fuente de fitoquímicos para las industrias alimentaria y farmacéutica (Orozco *et al.*, 2008; Brand *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2000).

Los restos de película plateada, adherida a los granos de café verde, son eliminados durante el tostado. Este subproducto puede ser utilizado en plantas de café tostado como combustible o para compostaje. Además, diversos estudios han encontrado a este subproducto como un ingrediente funcional, pues posee cantidades bajas de grasa e hidratos de carbono, pero altos contenidos de fibra dietaria soluble (Belitz, 2009).

Otra preocupación ambiental, son aquellos granos eliminados debido a la baja calidad, es decir, aquellos que presentan imperfecciones como el color negro o marrón oscuro, daños por insectos, manchas, frutos inmaduros, entre otros, los cuales a través de diversos estudios han demostrado actividad antioxidante, antitumoral y una limitada acción antiinflamatoria y antialérgica, debido a la presencia de cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos (Franca *et al.*, 2009b; Ramalakshmi *et al.*, 2009; Kondamudi *et al.*, 2008).

II.2 Café usado

II.2.1 Generalidades

El café usado (CU) es un residuo con tamaño de partícula fino, alta humedad (80 % a 85 %), carga orgánica, y acidez; este se genera en grandes cantidades, con una representación mundial de 6 millones de toneladas anuales. Numéricamente, 1 tonelada de café verde genera alrededor de 650 kg de café usado, y alrededor de 2 kg de CU húmedo se obtienen por cada kilo de café soluble producido (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

El CU obtenido del café tostado y molido, a través de filtración y percolación por goteo de agua caliente, ha tenido diversas aplicaciones, tales como sustrato para el cultivo de hongos, en composta, en la eliminación directa de colorantes, para la alimentación animal, como combustible en calderas industriales para la cogeneración de calor y/o electricidad, biodiesel, además como adsorbente y

precursor en la producción de carbón activado, así como para extracción de antioxidantes y otros compuestos bioactivos (Murthy y Naidu, 2012; Mussatto, Machado, *et al.*, 2011c). En diversos estudios han mostrado actividad antioxidante y antitumoral y una limitada acción antiinflamatoria y antialérgica. Las propiedades antioxidantes podrían ser consecuencia de la presencia de cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

II.2.2 Composición química

La composición química del café usado se muestra en la Tabla 3, en donde se puede observar que es un producto rico en fibra (Mussatto *et al.*, 2011b).

Tabla 3. Composición química del café usado

COMPONENTE	Contenido en base seca (g/100g)
Celulosa (glucosa)	8.6
Hemicelulosa	36.7
Xylosa	0.0
Arabinosa	1.7
Galactosa	13.8
Manosa	21.2
Lignina	23.90
Insoluble	17.59
Soluble	6.31
Grasa	2.29
Cenizas	1.6
Proteína	13.6
Nitrógeno	2.3
Fibra dietaria total	60.46
Insoluble	50.78
Soluble	9.68

(Adaptado de: Ballesteros *et al.*, 2014; Mussatto *et al.*, 2011b)

El CU es un residuo rico en polisacáridos en las estructuras de celulosa y hemicelulosa, que corresponden a casi la mitad del peso seco. La hemicelulosa se compone de tres azúcares, manosa (siendo el más abundante), seguido por galactosa y pocas cantidades de arabinosa. La composición de los azúcares en el

CU es de alrededor de un 46.8 % de manosa, seguido por 30.4 % de galactosa, 19.0 % de glucosa, y 3.8 % de arabinosa. Sin embargo existen diferencias en la composición química de CU, lo cual se puede producir debido a la variedad de los granos utilizados y a los procesos de tostado y extracción. La lignina también es una fracción presente en una cantidad significativa en el CU; esta es una macromolécula compuesta de una gran variedad de grupos funcionales como hidroxilo fenólico, hidroxilo alifático, metoxilo, carbonilo, y sulfonatos, sin embargo, el ácido clorogénico, caféico y cumárico son los componentes de lignina más relevantes de café. Además de polisacáridos, CU también contiene cantidades significativas de proteína con un 13.6 (p/v); además se ha demostrado que el contenido de proteína es mayor en CU que en los granos de café, ya que durante el proceso de café instantáneo muchos de los otros componentes del grano se extraen, y, como consecuencia, los componentes no extraídos se concentran en el material sólido residual (Arya y Rao, 2007).

La fibra dietética incluyendo celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pécticas, gomas, mucílagos se conoce como la parte comestible de plantas que es resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con la fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Es importante destacar que tanto la fibra soluble como la insoluble posee propiedades específicas. La fibra soluble tiene la capacidad de retención del agua, promueve la creación de la flora bacteriana, y disminuye la absorción de grasas y azúcares; en cambio la fibra insoluble tiene baja retención de agua, acelera el movimiento de los alimentos a través del sistema digestivo, y promueve la regularidad heces. El CU tiene altos valores tanto de fibra soluble como de insoluble, por lo que este tiene un gran potencial para ser utilizado como materia prima en el desarrollo de alimentos funcionales (Ballesteros *et al.*, 2014).

El CU también contiene cenizas, las cuales, están constituidas por varios minerales, siendo el potasio el elemento más abundante, seguido por el fósforo y el magnesio (Tabla 4) (Ballesteros *et al.*, 2014; Mussatto *et al.*, 2011b).

Tabla 4. Composición mineral del café usado

MINERALES	Contenido (mg/kg)
Potasio	3549
Fosforo	1475.1
Magnesio	1293.3
Calcio	777.4
Aluminio	279.3
Hierro	118.7
Magnesio	40.1
Cobre	32.3
Zinc	15.1

(Adaptado de: Ballesteros *et al.*, 2014; Mussatto *et al.*, 2011b)

II.2.3 Compuestos bioactivos

Millones de tazas de café se consumen cada día en todo el mundo produciendo grandes toneladas de CU. Tradicionalmente este subproducto había sido considerado como desperdicio, aunque en algunas ocasiones había sido utilizado como fertilizante. A través del paso de los años a nivel industrial se han propuesto diversas aplicaciones para darle un valor agregado a este subproducto (Esquivel y Jiménez, 2012; Murthy y Naidu, 2010). El CU originado de la preparación de una taza de café contiene grandes cantidades de compuestos bioactivos, tales como el CGA y la cafeína, sin embargo, cantidades limitadas de estos compuestos permanecen en el CU, estos podrían ser extraídos con disolventes, como el etanol, metanol, etc.; así mismo la cantidad de los compuestos es afectada por los factores tecnológicos, ambientales, entre algunos otros (Mussatto *et al.*, 2011a; Ramalakshmi *et al.*, 2009; Andueza *et al.*, 2003).

La demanda de productos alimenticios libres de aditivos o con valores agregados nutricionales, induce a la industria de alimentos a encontrar nuevas fuentes de antioxidantes y compuestos bioactivos; es por esto que el CU se ha convertido en una fuente de compuestos bioactivos, entre ellos encontramos el ácido cafeoilquínico, cafeína y melanoidinas (Bravo *et al.*, 2012).

La presencia de compuestos antioxidantes en el CU, como los ácidos clorogénicos (CGAs), cafeína y productos de la reacción de Maillard, han sido ampliamente asociados con los efectos benéficos del café, tales como la prevención

de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas y actividades anticancerígenas y antimutagénicos. Además de estas propiedades saludables, la capacidad antioxidante puede contribuir a la preservación de café contra el daño oxidativo durante todo el tiempo de almacenamiento (Bravo *et al.*, 2012).

II.2.3.1 Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol y un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. Los compuestos fenólicos son componentes omnipresentes de plantas superiores encontrándose en una amplia variedad de alimentos vegetales de consumo habitual, como frutas, verduras, cereales y legumbres, y en las bebidas de origen vegetal, como el vino, el té y el café (Cheynier, 2005; Manach, 2004). Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas en general involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por agentes patógenos (Murthy *et al.*, 2012). Varios compuestos fenólicos se han descrito en los alimentos vegetales y pueden ser agrupados en diferentes clases según su estructura química básica (como el tipo y el número de anillos de fenol), en diferentes subclases, de acuerdo con sustituciones específicas en la estructura, la asociación básica con hidratos de carbono y formas polimerizadas (Cheynier, 2005; Manach *et al.*, 2004).

Los granos de café verde contienen gran cantidad de compuestos fenólicos, CGAs, caféico, cumárico entre otros, que al tostarse, se ve afectada la composición de estos fenoles debido a las reacciones de Maillard, contribuyendo en el sabor y aroma, además de originar compuestos como las melanoidinas, pigmentos que confieren el color característico del café. Es por esto que una buena fuente de compuestos fenólicos, es el café debido a la presencia de compuestos, CGA, éster del ácido caféico y el ácido quínico. Sin embargo, los niveles varían principalmente como consecuencia del tostado, encontrando que el café al ser rico en compuestos fenólicos contiene entre 200-500 mg por taza (Moon *et al.*, 2009; Richelle *et al.*, 2001; Powrie *et al.*, 1986). De acuerdo con estudios realizados, la actividad

antioxidante del café está potencialmente relacionada a su alto contenido de compuestos fenólicos (Cämmerer y Kroh, 2006).

En la Figura 2 se muestra la estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en el grano.

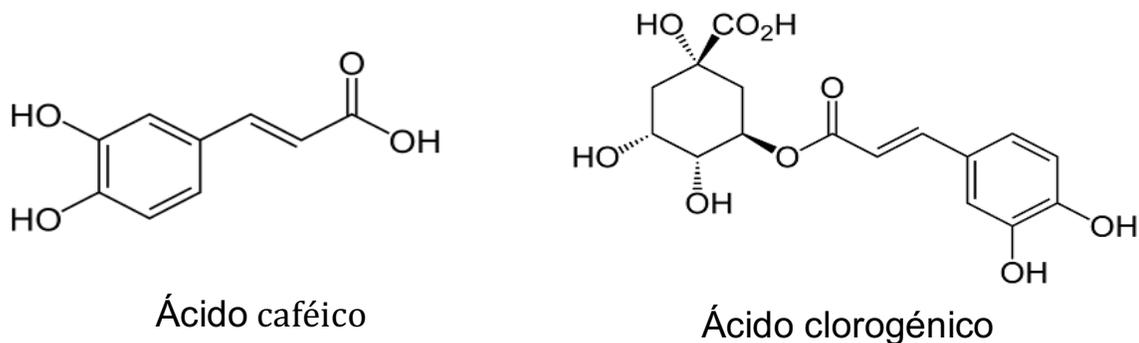


Figura 2. Estructura de compuestos fenólicos

(Examine, 2015)

La concentración y composición de los compuestos fenólicos en el café dependen de las condiciones de procesamiento, principalmente la etapa de molienda del grano, en la cual se produce el aroma, sabor y color característicos de estos compuestos. De igual forma, factores genéticos (especie y variedad), aspectos fisiológicos (grado de maduración), condiciones ambientales (clima, composición del suelo y prácticas agrícolas) tienen gran influencia en la composición de los compuestos fenólicos (Paquin, 2009; Farah y Donangelo, 2006). Además la temperatura, presión, proporción de agua y tiempo de contacto durante la extracción de los compuestos hidrosolubles, son las principales variables asociadas a la calidad final de estos compuestos en la bebida (Andueza *et al.*, 2003).

Estudios han encontrado que el CU posee una menor concentración de compuestos fenólicos en comparación con los granos de café tostado y molido, esto se debe a la alta solubilidad de estos compuestos en el agua caliente. Además, se ha encontrado que el residuo seco presenta valores superiores de compuestos fenólicos con respecto al fresco, debido a la concentración de estos durante el

proceso de secado (Oliveira, 2011); sin embargo el CU puede contener cantidades importantes de compuestos bioactivos (Bravo *et al.*, 2012).

II.2.3.1.1 Perfil de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos a partir de subproductos del café (pulpa de café, cáscara, película plateada y CU) se han extraído por medio de una mezcla de disolventes de isopropanol y agua para la elaboración de alimentos de CU y otros subproductos del café (Murthy y Naidu, 2010). El CGA fue el principal componente fenólico al ser analizado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. De hecho, el mayor contenido de compuestos fenólicos se encuentran principalmente en los granos de café verde como lo son el CGA (aproximadamente 12% de sólidos) (Esquivel y Jiménez, 2012). Además, los compuestos fenólicos antioxidantes del CU han sido extraídos por el método de sólido-líquido convencional. Por ejemplo, la extracción con 60 % de metanol (40 ml / g CU disolvente / relación sólido, 90 min) produce un extracto fenólico elevado (16 mg de equivalentes de ácido gálico / g CU) con alta actividad antioxidante de forma simultánea (Mussatto *et al.*, 2011a).

Los ácidos cafeoilquínicos (CQA, por sus siglas en inglés) son los compuestos fenólicos más abundantes en el café. Estos CGAs son ésteres solubles en agua formados entre ácido quínico y uno o dos restos de ácido caféico. Ácidos monocafeoilquínico (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA) y ácidos dicafeoilquínico (3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA) han sido identificados en el CU (Bravo *et al.*, 2012).

El CU contiene cantidades relevantes del total de CQA para los diferentes tostados de café, en este, 5-CQA y 3,4-diCQA son los ácidos cafeoilquínico más abundantes, mientras que 3,5 diCQA y 3-CQA los menos abundantes (Bravo *et al.*, 2012).

En la Tabla 5 se muestra el perfil de compuestos fenólicos del CU, tanto para café arábica y robusta (Bravo *et al.*, 2012).

Tabla 5. Compuestos fenólicos presentes en el café usado

		Especies de cafeto	Contenido (mg/g)
Ácido Caffeoilquínico	3-CQA	Arabica	1.64
		Robusta	0.68
	4-CQA	Arabica	2.51
		Robusta	0.97
	5-CQA	Arabica	3.59
		Robusta	1.26
	Total CQAs	Arabica	7.74
		Robusta	2.91
	3,4-diCQA	Arabica	2.53
		Robusta	1.49
	3,5-diCQA	Arabica	1.17
		Robusta	0.62
	4,5-diCQA	Arabica	1.8
		Robusta	1.2
Total diCQAs	Arabica	5.5	
	Robusta	3.31	
Total CQAs+diCQAs	Arabica	13.24	
	Robusta	6.22	

(Bravo *et al.*, 2012)

En cuanto a variedad de café, *Coffea robusta* muestra mayor cantidad de polifenoles en relación con el *Coffea arabica*, su contenido se puede reducir en un 60-98 % en el proceso de tostado claro u oscuro, respectivamente (Chu, 2012; Ky *et al.*, 2001). Campos-Vega *et al.*, (2015) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos reportando que el tostado del café influye en su composición, debido a que el contenido de compuestos fenólicos disminuyó significativamente, excepto con los flavonoides. Esto corresponde con el contenido del compuesto fenólico, CGA, para los extractos de café soluble tanto para tostado medio y tostado oscuro (Vignoli *et al.*, 2011).

II.2.3.1.2 Metabolismo de los compuestos fenólicos

En condiciones *in vivo*, los polifenoles de la dieta tienen que ser extraído después de la digestión gastrointestinal. La naturaleza de fitoquímicos extraíbles, su estabilidad y su actividad antioxidante depende de muchos factores, tales como la matriz del alimento, pH, temperatura, presencia de inhibidores o potenciadores de la absorción, la presencia de enzimas, huésped, y otros factores relacionados (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Los modelos animales se han utilizado para examinar el destino metabólico del ácido 5-caffeoilquínico (5-CQA), siendo el ácido clorogénico más importante en el café. Algunos estudios sugieren una absorción temprana del CGA en el estómago o una absorción en la porción intestinal inicial, seguido por la absorción a través del intestino delgado. La absorción de 5-CQA y otros compuestos fenólicos, tales como ferúlico, p-cumárico, gálico, y caféico, se ha reportado en ensayo utilizando ratas. Además, se ha demostrado que el 5-CQA y el ácido caféico se absorben en el intestino delgado, preferentemente en el yeyuno. (Konishi *et al.*, 2006; Lafay *et al.*, 2006b; Spencer *et al.*, 1999). Los CGA, son poderosos antioxidantes *in vitro* y se cree que proporcionan muchos beneficios para la salud. El ácido caféico es absorbido en el intestino delgado y la mayor parte del CGA (alrededor de dos tercios) alcanza el colon, donde es hidrolizado por esterasas de microbiota colónica en ácidos caféico y quínico. Se sugiere que los productos resultantes ejercen interacciones con las células de la mucosa del intestino distal, como sucede con otros compuestos fenólicos (Couteau *et al.*, 2001; Rechner *et al.*, 2002; Stalmach *et al.*, 2010)

Tras el consumo, los metabolitos de café aparecen en el plasma sanguíneo en dos fases de tiempo: 30 min a 2 h y luego 8-12 h después de la ingestión (Lafay *et al.*, 2006a). Esto indica que los metabolitos y los polifenoles de café son absorbidos inicialmente en el estómago y el intestino delgado durante la primera fase, para más tarde ser fermentados por las microbiota intestinal y absorbidos en el colon durante la segunda fase; alrededor del 70 % de CGA presente en una taza de café alcanza el colon (Lafay *et al.*, 2006a; Redeuil *et al.*, 2011). En ratas, la detección de ácido clorogénico en la orina fue <1 % de la dosis ingerida, lo cual

indica que no es una importante vía de excreción de compuestos CGA (Lafay *et al.*, 2006a). Diversos metabolitos presentes en el colon representan el 57 % de la ingesta de CGA, lo cual indica que la biodisponibilidad del ácido clorogénico depende en gran medida de su metabolismo por la microbiota colónica (Gonthier *et al.*, 2003).

El colon es importante en el metabolismo de CGA, siendo el sitio de acción de conversión del ácido felúrico a feruloilglicina y ácido dihidroferúlico y para el metabolismo de ácido caféico a ácido dihidrocaféico, que se convierte después en dihidro (iso) ácido ferúlico (Stalmach *et al.*, 2010).

Por lo tanto, la capacidad del proceso digestivo para liberar los compuestos fenólicos de la matriz del alimento (es decir, bioaccesibilidad) puede ser el primer paso para determinar la absorción de estos compuestos. Por lo tanto, el uso de la digestión *in vitro* y los modelos de fermentación en el colon puede ayudar a proporcionar una visión útil en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del CU y los factores que determinan su disponibilidad (Campos-Vega *et al.*, 2015).

II.2.3.1.3 Efectos sobre la salud

Recientemente, el interés por los productos naturales derivados de plantas ha ido aumentando, debido a que los antioxidantes sintéticos presentan varios inconvenientes. Sin embargo el CU contiene varios compuestos relacionados con la salud humana, entre ellos los compuestos fenólicos, los cuales han demostrado actividad antioxidante, antibacterial, antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena (Souza *et al.*, 2004).

La mayoría de los compuestos fenólicos, debido principalmente a su actividad antioxidante, han recibido gran interés pues se han relacionado con efectos benéficos sobre la salud humana, como es, la protección contra las enfermedades crónicas degenerativas, entre ellas cataratas, degeneración macular, enfermedades neurodegenerativas, diabetes mellitus, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, e incluso neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Farah y Donangelo, 2006; Scalbert *et al.*, 2005). En un estudio se mostro que los

compuestos fenólicos y CGAs, producidos a partir del CU mostraron actividades antitumoral y anti-alérgica (Bravo *et al.*, 2012). De hecho, el CGA, posee propiedades benéficas para la salud relacionados con su potente actividad antioxidante, entre ellas: hepatoprotector, hipoglucémico, anti-bacterial, antiviral, anti-inflamatoria y anti-cancerígeno (Murthy y Naidu, 2010; Ramalakshmi *et al.*, 2009; Scalbert *et al.*, 2005; Rice-Evans, *et al.*, 1997).

Estudios demuestran que el metabolismo y la composición, tanto de CGA, así como las melanoidinas del café, presentan gran influencia en la protección del colon. El mecanismo benéfico más importante es la capacidad del café para aumentar la motilidad del colon, aumentando así la producción de heces y el aumento de la velocidad de eliminación (Vitaglione *et al.*, 2012). También se observó que mejora el equilibrio de la microbiota induciendo la mejora de sensibilidad de la insulina y como consecuencia una pérdida de peso debido a la consecuente reducción de la deposición de grasa (Pendyala *et al.*, 2011; Cani *et al.*, 2009). Así mismo se ha observado un menor riesgo de diabetes tipo 2, a pesar de que el consumo de cafeína de forma aguda baja la sensibilidad a la insulina y el aumento de las concentraciones de glucosa (Pusatcioglu y Braunschweig, 2011; Musso *et al.*, 2010).

II.2.3.2 Fibra dietaria

II.2.3.2.1 Generalidades y consumo de fibra en México

La fibra dietética es la parte comestible de plantas o los carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Esta incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociada que resisten la hidrólisis por los enzimas digestivas humanas, pero que pueden ser fermentadas por la microflora colónica, y/o excretadas parcialmente por las heces; además promueven efectos fisiológicos beneficiosos incluyendo el efecto laxante, y/o atenuación de colesterol en la sangre (AACC, 2001).

De acuerdo con FAO, la recomendación diaria de fibra dietética total para adultos es de 25 g/día. El intervalo de recomendaciones entre diversos países del mundo se encuentra alrededor de 21-40 g/día (FAO, 2004).

La fibra dietaria se puede definir como un grupo heterogéneo de compuestos no digeribles, incluyendo la fibra (soluble e insoluble), el almidón resistente, y oligosacáridos tales como rafinosa, estaquiosa, mucilaginosos, entre otros (Escudero y González Sánchez, 2006).

Tanto los alimentos sólidos como las bebidas pueden contribuir a la ingesta de fibra dietaria, como es el caso de las bebidas de café que contienen polisacáridos no digeribles que son parte del complejo de fibra dietética (Nunes y Coimbra, 2001; Navarini *et al.*, 1999). Los polisacáridos, arabinogalactano específicamente tipo II y galactomanano, se han identificado en el café. Debido a que son en gran medida indigestible, se consideran fibra dietética; estos galactomananos y arabinogalactanos ingeridas con las bebidas de café incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas que no se degradan por las enzimas digestivas humanas (AACC, 2001). Por lo tanto, alcanzan el colon y potencialmente sirven como sustratos para la microbiota colónica (Gniechwitz *et al.*, 2007). Una alta ingesta de fibra dietética está relacionada positivamente con varios efectos fisiológicos y metabólicos, como la disminución del colesterol en sangre, la moderación de la glucosa en sangre y la respuesta a la insulina (Delaney *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 1976).

A pesar de que en México existen alimentos disponibles y accesibles que forman parte de la cultura alimentaria y que son altos en fibra, los mexicanos consumen menos de la mitad de la cantidad diaria recomendada de este nutriente. En los últimos años se ha informado que la población mexicana presenta obesidad, sobrepeso, mortalidad por enfermedades crónicas; es por esto que se ha asociado a la fibra con el índice de masa corporal y la importancia de un consumo regular de esta, pues ayuda a disminuir la presencia de enfermedades cardiovasculares y gastrointestinales, así como controlar y reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol y glucosa, así como disminuir el riesgo de padecer diabetes (Rivera *et al.*, 2002; Niclas *et al.*, 1995).

II.2.3.2.2 Fibra dietaria antioxidante

El CU es una fuente de fibra dietética pues contiene compuestos como celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas, y lignina (Murthy y Naidu, 2010). Las fibras de café expresaron propiedades antioxidantes. La sinergia de la actividad antioxidante y el complejo de fibras de los subproductos de café, CU, atribuyen efectos beneficiosos en comparación con cualquier fibra (Murthy y Naidu, 2010; Saura-Calixto, 1998).

Se le conoce a la fibra dietaria antioxidante como aquellos subproductos naturales que son ricos tanto en fibra dietaria como en compuestos fenólicos, entre algunos otros; por lo tanto los subproductos del café, como el CU, han traído gran interés ya que esta combinación de compuestos puede reflejarse en propiedades antioxidantes, que confieren beneficios adicionales a la salud (Murthy y Naidu, 2010; Saura-Calixto, 1998).

II.2.3.2.3 Clasificación fibra dietaria

Tradicionalmente la fibra ha sido clasificada en dos categorías, soluble e insoluble; las fibras solubles en contacto con el agua forman un retículo donde queda atrapada, originándose soluciones de gran viscosidad. Los efectos derivados de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en parte su potencial anticarcinogénico (Escudero y González, 2006). Las fibras insolubles o poco solubles como su nombre lo dice, no se disuelve en agua, se encarga de acelerar el movimiento de los alimentos a través del sistema digestivo (García *et al.*, 2002). Esta fibra es capaz de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad lo que provoca un aumento de la masa fecal acelerando el el tránsito intestinal; es por esto que la fibra insoluble se utiliza en el tratamiento y prevención de la constipación crónica. Por otra parte también contribuye a disminuir la concentración y el tiempo

de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon (Escudero y González, 2006; Kim, 2000).

Sin embargo tomando en cuentas las características químicas y funcionales de la fibra Ha *et al.*, (2000) clasifican a la fibra en:

- Polisacáridos no almidón, donde el almidón digerido y absorbido en el intestino delgado es un polisacárido, por ello se utiliza el término polisacáridos no almidón para aquellos que llegan al colon y poseen los efectos fisiológicos de la fibra, estos se pueden clasificar en celulosa, β -glucanos, hemicelulosas, pectinas y análogos, gomas y mucílagos.
- Oligosacáridos resistentes los cuales son hidratos de carbono con un nivel de polimerización menor, tienen de tres a diez moléculas de monosacáridos.
- Ligninas, estas no son un polisacárido sino polímeros que resultan de la unión de varios alcoholes fenilpropílicos; contribuyen a dar rigidez a la pared celular haciéndola resistente a impactos y flexiones. Además, estas no se digieren ni se absorben, así como tampoco es atacada por la microflora bacteriana del colon.
- Sustancias asociadas a polisacáridos no almidón: Son la suma del almidón y de sus productos de degradación que no son absorbidos en el intestino delgado de los individuos sanos.
- Hidratos de carbono sintéticos son aquellos que son sintetizados artificialmente pero que tienen características de fibra dietética.
- Fibras de origen animal, estas son sustancias análogas a los hidratos de carbono que se encuentran principalmente en alimentos de origen animal.

García *et al.*, (2002) mencionan que los términos de fibra soluble/insoluble, fermentable/no fermentable y viscosa/no viscosa son inapropiados por lo que sugiere conceptos como fibra fermentable, soluble y viscosa y fibras escasamente

fermentables, insolubles y no viscosas, estos términos están relacionados con la composición de la fibra.

II.2.3.2.3.1 Oligosacáridos

Los hidratos de carbono se pueden clasificar según el grado de polimerización (GP) como oligosacáridos (GP entre 2 y 10 unidades de monosacáridos) y polisacáridos (GP más de 10 monosacáridos) tal y como indica la terminología de la IUB-IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (IUB-IUPAC, 1980). Además, se pueden clasificar según sus propiedades fisiológicas, entre ellas como digeribles o no digeribles (o no disponibles). Los no digeribles que están representados por el almidón resistente, polisacáridos no almidón (polisacáridos de las paredes celulares de las plantas, hemicelulosa, pectinas, gomas), y los oligosacáridos no digeribles los cuales muestran efectos fisiológicos y nutricionales (Delzenne y Roberfroid, 1994).

Los oligosacáridos no digeribles no se pueden hidrolizar debido a que el organismo carece de enzimas digestivas necesarias para este proceso, por lo que no pueden romper el enlace glucosídico β , lo que ocasiona que los oligosacáridos se comporten como fibras alimentarias solubles, ya que llegan íntegros al intestino grueso donde son fermentados por la flora del colon (Molis *et al.*, 1996; Tokunaga, Oku, y Hosoya, 1986). Además, los oligosacáridos no fermentables se clasifican en fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y sojaoligosacáridos (SOS), mostrando un efecto prebiótico en el ser humano (Crittenden y Playne, 1996), sin embargo los más estudiados son FOS y los GOS.

Entre los efectos fisiológicos de los oligosacáridos se encuentra su efecto bifidogénico, esto se refiere a la estimulación selectiva de un grupo limitado de bacterias beneficiosas (principalmente bifidobacterias y lactobacilos) en el colon humano. Sin embargo debido a la fermentación de los oligosacáridos en el colon, se observa un descenso de pH, además de un descenso de otros géneros bacterianos. Además, la fermentación de estos en el colon produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), tales como acético, propiónico y butírico, lactato y determinados gases (H_2 y CO_2) (Conesa *et al.*, 2004). El descenso en el pH provoca

el incremento en la producción de AGCC, siendo el acético el principal, seguido del propiónico y el butírico (Campbell *et al.*, 1997). También se ha descrito actividad bifidogénica mediante el empleo de inulina, observando cambios en grupos bacterianos como en un descenso del género *Bacteroides* (Gibson *et al.*, 2004).

Las α -galactosidasas son oligosacáridos de bajo peso molecular solubles, tales como rafinosa (trisacárido), estaquiosa, verbascosa y otros oligosacáridos formados por α - (1-6) galactosidasas vinculados a C-6 del resto de glucosa de la sacarosa (Dey, 1984). Algunos autores reportan que la presencia de oligosacáridos específicos en la nutrición humana o animal mejora la salud, fomentando el crecimiento de bifidobacterias, afectando positivamente las células intestinales y el sistema inmunológico (Roberfroid, 1998).

El CU es una buena fuente de fibra dietaria, sin embargo, hasta el momento no se encuentra reportado el contenido de oligosacáridos en este.

II.2.3.2.3.2 Melanoidinas

Las melanoidinas son estructuras poliméricas formadas en las últimas etapas de la reacción de Maillard, las cuales están presentes en muchos alimentos procesados térmicamente; estas reacciones se producen en los alimentos tratados con calor mediante una combinación irreversible de ácidos o proteínas de azúcar y aminoácidos; además estas son responsables del color del café (Fogliano y Morales, 2011; Morales, 2002). Los polisacáridos (principalmente galactomananos y arabinogalactanos), proteínas y ácidos clorogénicos contribuyen a la formación de melanoidinas de café (Illy y Viani, 1995).

Durante el tostado de los granos de café verde, los cambios químicos y estructurales, producen la formación de melanoidinas. Esto se explica por medio de cuatro propuestas diferentes; el primer modelo se basa en sustancias coloreadas de bajo peso molecular reticuladas con grupos amino libres de lisina o arginina en las proteínas (Hofmann, 1998). La segunda propuesta se basa en unidades de furano y / o pirroles que, a través de reacciones de policondensación, forman melanoidinas con unidades de repetición (Tressl *et al.*, 1998). Una tercera propuesta

se basa en un esqueleto construido a partir de productos de degradación de azúcar, formadas en las primeras etapas de la reacción de Maillard (Cämmerer y Kroh, 2006). La cuarta propuesta se basa en un esqueleto construido a partir de proteínas, reticulado por productos de las reacciones de Maillard; esta teoría se forma principalmente en los productos a base de cereales (Bekedam *et al.*, 2006). Las melanoidinas de café han sido investigadas debido a la alta tasa de formación y alta solubilidad en la bebida (Ames *et al.*, 1999; Bekedam *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2012).

Las melanoidinas de café se ha relacionado con una variedad de componentes químicos presentes en los granos de café verdes: sacarosa (después de la inversión), polisacáridos (galactomananos y arabinogalactanos), aminoácidos, proteínas (11s proteínas de almacenamiento y la pared celular), CGA, y sustancias formadas durante el tostado. Todos estos precursores podría aumentar la complejidad química y la heterogeneidad de melanoidinas de café (Nunes y Coimbra, 2007).

El tipo de extracción, la relación café/agua, la presión y el tamaño del grano influyen en la ingesta final de melanoidinas, a partir de una taza de café. Por lo tanto, el contenido de melanoidinas del café dependen de la intensidad de la potencia térmica: cuanto mayor es el tratamiento, mayor será la concentración (Bekedam *et al.*, 2006; Nunes y Coimbra, 2007).

En relación con la preparación del café, la mayor cantidad de melanoidinas se encuentra en café soluble (22.8 g en 100 g de café), mientras que la cantidad de melanoidinas en expreso es de 7.2 g en 100 g de café. Sin embargo, la ingesta diaria recomendada de melanoidinas oscila en 1 g por día (Borrelli *et al.*, 2002b; Fogliano y Morales, 2011).

Las melanoidinas del café, además de contribuir al color y las propiedades tecnológicas, tienen propiedades funcionales, como aportar capacidad antioxidante a los alimentos (Delgado-Andrade *et al.*, 2005) y la supresión de estrés oxidativo en las células (Goya *et al.*, 2007), propiedades quelantes de metales (Morales *et al.*, 2005), actividad antimicrobiana (Rufián-Henares y Morales, 2007a), modular enzimas quimiopreventivos (Somoza, 2005), entre otros. Además, se ha encontrado

que las melanoidinas tienen un papel relevante en el tracto gastrointestinal, pues éstas se fermentan en el colon y pueden actuar como fibra dietaria, modulando su población; es por esto que las melanoidinas pueden llegar a considerarse como fibra dietaria antioxidante desempeñando un papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares y en el control del cáncer colorrectal (Silván *et al.*, 2010). Además, se ha encontrado que un café rico en melanoidinas promueve el crecimiento de bifidobacterias (Borrelli *et al.*, 2005; Dell *et al.*, 2003; Gniechwitz *et al.*, 2007; Gökmen *et al.*, 2009).

Como se mencionó, las melanoidina contribuyen a la capacidad antioxidante y otras propiedades funcionales del café, debido a la presencia de compuestos fenólicos en su esqueleto (López-Galilea *et al.*, 2006; Rufián-Henares y Morales, 2007b). Bravo *et al.* (2012), evaluaron en el CU el contenido de melanodinas, encontrando 0.165 y 0.145 mg/g para las variedades arabica y robusta, respectivamente. Así mismo Yen *et al.* (2005) reportó valores menores de melanoidinas para el CU en comparación con el café tostado. Por lo tanto, aunque las melanoidinas y otros compuestos pueden actuar como antioxidantes, debido a sus menores cantidades en el café usado, su contribución a la capacidad antioxidante podría ser limitado (Bravo *et al.*, 2012).

II.2.3.3 Metabolismo de la fibra dietaria y efectos benéficos a la salud

La fibra es un elemento que pasa por el intestino delgado sin digerir para llegar al intestino grueso donde continúa para impartir su funcionalidad; teniendo efectos desde que inicia su camino en la boca hasta la digestión, pues participa en el recorrido de los alimentos por el tracto, aumentando así su volumen de los desecho. Para ser biodisponible, nutrientes distintos de fibra dietética deben desglosarse, solubilizarse, o modificarse para luego ser absorbidos a través de las paredes del intestino delgado para estar disponible para las funciones corporales (AACC, 2001). Además ocasiona la dilución del contenido colónico, un ritmo más rápido de paso por el intestino y cambios en el metabolismo colónico de minerales, nitrógeno y ácidos biliares; se cree que estos cambios son provocados por la fibra

que pasa a través del intestino sin digerir y de la retención de agua dentro de su estructura celular (Zarzuelo y Galvez, 2005). Es por esto que el colon es un órgano fundamental de la digestión de todos los nutrientes que escapan de la digestión de las enzimas digestivas, para esto la flora bacteriana produce enzimas capaces de digerir los carbohidratos y proteínas que no fueron absorbidos en el intestino delgado. Por lo tanto, la flora colónica tiene la función de llevar a cabo la fermentación de los sustratos no digeridos, entre ellos la fibra (Andoh *et al.*, 2003).

La fermentación colónica de la fibra da lugar a los AGCC logrando mantener la microbiota intestinal. Además la fibra estimula durante su fermentación, el crecimiento de ciertas bacterias intestinales, por lo que podría incluirse dentro de los alimentos probióticos, logrando así la prevención de ciertas enfermedades, entre ellas, el cáncer de colon (Conesa *et al.*, 2004). Además, un incremento en el consumo de fibra, tiene un efecto positivo en la salud gastrointestinal, pues un consumo de fibra reduce el tiempo de permanencia de los alimentos en el sistema digestivo, logrando evitar el estreñimiento. Así mismo la fibra ayuda a reducir la absorción de colesterol, así como reducción de la incidencia de la diabetes tipo 2 (García *et al.*, 2002; Roberfroid y Ph, 1993).

Por otro lado, las melanoidinas de café pueden ser consideradas una fibra dietética, pues llegan en su forma intacta al colon y están parcialmente fermentados por los microorganismos del colon. La cantidad de melanoidinas de café que alcanzan el colon se ha estimado recientemente en el intervalo de 0.5-2.0 g por día, por lo que la ingesta de melanoidinas de café podría contribuir de manera significativa a los beneficios para la salud (Morales *et al.*, 2012). Por lo tanto, debido a que las melanoidinas consumidas permanecen en el tracto gastro-intestinal, este puede ser un sitio clave para su acción antioxidante y biológica (Delgado-Andrade, 2014; Rufián-Henares y Morales, 2007a; Finot y Magnenat, 1981). Asimismo, Rufián-Henares y Morales (2007a) sugieren que la digestión gastrointestinal afecta en cierta medida la fracción de las melanoidinas mediante la mejora de la capacidad antioxidante de bajo peso molecular limitado a la estructura o por la liberación de nuevas estructuras del esqueleto melanoidina.

II.2.4 Capacidad antioxidante

En los últimos años, existen estudios que indican que los radicales libres inducen daño oxidativo a biomoléculas. Este daño ha sido implicado en el envejecimiento, en varias patologías humanas y entre otras enfermedades (Jones, 2008). Varios estudios indican que componentes activos de la dieta de frutas frescas, verduras y bebidas previenen estas enfermedades inducidas por radicales libres y protegiendo a los alimentos contra el deterioro oxidativo (Sies, 2010). Además de estas propiedades saludables, la capacidad antioxidante puede contribuir a la preservación de café contra el daño oxidativo durante todo el tiempo de almacenamiento. Estos efectos protectores se han atribuido a las especies antioxidantes, como los compuestos fenólicos, carotenoides, vitamina C y E, que eliminan los radicales libres (Galleano *et al.*, 2010).

La capacidad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes sustancias y muestras de alimentos con la capacidad de barrido o neutralizando los radicales libres. Esta capacidad esta relacionada con la presencia de compuestos capaces de proteger a un sistema biológico contra la oxidación (Pyrzynska y Pękal, 2013).

La alta capacidad antioxidante del café es atribuida a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente los CGA, cafeína, ácido ferúlico y ácido cumárico, además de los productos formados por la reacción de Maillard durante el tostado, principalmente melanoidinas, representando por las sustancias de mayor actividad antioxidante del café tostado (Andueza *et al.*, 2004). La actividad antioxidante del café tostado se puede mantener debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard (Budryn *et al.*, 2009).

En algunos estudios se ha encontrado que una cantidad de antioxidantes presentes en el café (30-51 %) se acompleja con la fibra, esto significa que algunos de los compuestos serán absorbidos en el intestino delgado, pero los unidos a la fibra sólo serán accesibles en el intestino grueso, después de que las bacterias

fermentan la fibra y los liberan, teniendo gran importancia para la salud del colon (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007).

El café es una de las fuentes más importantes de antioxidantes en la dieta occidental, Bravo *et al.*, (2012) reporta que en el CU utilizado para la preparación de la bebida se encuentra una mayor capacidad antioxidante con el café tostado medio que en los de café tostado oscuro. En la Tabla 6 se muestra la capacidad antioxidante del CU, proveniente de las variedades robusta y arabica, por el método de ABTS y DPPH.

Tabla 6. Capacidad antioxidante del café usado

		Capacidad ($\mu\text{mol Trolox/g}$)
ABTS	Arabica	215.12
	Robusta	167.24
DPPH	Arabica	112.06
	Robusta	74.09

(Bravo *et al.*, 2012)

Estos resultados muestran que ambos cafés muestran capacidad antioxidante relevante, donde se puede ver que el CU arabica muestra los valores mas altos. Estos se deben al equilibrio entre ácidos caffeoilquinico, más abundante en CU arabica; y la cafeína y melanoidinas, presente principalmente en el CU Robusta. Además se ha encontrado que la capacidad antioxidante de la bebida de café en comparación con el CU, tanto para el café arabica como el café robusta, es muy similar (Bravo *et al.*, 2012).

II.2.4.1 Métodos para determinar capacidad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en la medición de la capacidad antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar ésta frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical (Robards *et al.*, 1999).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Para esto existen diferentes compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) que son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos antioxidantes con el fin de captar los radicales libres generados (Prior y Cao, 1999; C. A. Rice-Evans *et al.*, 1996).

II.2.4.1.1 DPPH

El ensayo DPPH, 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo, es uno de los más populares, utilizado para poner a prueba la capacidad de los compuestos para actuar como captadores de radicales libres o donadores de hidrógeno y para evaluar la capacidad antioxidante de los alimentos. El radical DPPH es un radical orgánico de larga vida con un color morado oscuro. Es comercialmente disponible y no tiene que ser generado antes del ensayo como en otros ensayos de barrido. Cuando una solución del radical DPPH es mezclada con un antioxidante/compuesto reductor, su color cambia de púrpura a amarillo de la correspondiente hidracina. La capacidad reductora de los antioxidantes DPPH puede ser evaluada mediante un monitoreo de la disminución de la absorbancia entre 515 - 528nm donde la hidracina produce una solución amarilla o por la resonancia de espín electrón. La transferencia del electrón inicial se produce muy rápidamente y la transferencia del hidrógeno subsiguiente ocurre más lentamente, esto depende del enlace hidrógeno usado, como el metanol y etanol (Calliste *et al.*, 2001). La Figura 3 muestra la reacción del radical DPPH, observando hay una donación de hidrógenos para estabilizar a su forma reducida (Pyrzynska y Pękal, 2013).

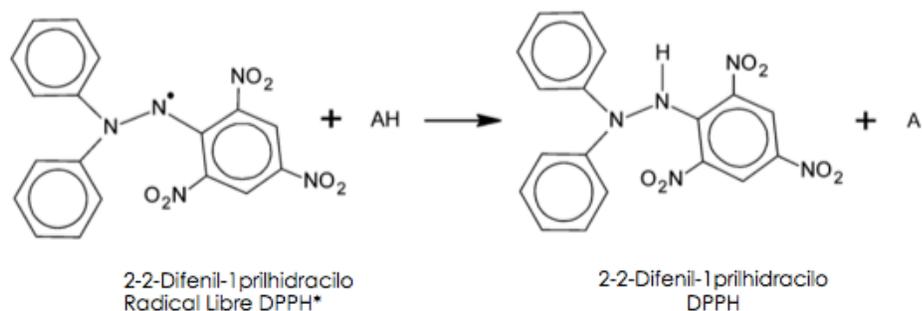


Figura 3. Estructura química del radical DPPH y su reacción con un agente de barrido.

(Pyrzynska y Pękal, 2013)

Una de las desventajas de este método es el tiempo necesario para realizar la medición, pues se realizan mediciones cada 10 minutos durante 90 minutos con el objetivo de comprobar la influencia del tiempo de medida en los valores actividad antioxidante. Por lo tanto, los valores obtenidos reflejan la cantidad y la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra en un determinado tiempo. Otra de las desventajas que se presenta en comparación con el método de ABTS, son los costos (Arnao, 2000; Kim *et al.*, 2002).

II.2.4.1.2 ABTS

El ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico), también conocido como ABTS, es un radical que tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina) o electroquímica. La técnica para la generación del ABTS•+ implica la producción directa del cromóforo azul / verde ABTS•+ a través de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio. La Figura 4 muestra la reacción de oxidación del ABTS por el persulfato de potasio para generar el radical catión ABTS • +.

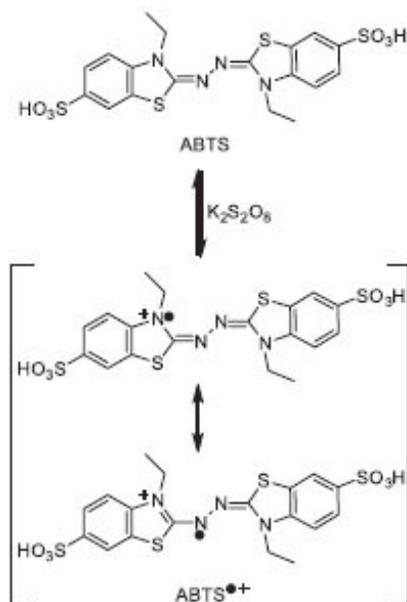


Figura 4. Estructura de ABTS

(Oliveira *et al.*, 2014)

El radical catión constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que se han aplicado para medir la actividad total de antioxidantes de las soluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas. Con este método se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. El radical ABTS tiene la ventaja de que su espectro que presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Arnao, 2000; Kuskoski *et al.*, 2004; Re *et al.*, 1999). La adición de antioxidantes para la formación del radical ABTS, dependen de la actividad antioxidante, la concentración de los antioxidantes y la duración de la reacción. Por lo tanto el alcance de la decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS • + se determina como una función de la concentración y el tiempo y se calculara en relación a la reactividad de Trolox como estándar, en las mismas condiciones (Re *et al.*, 1999).

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical ABTS es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy

estable, originando resultados reproducibles y coherentes. Además de que presenta varios máximos de absorción y una buena solubilidad (Imeh y Khokhar, 2002).

II.3 Salud gastrointestinal

II.3.1 Digestión gastrointestinal

El sistema digestivo humano comprende una serie de órganos y glándulas que procesan los alimentos. Para que el cuerpo utilice los alimentos que ingiere, éste tiene que romper el alimento en moléculas más pequeñas que puede procesar; así como excretar aquellos desechos que no son necesarios para el cuerpo (Guyton y Hall, 2001).

Guyton y Hall (2001) nos hablan del proceso digestivo, el cual comienza en la boca, en donde la comida se descompone por el proceso de masticación y la acción química de las enzimas salivales, rompiendo principalmente los almidones en moléculas más pequeñas. Después de ser masticado y tragado, la comida entra en el esófago. Este es un tubo largo que se extiende desde la boca hasta el estómago, además de que por medio de ondas peristálticas fuerza el paso de la comida desde la garganta hasta el estómago. En el estómago se encuentra la pepsina, enzima digestiva, que se segrega en el estómago y que hidroliza las proteínas en el estómago; ahí mismo la comida es mezclada con el ácido gástrico de modo que se forma el quimo. En el intestino delgado, la bilis (producida en el hígado y almacenada en la vesícula biliar), enzimas pancreáticas y otras enzimas digestivas, producidas por la pared interior del intestino delgado, ayudan en la descomposición de los alimentos; aquí algunos nutrientes individuales son absorbidos. Después de pasar a través del intestino delgado, el alimento pasa al intestino grueso, la última parte del sistema digestivo, una parte del agua y electrolitos se extraen de la comida. La microbiota colónica, que sufre alteraciones tanto endógenas como exógenas, contienen bacterias que mantienen una relación simbiótica en el hospedero, sin embargo la mayoría de las bacterias son benéficas ya que participan numerosos procesos fisiológicos, sin embargo también existen bacterias dañinas que pueden proliferar y causar malestares y enfermedades.

Durante el proceso de la digestión, los antioxidantes, la fibra dietaria y otros compuestos funcionales se transforman en compuestos con diferente bioaccesibilidad y actividad biológica, o puede ser que no sean liberados de los alimentos, lo que afectará el potencial antioxidante original de cada uno de estos componentes (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Por otra parte, hay que aclarar que para ejercer sus actividades biológicas, los compuestos fenólicos deben ser liberados de la matriz del alimento, ya sea por efecto de las enzimas digestivas y los cambios de pH, como por la fermentación bacteriana en el colon (Cerdá *et al.*, 2005; Saura-Calixto *et al.*, 2007). Por lo tanto, las propiedades biológicas de los polifenoles dietéticos pueden depender de su absorción en el intestino y su biodisponibilidad (Saura-Calixto *et al.*, 2007)

II.3.1.1 Bioaccesibilidad y permeabilidad

La bioaccesibilidad y la permeabilidad proporcionan información para obtener una indicación rápida de la absorción humana de un compuesto a partir de un producto. La permeabilidad proporciona una buena estimación de la absorción intestinal *in vivo* del compuesto, en cambio la bioaccesibilidad es una estimación más lenta, debido a que la absorción del compuesto no puede ser más rápida que la velocidad a la que el compuesto se libera de su matriz (Versantwoort *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta que la bioaccesibilidad se define como la cantidad de un componente del alimento que está presente en el intestino humano, como consecuencia de su liberación de la matriz del alimento, y que podría ser capaz de atravesar la barrera intestinal (Holst y Williamson, 2008; Saura-Calixto *et al.*, 2007). En cambio, la biodisponibilidad se define como la cantidad y velocidad a la que el principio activo se absorbe y llega al lugar de acción. Por lo tanto, para que un compuesto, como los fenólicos, sea potencialmente biodisponible, primeramente debe estar bioaccesible en el tracto gastrointestinal (Holst y Williamson, 2008; Shim *et al.*, 2009).

La liberación de un compuesto a partir de su matriz es un requisito previo a la absorción intestinal, es por esto, que la bioaccesibilidad de un compuesto debe

ser determinada en el intestino delgado, donde tiene lugar la absorción (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Tagliazucchi *et al.*, 2010). La biodisponibilidad integra procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (Holst y Williamson, 2008; Rodríguez-Amaya, 2010). La liberación de un compuesto a partir de su matriz comienza en la boca, este continúa en el estómago y en los intestinos delgado y grueso, convirtiéndose la liberación en el tracto gastrointestinal de un compuesto como un proceso complejo debido a todos los parámetros fisiológicos. Por lo tanto para obtener una buena bioaccesibilidad, el sistema *in vitro* debe de imitar la situación *in vivo* en el tracto gastrointestinal (Versantwoort *et al.*, 2000).

La bioaccesibilidad en el alimento y la biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal van a influir en el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos (Saura-Calixto *et al.*, 2010). La biodisponibilidad de cada compuesto fenólico en el tracto gastrointestinal es muy variada y puede depender de diversos factores como la fuente del alimento y las interacciones químicas con otros fitoquímicos y biomoléculas. De acuerdo a esto, los compuestos fenólicos pueden dividirse en dos grupos: biodisponibles en el tracto gastrointestinal humano y no biodisponibles o asociados a la fibra dietaria, entre los que se encuentran los polifenoles. Sin embargo, dependiendo de su tamaño y grado de conjugación sólo una parte de los compuestos fenólicos son capaces de atravesar la pared intestinal (Manach *et al.*, 2005; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009). Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, así como los polifenoles asociados a la fibra dietaria, no son absorbidos al intestino delgado, sino que llegan al colon para convertirse en sustratos fermentables para la microbiota colónica, junto con los hidratos de carbono digeribles y proteínas. Además es importante agregar que la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos se puede ver afectada por la fibra dietaria (Parada y Aguilera, 2007; Saura-Calixto *et al.*, 2010).

Existen diversos factores relacionados con la biodisponibilidad, como es el caso de la estructura química, tipo de enlace, preparación, características, procesamiento, actividad de la enzima, la genética, así como ciertas condiciones del organismo entre las que se encuentran la masa de la mucosa, el pH, tiempo de

transito intestinal, la tasa de vaciado gástrico y el metabolismo, entre otros (Holst y Williamson, 2008; Rodriguez-Amaya, 2010).

La permeabilidad de los compuestos puede ser dependiente de la posición debido a la diferente morfología y diferenciación de células de la mucosa hacia abajo el intestino por ejemplo, transportadores de aminoácidos y di/tripéptido se expresan en el yeyuno y el íleon, pero no en el colon (Versantwoort *et al.*, 2000).

II.3.1.2 Modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*

Los métodos de digestión *in vitro* han sido utilizados con la finalidad de analizar los cambios estructurales, la biodisponibilidad, la digestibilidad de los alimentos y la liberación de componentes de los alimentos, en condiciones gastrointestinales simuladas. Las moléculas biológicas más frecuentemente utilizadas, incluidas en los modelos de digestión, son enzimas digestivas (pancreatina, pepsina, tripsina, quimotripsina, peptidasa, α -amilasa y lipasa), sales biliares y mucina (Hur *et al.*, 2011). Diferentes enzimas se añaden secuencialmente a fin de simular los diferentes pasos del proceso digestivo (Boisen y Eggum, 1991).

Los modelos de digestión *in vitro* proporcionan una alternativa útil a los modelos animales y humanos mediante la evaluación rápida de los ingredientes alimentarios, pues estos proporcionarían resultados precisos en poco tiempo. La concentración y composición de enzimas también son factores muy importantes a considerar en el diseño de modelos de digestión *in vitro* (Coles *et al.*, 2005).

Varios de los factores que tienen influencia sobre los resultados de los métodos de digestión *in vitro* son: la actividad enzimática, la composición iónica, mecanismos de estrés aplicados y tiempos de digestión (Boisen y Eggum, 1991).

II.3.1.2.1 Digestión

El factor más importante en un sistema de digestión *in vitro* son las características de la enzima. Varios factores, tales como la concentración, temperatura, pH, estabilidad, activadores, inhibidores, y tiempo de incubación, afectan a las actividades enzimáticas (Boisen y Eggum, 1991).

Para llevar a cabo la digestión es necesario utilizar las siguientes enzimas:

- La amilasa está presente en la boca y en el estómago, y es principalmente responsable de la conversión de los almidones a oligosacáridos y monosacáridos (glucosa). La amilasa se utiliza principalmente en la digestión *in vitro* en muestras de alimentos de origen vegetal (Koh *et al.*, 2009).
- Las proteasas están presentes principalmente en el estómago (pepsina) y el intestino delgado (tripsina y quimotripsina) siendo responsables de descomponer proteínas/péptidos en péptidos más pequeños y aminoácidos (Hur *et al.*, 2011).
- Las lipasas están presentes en el estómago (lipasa gástrica) y el páncreas (lipasa pancreática), donde se absorben a las superficies de lípidos emulsionados y convierten los triacilgliceroles y diacilgliceroles a monoacilgliceridos y ácidos grasos libres (Zangenberg *et al.*, 2001).

La digestión gástrica es imitada utilizando pepsina a pH alrededor de 2. Los precursores de proteinasa-pepsinógeno producidos por células principales del estómago, se activa de manera óptima a un pH entre 1.8 y 3.2 en la luz gástrica. Además, los cambios del pH en el estómago y el intestino pueden ser influenciados por el pH inicial o la cantidad de las muestras ensayadas, convirtiéndose el pH en un factor importante. Por lo tanto, la elección de las características de enzimas tales como la composición, la concentración y pH debe considerarse de acuerdo con características de la muestra (Jensen-Jarolim y Untersmayr, 2006).

Es por esto que las características de los alimentos, el tipo de enzima, y la concentración son factores clave que controlan la digestión de los alimentos durante la digestión *in vitro* (Hur *et al.*, 2011).

II.3.1.2.2 Modelo saco intestinal invertido

La absorción o asimilación de nutrientes se realiza principalmente en la sección proximal del intestino delgado. El uso del saco invertido se ha utilizado

desde hace mucho tiempo, como una técnica desarrollada en el campo de la farmacología humana permitiendo evaluar la permanencia y absorción de fármacos dentro del organismo, en donde se utilizan intestinos de ratón, debido a su gran semejanza con el humano (Daniel, 2004). Estos muestran una buena correlación con la permeabilidad intestinal *in vivo* y la fracción de dosis absorbida en los seres humanos. Para que los segmentos del intestino puedan ser utilizados *in vitro* es necesario que sean frescos, recién extraídos y su función celular no haya sido afectada, logrando una mejor viabilidad del tejido. Es una técnica sencilla y de bajo costo sin necesidad de equipo especializado (Venkatesh *et al.*, 2007).

El saco intestinal se prepara mediante la inversión de un segmento del intestino a través de una varilla, logrando que el epitelio de la mucosa con las vellosidades se encuentre en la parte exterior, mientras que la membrana muscular, forma la superficie interior del saco invertido (Alam *et al.*, 2012). El compartimiento interior se llena con una solución amortiguadora y ambos extremos son cerrados. La manipulación y preparación de los tejidos son importantes. Inmediatamente después del sacrificio del animal, todo el intestino se extirpa rápidamente, se drena por medio de una solución salina a temperatura ambiente y se coloca inmediatamente en medio de cultivo oxigenado a 37 ° C. Se corta el intestino para obtener sacos de aproximadamente 6-8 cm de longitud. Después se continúa con el evertido del intestino de manera suave y con ayuda de la varilla. Este se llena con la solución amortiguadora de buffer de Krebs-Ringer, la cual esta oxigenada (Campos-Vega *et al.*, 2015; Venkatesh *et al.*, 2007).

El uso de estos sacos invertidos logra la buena viabilidad del tejido, además la actividad metabólica se mantiene mediante la incubación de los sacos evertidos en medio de cultivo tisular. En estos se encuentran numerosos paquetes proteicos dedicados al transporte de los mismos que mediante diversas maneras permiten el ingreso de aminoácidos libres y pequeños péptidos a través de la membrana cerosa del intestino (Barthe *et al.*, 1998; Daniel, 2004).

II.3.1.2.3 Fermentación colónica

Una de las técnicas más utilizadas para el estudio de la actividad microbiana a nivel del colon, es la experimentación con modelos de fermentación *in vitro*; este modelo estudia la fermentación anaeróbica de los carbohidratos por medio de las poblaciones bacterianas mixtas (Gibson *et al.*, 2004; Puy, 2013).

Los modelos de fermentación de *in vitro* permiten el cultivo estable de una microbiota intestinal completa durante un período de tiempo definido y con un modelo específico (Cinquin *et al.*, 2004; Cinquin *et al.*, 2006). El objetivo principal es el establecimiento de una microbiota intestinal compleja, bajo condiciones ambientales controladas para la modulación experimental. Para la adaptación, la supervivencia y la proliferación de una microbiota *in vitro*, es necesario tomar en cuenta parámetros ambientales tales como el pH, tiempo de retención, la temperatura, anaerobiosis, entre otros (Payne *et al.*, 2012). Estos modelos tienen ciertas ventajas sobre los modelos *in vivo*, principalmente en el tiempo y el costo, además de permitir la utilización de material biológico humano, evitando interferencias en la respuesta del organismo (Puy, 2013).

La identificación y cuantificación de los metabolitos producidos por la microbiota colónica son de gran importancia, pues nos ayuda a conocer la bioaccesibilidad y los efectos benéficos procedentes de los compuestos de los alimentos; entre ellos, la fibra dietética que se fermenta por la microbiota colónica con la producción de AGCC, entre otros compuestos (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Debido a esto, la fermentación colonia *in vitro* ha sido utilizada para identificar los compuestos fenólicos, así como la fibra dietaria proporcionando información del comportamiento de estos y de esta forma facilitar su comprensión y aplicación en estudios *in vivo*. Finalmente las determinaciones de fermentación fecal en una persona pueden ser muy útiles para conocer la capacidad fermentativa de sus bacterias colónicas (Puy, 2013).

Estos modelos permiten una evaluación de los componentes dietarios en relación a su impacto en la población microbiana del intestino y para observar los cambios posteriores en el metabolismo en función de la modulación de la dieta, evaluación del impacto de las cepas probióticas en la función de la microbiota y en

estudios sobre el mecanismo de las interacciones entre patógenos (Payne *et al.*, 2012).

Campos-Vega *et al.*, (2015) reporta que el uso de la digestión *in vitro* y los modelos de fermentación en el colon puede ayudar a proporcionar útil penetración en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del CU y los factores que determinan su disponibilidad, con el fin de explorar su potencial como un ingrediente funcional. Además menciona que los taninos presentes en este subproducto tienen un considerable potencial biológico presentando una actividad antioxidante alta para DPPH durante la fermentación colónica. Asimismo, reportó una actividad antioxidante alta en ABTS durante la fermentación colónica sugiriendo que se debe a la presencia de CGA libres fácilmente metabolizables. Por lo tanto, concluye que los compuestos antioxidantes del CU se ven afectados por los cambios de pH durante la digestión intestinal *in vitro* y la fermentación en el colon, probablemente modificando sus propiedades físico-químicas (es decir, estructura química y solubilidad). Esto se ve reflejado en su bioaccesibilidad, permeabilidad y la actividad antioxidante, lo que sugiere sus potenciales beneficios para la salud justificando así su valorización.

II.4 Microbiota colónica

II.4.1 Generalidades

La mucosa intestinal es un sistema complejo y dinámico que funciona como una barrera semipermeable que permite la absorción de nutrientes y macromoléculas necesarias para el crecimiento y el desarrollo, mientras que protege el flujo hacia la sangre de microorganismos potencialmente invasores (Walker, 1979; Walker *et al.*, 1975; Walker *et al.*, 1975). Estas funciones básicas se llevan a cabo en un entorno habitado por miles de millones de bacterias comensales de los tres dominios de la vida, Bacteria, Archaea y Eukarya (Eckburg *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; Scanlan y Marchesi, 2008).

La diversidad de la microbiota intestinal está determinada por varios factores, incluyendo la genética, medio ambiente, la alimentación y la higiene; así como la edad, sexo y condiciones ambientales y fisicoquímicas (Chen *et al.*, 2013;

Fan *et al.*, 2014; Moschen *et al.*, 2012). Por lo tanto, la microbiota colónica de los seres humanos, es una comunidad compleja y diversa, la cual desempeña funciones importantes a la salud y en la enfermedad (Leser y Mølbak, 2009; Mueller *et al.*, 2006).

El metabolismo intestinal implica una variedad de enzimas y rutas bioquímicas codificadas por miembros de la comunidad microbiana. Las enzimas son capaces de digerir carbohidratos y proteínas, que escapan del proceso de digestión en el intestino delgado (García, 2002). Esta capacidad metabólica es codificada por un total de 2 - 4 millones de genes microbianos (Possemiers *et al.*, 2011).

Bernalier-Donadille (2010) reporta sobre el mecanismo de la microbiota. Existen dos principales funciones metabólicas de la microbiota intestinal: el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas. La degradación anaerobia de estos polisacáridos es un proceso complejo que implica varios grupos funcionales de microorganismos. El primer paso de esta cadena se compone de hidrólisis de polisacárido por bacterias hidrolíticas, lo que resulta en la liberación de fracciones más pequeñas, además esta hidrólisis implica una variedad de enzimas hidrolíticas que no son producidos por el huésped (polisacáridos, glucosidasas, etc.). Estas enzimas hidrolizan los polisacáridos no digeribles (almidón, almidón resistente y fibra dietaria soluble e insoluble) y proteínas o mucinas innatas del huésped que alcanzas el intestino grueso (Englyst *et al.*, 1987; Flint *et al.*, 2007). Posteriormente las fermentaciones microbianas de los polisacáridos hidrolizados en el intestino grueso producen AGCC, tales como el ácido acético, propiónico y butírico, ácidos de cada grasos de cadena ramificada, así como lactato, formiato, etanol y gases mixtos (CH₄, CO₂ Y H₂). El metabolismo del material proteico produce amoniaco, aminas, mercaptanos y H₂S (ácido sulfhídrico), así como algunos compuestos tóxicos, indolicos y fenólicos (Bernalier-Donadille, 2010). Los AGCC resultantes de la fermentación microbiana de almidones dietéticos hidrolizados, fibra y azucares, proporcionan alrededor del 10 % de la energía de la dieta de los individuos (Bäckhed *et al.*, 2004; McNeil, 1984; Scheppach, 1994). Los AGCC se sintentizan por diferentes bacterias, el ácido acético se sintetiza principalmente por *Bacteroides*,

Clostridium, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, etc; mientras que el ácido propiónico se produce principalmente por la especie predominante *Bacteroides*, así como por *Propionibacterium* y *Veillonella* y la producción del ácido butírico se debe principalmente a *Eubacterium* y *Coprococcus* (Bernalier-Donadille, 2010; Flint *et al.*, 2007).

Las principales especies bacterianas en las que se ha demostrado una actividad hidrolítica pertenecen a los géneros predominante *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* y *Roseburia*, así como algunas especies de *Clostridium*, *Eubacterium* y *Enterococcus*. La mayoría de las bacterias son capaces de utilizar el almidón como fuente de energía, siendo las *Bacteroides* sp. quien mejor lo utiliza (Leitch *et al.*, 2007; Ramsay *et al.*, 2006).

La biodegradación de las proteínas requiere la contribución de diferentes especies bacterianas con actividades complementarias (proteasas, desaminasas, descarboxilasas, etc.) que interactúan para asegurar su descomposición (Bernalier-Donadille, 2010). Las proteínas y los péptidos son las principales fuentes de nitrógeno en el colon, por lo tanto las bacterias hidrolizan estos polímeros con el fin de obtener carbono y nitrógeno para su propio uso. Las bacterias encargadas de esta hidrólisis son *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Cummings y Macfarlane, 1991). Los péptidos son asimilados por diferentes bacterias y su utilización se acompaña con frecuencia de la excreción de aminoácidos (Macfarlane y Gibson, 1994). La fermentación de aminoácidos implica una variedad de reacciones de oxidación y reducción con diversos aceptores finales de electrones (ácidos grasos insaturados, otros aminoácidos, H₂, etc.); la desaminación lleva a la formación de AGCC y de amoníaco. Además, de la formación de fenoles, ácidos dicarboxílicos y ácidos grasos de cadena ramificada (isobutirato, 2-metilbutirato, isovalerato). El fenol y el indol, liberados de la descomposición de los aminoácidos aromáticos por ciertas especies de *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se absorben por la mucosa del colon y se excretan en la orina (Cummings y Macfarlane, 1991; Macfarlane y Gibson, 1994)

La mayoría del amoniaco producido en el colon, proviene de la desanimación por la microbiota intestinal; éste es absorbido por la mucosa del colon y se transporta al hígado por la vena porta, donde se convierte en urea y luego se excreta en la orina. El amoniaco, fuente de nitrógeno para un gran número de especies bacterianas en el colon, es un compuesto potencialmente tóxico para el ser humano (Macfarlane y Gibson, 1994).

Los metabolitos de fermentación producidos por microorganismos intestinales son en su mayoría absorbidos por las células epiteliales y se metabolizan adicionalmente en diferentes órganos (epitelio intestinal, hígado, músculo, cerebro, etc.). La mayoría de ellos tienen beneficios para la salud, pero algunos también pueden tener efectos nocivos (Bernalier-Donadille, 2010).

El epitelio intestinal está compuesto de mucinas capaces de atrapar a las bacterias de forma selectiva o indiscriminada. Los polímeros de mucina que constituyen el moco contienen glucoproteínas, cuya parte hidrocarbonada está formada por restos de diferentes azúcares como la galactosa, N- acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico, esta porción de hidratos de carbono sirve como nutriente para la microbiota, pero también como receptor para toxinas microbianas y como proteína de superficie (Moreno, 2006). Para el mantenimiento del equilibrio intestinal se requiere que en el colon se fermenten a diario 60 g de materia orgánica, fundamentalmente hidratos de carbono (Cummings y Englyst, 1987).

II.4.2 Composición de la microbiota colónica humana

Más de 50 filos de bacterias han sido identificados, pero la microbiota humana asociada está dominada por sólo cuatro filos principales: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. La inclusión de *Clostridios* dentro del *phylum Firmicutes* hace que sea el filo más abundante, que constituye 46-58 % del total de bacterias. Otros principales habitantes incluyen el grupo *Bacteroides-Prevotella* (10-30 %), *Bifidobacterium* (4.4-4.8 %), *Enterobacteriaceae* (0.1-0.2 %) y *Lactobacillus* y *Enterococcus* (tanto 0.1-1.8 %) (Dethlefsen *et al.*, 2006; Dethlefsen

et al., 2007). Por lo tanto los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* constituyen la gran mayoría de las poblaciones en los seres humanos, ratas y ratones (Lozupone *et al.*, 2012; Moco *et al.*, 2012).

Las bacterias comensales residentes son responsables de crear resistencia a la colonización por microbios exógenos. Los microbios intestinales adherentes constantemente compiten con los microbios exógenos por los sitios de unión en el borde del cepillo de las células intestinales, evitando la invasión patógena y la translocación en el tejido del colon. Esta resistencia requiere de un equilibrio ecológico para evitar el crecimiento excesivo de bacterias oportunistas (Bernet *et al.*, 1994).

El intestino grueso, hogar de comunidades complejas y diversas de la microbiota, desempeñan papeles importantes en la salud y la enfermedad. En condiciones normales, estas bacterias hacen una relación simbiótica ("normobiosis") con el huésped. Su interacción es de crucial importancia para el mantenimiento del homeostasis en el intestino. Un cambio en este equilibrio ("disbiosis") bajo ciertas condiciones puede generar consecuencias perjudiciales para el huésped (Bajzer y Seeley, 2006; Chen *et al.*, 2013). Nuevas evidencias sugieren que la disbiosis intestinal es resultado de varios factores, como componentes de la dieta y los factores ambientales (Brown *et al.*, 2012). En particular, la dieta alta en grasa induce disbiosis se ha reconocido como un importante factor de riesgo para diversas enfermedades, como el cáncer de colon y diabetes (Keku *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2013).

Además el estilo de vida, los genes de acogida y las alteraciones en la estructura y función de la microbiota intestinal (disbiosis) son las principales causas que pueden llevar a la obesidad (Calvani *et al.*, 2014).

Estudios de metagenómica sobre la microbiota de ratones genéticamente obesos demostraron un enriquecimiento en los genes que codifican enzimas que intervienen en las etapas iniciales de la descomposición de polisacáridos dietéticos no digeribles y en los genes que codifican para enzimas que importan, metabolizan y generan los productos finales de estas vías metabólicas (Turnbaugh *et al.*, 2006). Además de la información presentada en ratones, se ha reportado que existen

diferencias en el microbioma intestinal entre los seres humanos obesos y delgados. Un estudio realizado durante un año con individuos sometidos a la pérdida de peso utilizando una dieta baja en grasa y carbohidratos se mostró que en los sujetos obesos la relación de Firmicutes a Bacteroidetes fue sustancialmente más alta que los sujetos con peso normal (Ley *et al.*, 2006). Por lo que las bacterias de intestino pueden influir en la recolección de energía y cómo esta puede ser almacenada y gastada, sugiriendo que el contenido de la microbiota intestinal puede contribuir a la obesidad (Ley *et al.*, 2005). En los seres humanos, se ha sugerido que la composición relativa de la microbiota intestinal durante la vida temprana predice el posterior desarrollo de sobrepeso y obesidad (DiBaise *et al.*, 2012)

Una microbiota en equilibrio es un elemento clave en el desarrollo y el mantenimiento de la inmunidad sistémica y de las mucosas (Moreno, 2006). Hoy en día la microbiota colónica intestinal es un determinante crítico de la absorción de nutrientes, la regulación de la energía, el peso y trastornos metabólicos. Por lo tanto, las interacciones sintropicas y simbióticas entre las especies bacterinas pueden desempeñar un papel fundamental en la composición de la microbiota (DiBaise *et al.*, 2012).

II.4.3 Modulación de la microbiota colónica por la fracción no digerible de los alimentos

El intestino grueso humano es colonizado por una comunidad densa y compleja de microorganismos, compuestos en gran parte de las bacterias anaerobias estrictas. Las funciones metabólicas de la microbiota tiene relación con los sustratos disponibles para su fermentación en el colon; los orígenes de estos sustratos son exógenos (fibra dietética, compuestos fenólicos) como endógenos (producidos por el huésped) (Bernalier-Donadille, 2010). La fermentación colónica de la fibra produce energía y su valor oscila entre 1 y 2.5 cal/g, este valor dependerá de su grado de fermentabilidad (Nordgaard y Mortensen, 1994).

En los últimos años se ha mostrado que cierto tipo de fibras pueden tener influencia sobre la modulación de la microbiota colónica. Por ejemplo, estudios

realizados por Gniechwitz *et al.* (2007) comparan la fermentación colónica de la fibra dietaria de la bebida de café y como control utilizaron la inulina, esta última es ampliamente utilizada como suplemento de la fibra dietética y es fermentada bajo las mismas condiciones; además la inulina es considerada un polisacárido puro, mientras que la fibra de café contiene componentes desconocidos que podrían determinar su utilización por las bacterias intestinales. Aunque se mostró una total fermentación de la inulina dentro de 24 h, los polisacáridos del café no lo fueron en su totalidad, sin embargo, no se puede descartar que los productos de la reacción de Maillard afectan negativamente a la capacidad de descomposición de polisacáridos de fibra de café. Lo que demuestra que la microbiota colónica, varía en cada humano, por lo que la velocidad de degradación de los polisacáridos de fibra de café pero en un grado similar. Los AGCC fueron los productos de fermentación formados a partir de fibra de café y la inulina, pero se mostró que la inulina presenta mayor producción del ácido butírico, mientras que no hubo diferencias significativas para el ácido acético y propiónico en las dos muestras. Las altas concentraciones de ácido acético y ácido propiónico indican que los miembros de género *Bacteroides* jugaron un papel importante en la degradación de la fibra de café.

En los cambios de composición microbiana, se ha demostrado que la fermentación de la fibra del café y la inulina conducen a un aumento de los recuentos de células de bacterias que pertenecen al grupo *Bacteroides-Prevotella* en un 60 %, en comparación con el control; dentro de éste grupo se observó un ligero aumento de *B. fragilis* tanto para fibra de café (4.0 %) como para inulina (7.4 %), mientras que se observó un aumento de *B. vulgatus* (10.4 %) sólo para la fibra de café (Gniechwitz *et al.*, 2007).

Daniells (2009) informó que el café, obtenido por extracción de los granos de café verde y tostados, producen un aumento en la actividad metabólica y el número de *Bifidobacterium spp.*, provocando un impacto en la microbiota. Sin embargo, no se sabe actualmente cuál de los componentes del café puede ser responsable del efecto, pero se cree que tanto la fibra como los AGC pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal.

Estudios realizados por Mills *et al.* (2015) demuestran que el metabolismo de la fracción no digerible del café en el colon, incrementa el crecimiento de *Bifidobacterium spp.*, en donde el CGA participa en el crecimiento de estos. Esto trae como ventaja efectos positivos para la salud del intestino como la producción del ácido acético y láctico; además de sus capacidades anti-patógenos inherentes. En contraste se observó que no hubo crecimiento de *Lactobacillus / Enterococcus spp*; también se observó, que la muestra de café no provoca crecimiento de *C. histolyticum*, un grupo bacteriano considerado como patógeno, y que de igual manera se disminuye tras la exposición por 5-CQA. Los resultados sugieren que los polifenoles inducen constantemente una disminución en el crecimiento del grupo *C. Histolyticum*; por lo que el consumo de café puede presentar efectos benéficos para el individuo a través del potencial del CGA.

Se ha demostrado que las melanoidinas al ser parte de la fibra dietaria pueden ser utilizadas por microbiota intestinal humana y contribuir con beneficios para la salud (Ames *et al.*, 1999; Gniechwitz *et al.*, 2007). Estas escapan a la digestión llegando al colón, en donde interactúan con las diferentes especies microbianas, teniendo influencia significativa sobre la salud gastrointestinal humano y, más específicamente, son capaces de promover el crecimiento de bifidobacterias (Rosa Cinzia Borrelli *et al.*, 2004; Faist y Erbersdobler, 2001).

En un estudio con humanos, se demuestra que las melanoidinas de café instantáneo modulan positivamente a las *Bacteroides-Prevotella* y en mayor proporción *Bifidobacterium spp.*; además, la mayoría de las melanoidinas consumidas, permanecen en el tracto gastro-intestinal, por lo tanto, puede ser un sitio clave para su acción antioxidante y biológica (Delgado-Andrade, 2014; Finot y Magnenat, 1981; Rufián-Henares y Morales, 2007a).

La absorción de las melanoidinas depende de su peso molecular y la solubilidad. Datos sobre biodisponibilidad sugieren que hasta un 30 % de los componentes de bajo peso molecular de melanoidinas o sus productos de degradación intestinal pueden ser absorbidos, mientras que una gran proporción de las melanoidinas de alto peso molecular son excretadas en las heces (Delgado-Andrade, 2014; Finot y Magnenat, 1981).

Las melanoidinas de los alimentos también pueden actuar como prebiótico, pues logran modular la población bacteriana del colon. Entre los diferentes grupos presentes en microbiota, bífidobacteria *Lactobacillus spp* están generalmente asociados con una afección intestinal saludable, mientras *Clostridium spp* y *Bacteroides spp* son potencialmente peligrosos. Algunos estudios muestran, que el consumo de café, tanto *Escherichia coli* y *Clostridium spp* disminuyen significativamente en el colon proximal, mientras que la población de *Bifidobacterium spp* aumenta en la misma zona (Jaquet *et al.*, 2009; Nakayama y Oishi, 2013).

Mas recientemente Jiménez-Zamora *et al.* (2015) evaluaron con los subproductos del café, entre ellos del CU, evaluando de forma *in vitro* las actividades antimicrobianas, antioxidantes y prebióticas, encontrando que la fracción no digrible de estos subproductos estimulan selectivamente el crecimiento de número limitado de bacterias de una manera independiente, mientras que la actividad prebiótica en conjunta fue limitada debido a la fuerte actividad antimicrobiana de las melanoidinas del café. Asimismo se encontró que el CU junto con las melanodinas no mostraron diferencia estadística significativa con el control. Sin embargo el CU sin la presencia de melanoidinas ejercen un efecto positivo sobre las bacterias consideradas beneficiosas, al aumentar el número de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillum spp.*, mientras que las bacterias nocivas virtualmente no se vieron afectados. Sin embargo, las investigaciones continúan debido a que el CU podría ser utilizado como una fuente de nuevos ingredientes funcionales, debido a su efecto relevante sobre la microbiota intestinal, además de que podría ser una buena fuente de compuestos prebióticos.

II.4.4 Efecto benéfico a la salud

La comunidad microbiana intestinal se ha demostrado que afectan a una amplia gama de procesos biológicos incluyendo la maduración del intestino y la angiogénesis (Stappenbeck *et al.*, 2002), el desarrollo de la inmunidad innata (Mazmanian *et al.*, 2005), la producción de vitaminas (Hill, 1997), biotransformación

de compuestos endógenos y exógenos (Blaut y Clavel, 2007), el ahorro de energía alimentaria, y recientemente, la regulación del almacenamiento de grasa de host (Bäckhed *et al.*, 2004). Recientemente se ha investigado cómo la dieta puede afectar tanto la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal.

La conversión de componentes de la dieta por las bacterias intestinales conduce a la formación de una gran variedad de compuestos, ya sea con efectos beneficiosos o perjudiciales para la salud humana. Las dietas ricas en carbohidratos pueden tener un efecto significativo en el número de bacterias productoras de ácido butírico viables en el intestino, como los grupos clostridiales IV y XIVa (*Ruminococcus* / *Faecalibacterium* y *Roseburia* / *Eubacterium*, respectivamente, que comprenden más del 50 % de las bacterias en el ser humano intestino grueso). El ácido butírico es la fuente de energía preferida para las células epiteliales del colon y se cree que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la salud del colon en los seres humanos mediante la activación de la apoptosis y la detención del ciclo celular (Heerdt *et al.*, 1994; Roediger, 1982). Fibras no digeribles también pueden estimular selectivamente el crecimiento de especies de *Bifidobacterium*, un género de bacterias reconocido por sus efectos beneficiosos (Gibson y Wang, 1994; Lee *et al.*, 1993; Marteau *et al.*, 2002).

La fermentación bacteriana de la fibra y la obtención de AGCC favorece el metabolismo intrínseco para que ejerzan una serie de acciones tanto a nivel local, en el colon, como sistémicas. Aunque se considera a las bacterias intestinales como residentes comensales, hoy en día a través de diversos estudios se ha demostrado que sirven en diversas e importantes funciones, algunas de las cuales pueden contrarrestar el cáncer de colon, entre otras (Bibiloni *et al.*, 2006).

La producción AGCC reduce el pH del colon, lo que impide el crecimiento de ciertas especies patógenas y promueve el crecimiento de las bifidobacterias y otras bacterias ácido lácticas que se consideran benéficas para la salud humana (Gibson *et al.*, 2004). Además, los AGCC tienen un efecto trófico sobre la mucosa colónica y son metabolizados por los tejidos del huésped, siendo el ácido butírico el sustrato energético preferido de los colonocitos (Prasad, 1980); además este ácido

desempeña un papel importante en la maduración del epitelio colónico y la regeneración de la mucosa en el caso de atrofia (Sakata, 1987).

Por último, se sugiere que el ácido butírico induce la diferenciación celular y estimula la apoptosis de células cancerosas (Hague *et al.*, 1996). También este ácido aumenta el flujo sanguíneo del colon, incrementa la secreción pancreática así como la estimulación del sistema nervioso. El acetato y el propionato regulan el metabolismo de la glucosa, en tanto que disminuyen la glucemia posprandial y la respuesta insulínica (Anderson *et al.*, 1987; Kripke *et al.*, 1989; Lupton y Kurtz, 1993).

Estudios realizados reportan que la presencia de *Escherichia coli* está asociada con adenomas colorrectales y el cáncer. Además, se ha demostrado que grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y bacterias productoras de sales biliares, esta asociado con un mayor riesgo de cáncer de colon (Swidsinski *et al.*, 1998).

Los microbiota del colon se cree que desempeñan un papel central en la salud humana, pues está relacionada con trastornos como el síndrome del intestino irritable (Kassinen *et al.*, 2007), la diarrea del viajero (Hilton *et al.*, 1997), el autismo (Finegold *et al.*, 2002) y la obesidad (Zhang *et al.*, 2009). Por lo tanto, la modulación beneficiosa de las bacterias del intestino puede ayudar en la prevención de tales enfermedades (Wallace *et al.*, 2011).

Notablemente, muchos prebióticos aumentan los niveles de bifidobacterias (Davis *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 1995) que son conocidos por prevenir la colonización de patógenos por exclusión competitiva, para mejorar la integridad de la barrera epitelial, regular el sistema inmune y por tener una respuesta anti-inflamatoria (Ng *et al.*, 2009). Sin embargo, otros grupos de bacterias, tales como *Clostridium coccoides* - *Eubacterium rectale*, también pueden actuar beneficiosamente en el intestino grueso previniendo el desarrollo de la obesidad y otras enfermedades relacionadas (Neyrinck *et al.*, 2012).

Los prebióticos resisten la digestión / absorción en el tracto gastrointestinal y selectivamente estimulan el crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales

asociados con la salud, lo que conduce a un intestino sano (Gibson *et al.*, 2004; Van den Abbeele *et al.*, 2013).

Diversos estudios han demostrado que la modulación de la microbiota se ve favorecida por probióticos y prebióticos, aunque existen otros agentes que también pueden ser benéficos (Keku *et al.*, 2014).

II.4.4.1 Actividad enzimática

Algunas maneras en que la microbiota intestinal podrían desempeñar un papel significativo son: podría convertir componentes de la dieta en cocarcinógenos o carcinógenos (o ambos), podría metabolizar las secreciones endógenas, ellos mismos controlados por la dieta, en diferentes compuestos y podría producir toxinas cancerígenas a partir de precursores adecuados. Estas reacciones son catalizadas por enzimas bacterianas, la medición apropiada de las enzimas bacterianas en el intestino da una indicación de la capacidad de la microbiota en relación con estas transformaciones (Nalini *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que algunos componentes de la dieta pueden causar una alta excreción de ácidos biliares y el colesterol, que se convierten por las bacterias del colon a los ácidos biliares secundarios y esteroides neutros. Estos compuestos pueden ser metabolizados por la microbiota para producir agentes carcinógenos (Hill, 1975; Reddy *et al.*, 1974). Una correlación positiva entre la ingesta de grasa y el cáncer de colon se ha demostrado en estudios experimentales (Kesteloot *et al.*, 1991).

Dos importantes actividades de la microbiota del colon son mucinasa y β -glucuronidasa. Las mucinasa son el sistema de enzima responsable de la degradación de las mucinas de protección en el colon. β -glucuronidasa es de interés ya que es la enzima que hidroliza glucurónidos biliares cuando llegan al colon. Muchos de los glucurónidos son productos de desintoxicación conjugada en el hígado y su hidrólisis puede liberar toxinas libres, que pueden luego actuar sobre los colonocitos o pueden ser absorbidas por el intestino (Goldin *et al.*, 1978; Reddy *et al.*, 1977). Cuando el carcinógeno conjugado alcanza el colon, puede ser hidrolizado

y la mucosa del colon queda expuesta a agentes carcinógenos libres. Si la hidrólisis β -glucurónido es un paso limitante en este proceso, la actividad de glucuronidasa microbiana en el colon puede influir en el riesgo de carcinogénesis colónica (Nalini *et al.*, 1998).

En la actualidad, existen diversas investigaciones sobre el papel de dos enzimas fecales, que pueden iniciar la creación de cambios desfavorables en el colon: β -glucuronidasa y β -glucosidasa. Muchos estudios han demostrado una correlación entre el aumento de los niveles de enzimas y el aumento de la producción de metabolitos dañinos, así como la intensificación de la inflamación (Beaud *et al.*, 2005; De Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2005; Hughes y Rowland, 2000)

Otra de las enzimas de gran interés, es la triptofanasa, la cual esta asociada con la formación de indol, este se genera por la enzima citoplasmática, triptofanasa, que hidroliza triptófano para crear indol, piruvato y amoniaco (Newton *et al.*, 1965), una reacción que se produce exclusivamente en bacterias (Lee y Lee, 2010). indol y otros metabolitos de triptófano derivado del balance de la inflamación en el tracto intestinal de los mamíferos afectan fuertemente la fisiología de bacterias y animales (Wikoff *et al.*, 2009).

La ureasa es otra de las enzimas de gran relevancia, esta realiza la hidrólisis de la urea. En los seres humanos, la urea es un factor de funciones normales de los riñones (Sirko y Brodzik, 2000). Ureasa y amoniaco, generado durante la hidrólisis de la urea, pueden ser tóxicos para los tejidos humanos (Follmer, 2010) y han sido asociadas en las enfermedades de larga duración, como la aterosclerosis o la artritis reumatoide (Arabski *et al.*, 2010), entre algunas otras.

II.4.5 Métodos para determinar modulación de la microbiota

Las nuevas técnicas de biología molecular (sondas de ácido ribonucleico, hibridación *in situ*, citometría de flujo o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) son herramientas fiables para la identificación y la cuantificación de especies de la microbiota, lo que contribuye a conocer con mayor profundidad las características

individuales de la misma y su modificación por factores externos (Moreno Villares, 2006).

Los avances en las técnicas moleculares han mejorado nuestra comprensión de la microbiota intestinal. Bibliotecas comprendidas por clones de genes de 16S rRNA derivados de biopsias, contenido luminal y heces han demostrado que la microbiota intestinal de ratón y los humanos se compone de cientos de diferentes especies filogenéticas que se pueden clasificar en los cuatro filos mencionados anteriormente: Firmicutes, Bacteroidetes, proteobacterias y Actinobacteria, comprendiendo 98 % de la microbiota intestinal (Bäckhed *et al.*, 2005; Eckburg *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2005)

Para determinar las concentraciones de ADN microbiano a partir de las muestras, se ha desarrollado el ensayo de qPCR basado en la amplificación de la subunidad beta de ARN polimerasa (*rpoB*), un gen altamente conservado en bacterias (Case *et al.*, 2007; Dahllöf *et al.*, 2000). El ADN genómico extraído se utiliza como molde para la amplificación por PCR y cuantificación (ng de DNA / ml) de bacterias totales (gen *rpoB*) utilizando la tecnología de SYBR Green PCR. La densidad de los grupos de bacterias seleccionadas dentro de las regiones interfold y digesta se determinan mediante ensayos de qPCR utilizando primers específicos de grupo previamente validados (Rinttilä *et al.*, 2004).

PCR es una técnica, donde dos oligonucleotidos son sintetizados, cada uno como secuencia complementaria de una hebra opuesta (secuencia de un segmento en cada una de las hebras) del ADN blanco en posiciones que estén mas allá de aquellas donde termina el segmento a ser amplificado. Muchos estudios utilizan métodos de cultivo-independiente (por ejemplo, técnica PCR) para documentar la densidad microbiana y la composición en diferentes regiones a lo largo del intestino. Estos análisis exhaustivos de la población microbiana muestran alteraciones en la diversidad y en la densidad de los genes bacteriales 16S rRNA en íleon, ciego, proximal, colon distal y las heces de humanos y ratones sanos (Eckburg *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2006).

La hibridación *in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. Esta técnica tiene como

fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos, la cual puede ser DNA y/o RNA, a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina-timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una cadena, tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato (Ramos, 2010).

RISA (análisis del espacio intergénico ribosomal), conocida como la huella dactilar de las comunidades bacterianas, sirve para la estimación rápida de éstas. Este método se basa en la amplificación del espacio intergénico de la subunidad pequeña 16s rRNA y la subunidad larga 23s rRNA en el operon rRNA ribosomal por medio de un primer. Esta técnica ha sido utilizada con frecuencia para el estudio de una gran variedad de hábitats, incluyendo el suelo, el medio acuático y el intestino humano (Danovaro *et al.*, 2006; Lejon *et al.*, 2005; Sepehri *et al.*, 2007). Por lo que RISA se ha convertido en una herramienta útil para comparar la estructura de la comunidad a través de múltiples muestras en base a patrones de perfil (Kovacs *et al.*, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, existe una gran presión política y social para reducir la contaminación procedente de las actividades industriales. Casi todos los países desarrollados y subdesarrollados están tratando de adaptarse a esta realidad mediante la modificación de sus procesos para que sus residuos puedan ser reciclados. En consecuencia, la mayoría de las grandes empresas ya no consideran residuos como residuos, sino como una materia prima para otros procesos.

Debido a la presencia de material orgánico, cafeína y polifenoles presentes en los subproductos del café, y a las grandes cantidades que se generan de la industria del café, estos se han convertido en un problema de contaminación. El café usado (CU) se ha convertido en un tema de investigación, en la búsqueda de formas alternativas para reducir este problema y crear un beneficio tanto económico, como ambiental, así como funcional en el cuerpo humano, así como darle un valor agregado a este subproducto.

Por lo tanto, tomando en cuenta los componentes bioactivos presentes en el CU, como el ácido clorogénico, fibra dietaria antioxidante y melanoidinas, entre otros, existe la posibilidad de que estos tengan efecto sobre la microbiota colónica, ya que a través de la fermentación colónica se producen metabolitos de importancia metabólica de entre los que destacan los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos fenólicos con efectos potenciales para la salud. Estos beneficios muestran nuevas propuestas en la actividad prebiótica o como un portador de compuestos antioxidantes, es por esto que los metabolitos derivados de la fermentación colónica se han convertido en un reto en la ciencia nutricional. Para esto, se ha utilizado muestras de heces, como una aproximación para evaluar la producción de metabolitos del colon y con ayuda de un modelo rRNA 16S es posible identificar perfiles bacterianos implicados en la fermentación. La información sobre el potencial funcional del CU durante su paso por el tracto gastrointestinal, incluyendo el colon, resulta de vital importancia para su explotación como agente bioactivo proveniente de un subproducto de la industria cafetalera. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la bioaccesibilidad, permeabilidad y efecto sobre la microbiota intestinal *in vitro* de compuestos nutraceuticos del café (*Coffea arabica* L.) usado.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Determinar la bioaccesibilidad, permeabilidad y efecto sobre la microbiota intestinal *in vitro* de compuestos nutraceuticos del café (*Coffea Arabica* L.) usado.

IV.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos nutraceuticos de café usado, con dos grados de tostado, mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.
2. Determinar la permeabilidad y capacidad antioxidante de la fracción bioaccesible del café usado, con dos grados de tostado.
3. Caracterizar parcialmente la fracción bioaccesible y los productos de la fermentación colónica del café usado, con dos grados de tostado.
4. Evaluar el efecto sobre la microbiota colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. MATERIALES

V.1.1 Materia Prima

Se utilizaron granos de café tostados y molidos de la marca “Tuytz” café ecogourmet, el cual fue cultivado sin usar agroquímicos, ofreciéndole un sabor y aroma característicos, procedentes de Chiapas, México (2015).

Se trabajó con 2 diferentes grados de tostado de la variedad arabica, el americano, que corresponde a un tostado medio (TM), y el francés, que corresponde a un tostado oscuro (TO), ambos pertenecientes a la zona de Chiapas, México. El café se mantuvo en refrigeración y protegido de la luz hasta su uso.

Para la obtención de café usado (CU), se tomaron 7 gramos del café por cada 100 mL de agua; se preparó la bebida de café en una cafetera convencional, obteniendo el residuo en el filtro de la cafetera. Después se seco el café utilizando en un horno a 60 °C por 24 horas. Este procedimiento se siguió para ambos grados de tostado.

Posteriormente la muestra se molió utilizando un molino, y se pasó por una malla No 60, para homogenizar el tamaño de la partícula. Finalmente se almacenó el café en refrigeración hasta su posterior uso, protegiéndolo de la luz.

V.1.2 Reactivos y animales

Los diversos reactivos y solventes que se emplearon en los ensayos para la determinación de la composición química, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante así como digestión gastrointestinal, fueron adquiridos de las marcas J. T. Baker y Sigma Aldrich.

Se emplearon 4 ratas macho Sprague-Dawley (UNAM, Campus Juriquilla) de entre 250 – 300 g de peso, las cuales fueron sometidas a un ayuno de 16 h con agua *ad libitum*, con el fin de obtener el intestino delgado para llevar a cabo la técnica de saco intestinal invertido.

V.2. MÉTODOS

V.2.1 Composición Proximal

Se determinó la composición proximal tanto del café molido y tostado, como del café usado para ambos grados de tostado, americano y francés, siguiendo la metodología descrita en la AOAC (2002). El contenido de carbohidratos (%) se obtuvo por diferencia de los componentes.

V.2.1.1 Determinación de cenizas

El contenido de cenizas se determinó de acuerdo con el método 945.46 descrito en la AOAC (2002). Primero se colocó a peso constante los crisoles necesarios en la estufa a 80 °C por 12 horas o en la mufla a 550 °C por 2 horas. Transcurrido el tiempo se sacaron y se dejaron en el desecador durante 40 minutos, para atemperarse. Se pesaron cada uno de los crisoles registrando su peso. Se pesó entre 2-4 g de muestra en los crisoles a peso constante, registrando su peso exacto. Se calcinó en la mufla a 550 °C durante 5-6 h hasta obtener las cenizas blancas. Se dejó enfriar los crisoles en el desecador durante 40 minutos, para finalmente se registró el peso. Para los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = [(W1 + M1) - (M2 - W1)] * 100$$

donde:

W1 = peso constante del crisol

M1 = peso muestra

M2 = peso crisol + cenizas

V.2.1.2 Determinación de humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método 925.23 descrito en la AOAC (2002). Primero se colocaron a peso constante los crisoles necesarios en la estufa a 80 °C durante 12 horas o por 3 horas a 105 °C. Transcurrido el tiempo se sacaron y se dejaron en el desecador durante 40 minutos

para atemperar. Se pesó cada uno de los crisoles registrando su peso. Se pesaron 3 g de muestra en los crisoles a peso constante, registrando su peso exacto. Se colocó el crisol con la muestra en la estufa a 130 °C durante 3 horas. Se dejó enfriar los crisoles en el desecador durante 40 minutos, para finalmente registrar el peso. Para los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad y materia volátil} = (W1 - W2) * 100 / W \text{ muestra}$$

donde:

W1 = peso inicial de la cápsula + peso de la muestra

W2 = peso final de la cápsula + muestra.

V.2.1.3 Determinación de lípidos

Los lípidos se determinaron de acuerdo con el método 920.39 descrito en la AOAC (2002). Primero, los matraces se colocaron a peso constante en la estufa a 80 °C durante 12 horas. En un cartucho de celulosa se colocó un papel filtro del No. 1 con 5 g de muestra, registrando el peso exacto, se cubrió con algodón los cartuchos y se colocarán en el compartimento de extracción de Soxhlet, donde el matraz, contenía 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo. Posteriormente se calentó, manteniendo 10 reflujos/hora durante 4-5 horas. Transcurrido el tiempo de extracción se recuperó el solvente y se seco el extracto en estufa, con la finalidad de retirar la humedad. Se enfrió en el desecador por 40 min. Finalmente se peso el matraz y se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ grasa} = (Pf - Po) / M * 100$$

donde:

Pf = peso final del matraz

Po = peso inicial del matraz

M = peso de la muestra

V.2.1.4 Determinación de proteína

La proteína se determinó de acuerdo con el método 920.15 descrito en la AOAC (2002). Para la digestión se colocaron en los matraces de digestión tipo Kjeldhal, un gramo de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4), 0.4 g de sulfato de cobre (CuSO_4) y se adicionó 15 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los tubos se colocaron en la plancha del digestor durante 3 horas o hasta el cambio de color de la muestra a verde claro. Se dejó enfriar y se añadió 100 mL de agua destilada.

Para la destilación se agregaron a los tubos 50 mL de NaOH al 40 %. Se recibió el destilado en un matraz con 25 mL de ácido bórico y se empleó como indicador rojo de metilo. Una vez obtenido el volumen se tituló con NaOH 0.2 N previamente valorado. Finalmente se registraron los mililitros gastados de NaOH 0.2 N y se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{[V \text{ H}_2\text{SO}_4] (N) - (V \text{ NaOH}) (N) (0.014) (100)}{\text{Peso muestra}}$$

Peso muestra

$$\%P = (\%N) (\text{Factor})$$

*El factor utilizado fue 6.25

V.2.2. Composición nutracéutica

La composición nutracéutica incluye la cuantificación de la actividad antioxidante por los métodos de ABTS, DPPH; además de la fibra dietaria total, soluble e insoluble. El análisis de la actividad antioxidante se realizó en el GC y CU y en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica del CU.

V.2.2.1 Determinación de fibra

V.2.2.1.1 Fibra insoluble

La fibra insoluble se determinó de acuerdo con lo sugerido por Shiga *et al.*, (2003). Se pesó un gramo de muestra pulverizada y desgrasada; posteriormente se adicionó 50 mL de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6, así como 100 µL de α-amilasa, protegiendo el matraz de la luz. La muestra se incubó en baño maría a 95 °C por 30 minutos, agitando cada 5 min. Al finalizar, se ajustó a pH 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionó 100 µL de proteasa (5 mg/mL) y se incubó en baño María a 60 °C por 30 min con agitación continua, se ajustó pH a 4 con la muestra atemperada. Más tarde se adicionó 300 µL de amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C con agitación continua. Se enfrió a temperatura ambiente y se filtró en papel Whatman no.4 previamente pesado. Se realizaron 2 lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C, 2 lavados con 15 mL de etanol al 80 %. Se llevó a peso constante el filtro a 60 °C por 24 horas, finalmente se registraron los pesos. El cálculo se realizó en base seca y de acuerdo al porcentaje de hidratos de carbono de la muestra.

$$\text{Cálculo de fracción insoluble (\%)} = \frac{(\text{papel con muestra} - \text{papel solo})}{W \text{ muestra}} * 100$$

V.2.2.1.2 Fibra soluble

De la prueba anterior, se adicionó al líquido de filtración recuperado de la fibra insoluble el mismo volumen de etanol al 80 % dejando reposar durante 12 horas. Se filtró al vacío en papel Whatman No. 42 previamente pesado, 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 horas a 60 °C. Se registró el peso. Para los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cálculo de fracción soluble (\%)} = \frac{W_{\text{papel con la muestra}} - W_{\text{papel solo}}}{W \text{ muestra}} * 100$$

Fibra dietaria total (FAT) = Fibra dietaria insoluble + fibra dietaria soluble

V.2.2.2 Obtención del extracto etanólico

Para la obtención del extracto etanólico se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Pavlović *et al.*, (2013), modificada por Campos-Vega *et al.*, (2015). Un gramo de muestra se suspendió en 9 mL de etanol al 20 %, después se calentó en el horno de microondas casero (LG MS-1145KYL) en dos ocasiones, una durante 20 s con una potencia de 80 watts, se dejó enfriar la muestra y se volvió a someter a una segunda extracción con las mismas condiciones anteriores. Se continuó con una centrifugación a 5000 rpm por 10 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante, el cual se utilizó para las siguientes pruebas.

V.2.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se llevó a cabo a partir de los extractos etanólicos obtenidos anteriormente.

V.2.2.3.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH

Este método utilizó el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH*) por medio de técnica propuesta por (Fukumoto y Mazza, 2000), adaptado a microplaca. Se añadieron 20 µL de extracto etanólico y 200 µL de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos. Se preparó un control de 20 µL de metanol y 200 µL de DPPH.

Se preparon muestras por triplicado las cuales se leyeron cada 10 minutos durante 90 minutos a una longitud de onda de 520 nm utilizando un espectofotometro (Thermo Scientific, Multiskan™ GO). Es importante mencionar que las placas se mantuvieron a oscuridad y a temperatura ambiente entre una lectura y otra.

También se elaboró una curva de calibración de trolox (0-800 µM). Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalentes de trolox (TEAC) en µmol equivalentes de trolox /g de muestra.

V.2.2.3.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS

La determinación por el método ABTS 2,2- azinobis(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) se llevó a cabo mediante la técnica descrita por (Nenadis *et al.*, 2004), en microplaca. Se preparó una solución acuosa 7mM de ABTS y una solución de $K_2S_2O_8$ 140mM, se mezclaron 5 mL y 88 μ L respectivamente. Es importante tomar en cuenta que tarda 12 horas en generar el radical y que debe de protegerse de la luz. Pasado el tiempo, se realizó una dilución, mezclando 500 μ L de la solución y se le agregarán de 20-25 mL de etanol. La solución se leerá a una longitud de onda de 734 nm, esperando valores entre 0.7 y 1 de absorbancia. Se adicionó a una microplaca de 96 pozos, 20 μ L del extracto etanólico y un control con solo 20 μ L metanol para más tarde agregar 230 μ L de ABTS a cada pozo, realizando la muestra por triplicado. La lectura de la placa se realizó utilizando un espectofotometro (Thermo Scientific, MultiskanTM GO), manteniendo la placa en oscuridad y a temperatura ambiente. Los valores se compararon con una curva de calibración de trolox y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como μ mol equivalentes de trolox/g de muestra.

V.2.3 Extracción de oligosacáridos

La extracción de oligosacáridos se realizó a partir del grano y el café usado, mediante la técnica descrita por Díaz-Batalla, *et al.*, (2006). Se diluyeron 0.5 g de muestra, ambas variedades de café, en 10 ml de agua destilada en un matraz, y luego se colocaron en un baño de agua a 80 °C durante 1 h. Los extractos se centrifugaron y se filtraron a través de un filtro de 45 mm (PTFE Filtro Eco, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). El filtrado se almacenó protegiéndolo de la luz hasta su análisis.

V.2.3.1 Cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución

Los oligosacáridos se cuantificarán a partir del grano, el CU y cada uno de los extractos obtenidos en las diferentes etapas de la digestión. La muestra (20 μ L) se inyectó en un equipo Agilente modelo HP-1100 (Agilent, USA) equipado con un

detector de índice de refracción (DIR, 61362A), una precolumna Zorbax NH₂ (4.6 x 12.6 mm, 5µm) y una columna Zorbax (250mm x 4.6 mm). Una mezcla agua/acetonitrilo (65:35) se usó como fase móvil a 1mL/min. La temperatura del detector y de la columna se mantuvieron a 35 °C.

El área bajo la curva de los picos de retención obtenidos se interpolaron en una curva de calibración externa, donde se utilizaron estándares comerciales de rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Los resultados fueron expresados en mg por gramo de muestra liofilizada.

V.2.4 Cuantificación de melanoidinas

Para la obtención del estándar de melanoidinas se siguió el protocolo “Cost Action 919 Preparation of Standar Melanoidins”, para el modelo glucosa-glicina, tal y como mencionan Borrelli *et al.* (2002a) y Wagner *et al.* (2002), con adaptaciones. Las melanoidinas se sintetizaron en el laboratorio por calentamiento de 0.5 M de glucosa con 0.5 M de glicina a 90 °C y pH 5.5 durante 6 h. Se congeló la solución a -70 °C y se liofilizó. Más tarde se agregó nitrógeno líquido con la finalidad de obtener un polvo y poder preparar la curva estándar. La absorción máxima de las melanoidinas fue medido a 405 nm utilizando un espectrofotometro (Thermo Scientific, Multiskan™ GO).

Se continuó con 100 mg de muestra desgrasada de CU, ambos grados de tostado, la cual fue extraída en 5 ml de agua caliente (50-60 °C), se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 20 min, y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. El proceso se repitió dos veces.

Los extractos se sometieron a ultrafiltración usando un Microcon YM-10 con celulosa a 10KDa (Milliporee, Bedford) a 12000 rpm durante 10 min. La fracción retenida contendrá la porción de alto peso molecular, las cuales fueron recuperadas por la inversión del Microcon y fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 min. Finalmente, los materiales retenidos se disolvieron en 0.45 ml de agua destilada y se midió su absorbancia a 405 nm utilizado un espectrofotómetro como lo describe Silván *et al.*, (2010). La absorbancia debe estar entre 0.1 y 0.8 unidades de absorbancia. Las melanoidinas del café fueron cuantificadas empleando un

estándar extremo dentro de un rango de 0.1 – 1 mg/mL con la referencia de melanoidinas de café. Las muestras con niveles fuera de la curva de calibración deben ser diluidas 1:10. El contenido de melanoidinas fue expresado como mg/100g de materia seca soluble.

V.2.5 Digestión gastrointestinal

La digestión gastrointestinal consiste en una simulación *in vitro* del proceso digestivo, desde la boca hasta la fermentación en el colon, utilizando las muestras de CU con diferentes grados de tostado.

Los métodos de Grandfeldt *et al.* (1992), Patil *et al.* (2010), Stein *et al.* (2011) y Ma *et al.* (2012) serán seguidos, con las modificaciones y adaptaciones sugeridas por Campos-Vega *et al.* (2015) para imitar las condiciones fisiológicas

Se incluyó la participación de sujetos sanos y se emplearon intestinos de rata, por lo que el protocolo fue sometido y aprobado al Comité de Bioética de la UAQ y, los participantes firmaron voluntariamente un consentimiento informado.

V.2.5.1 Simulación de las condiciones de la boca

Primero, se contó con la participación de 4 individuos voluntarios sanos, a quienes se les explicó detalladamente el procedimiento a seguir y se les pidió que firmaran un consentimiento informado. Los sujetos consumieron su último alimento al menos 90 min antes del ensayo. Estos se enjuagaron la boca antes de iniciar la masticación de la muestra.

Los voluntarios masticaron 1 gramo de la muestra, el café usado, durante 15 veces por 15 segundos, vaciando el contenido en un vaso que contenía 5 mL de agua destilada. Inmediatamente los voluntarios se enjuagaron la boca por 60 segundos utilizando 5 mL de agua destilada para después depositarla en el mismo vaso. Posteriormente se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un solo vaso. Es necesario preparar un blanco, el cual contenía agua destilada en lugar de la muestra para el cual se realizó el mismo procedimiento.

V.2.5.2 Simulación de las condiciones del estómago

En esta sección 10 ml de la suspensión anterior se le añadió una solución HCl 2N con el objetivo de bajar el pH a 2.0. Además, se le añadió 0.055 g pepsina, la cual se disolvió en 0.94 ml de HCl 20mM. Finalmente, las muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C.

V.2.5.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Un extracto intestinal se prepara por disolución de 3 mg de hiel de Buey con 2.6 mg de pancreatina, los cuales fueron disueltos en 5 ml de solución tampón de Krebs-Ringer (la cual contiene 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucosa y 2.5 mM CaCl₂ con un pH 6.8). Esta solución (5 mL) se añadió a cada muestra y al blanco; la suspensión (15 mL) fue transferida a un recipiente que contenía un saco intestinal invertido.

V.2.5.3.1 Técnica del saco intestinal invertido

Para esta técnica es necesario un buen manejo antes y después del sacrificio, de los animales.

V.2.5.3.1.1 Manejo de los animales

Para esta técnica se utilizaron 4 ratas sanas macho de la cepa Sprague-Dawley (UNAM, Campus Juriquilla) con un peso entre 250 y 300, a las cuales se les verificó su peso, sexo y estado de salud; estas se colocaron en una jaula de acero inoxidable, permitiendo la entrada de aire y luz. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad (50 ± 10 %), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada (23 ± 2 °C) y con condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-200-199). Las ratas fueron alimentadas con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable. El

alimento se retiró 16 h antes del sacrificio, en donde solamente podían consumir agua *ad libitum*.

V.2.5.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas. Una vez anestesiadas se realizó una incisión abdominal en la línea media para la obtención de un segmento del intestino de alrededor de 20-25 cm, el cual fue segmentado con una longitud de 6 cm, colocándolo en una solución tampón de Krebs-Ringer, gasificado con CO₂ a 37 °C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución tampón para retirar residuos, y posteriormente se voltearon suavemente ligándolos por un extremo; es recomendable realizar este proceso en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer para evitar la pérdida de viabilidad del tejido. El intestino se llenó con 2 mL de la solución amortiguadora de Krebs-Ringer, para posteriormente ligar el otro extremo del intestino y de esta forma obtener un saco el cuál fue inmediatamente incubado en un baño conteniendo los 15 mL de la suspensión anterior (procedente de la simulación del estómago), a 37 °C por 2 horas, en agitación continua (80 ciclos por minuto) y en atmosfera anaerobia (CO₂). Más tarde se sometieron a un periodo de incubación, donde los sacos se retiraron para obtener la muestra contendida fuera del saco, a la cual se denominará fracción no digerible (FND), que fue sometida a fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

V.2.5.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio.

Los restos de los animales fueron almacenados en bolsas y colocados en un congelador (temperatura máxima 4 °C). La bolsa marcada se almacenó hasta su debido transporte e incineración (NOM-087- ECOL-SSA1-2002).

El material quirúrgico que se utilizó se dejó remojar con cloro 12 h, posteriormente se lavó y se esterilizó para su posterior almacenamiento.

V.2.5.3.2 Determinación del flujo de agua

El flujo de agua, resultado de la absorción y flujo de salida del agua en un sistema de saco intestinal invertido se determinó de acuerdo a lo descrito por (Fathia, 2008). El registro del peso generado de la técnica de saco intestinal invertido fue usado en la siguiente ecuación para determinar el flujo de agua. Los resultados fueron expresados como g de agua /g de intestino fresco.

$$\text{Flujo de agua} = (W3 - W2) / W1$$

W1 = peso del intestino invertido sin ligar (g).

W2 = peso del saco intestinal invertido ligado antes de la incubación (g).

W3 = peso del saco intestinal invertido después de la incubación (g).

V.2.6 Fermentación colónica

Este método de fermentación se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Campos-Vega *et al.* (2009). Se utilizó inóculo fecal humano como fuente de la microbiota representativa del colon, obtenido de al menos 2 individuos voluntarios sanos en su primera evacuación del día, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra. La inulina (100 mg) se empleó como control positivo de carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. Se prepararon tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que contenían (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico 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 g (previamente diluida en 5 mL de NaOH). Los tubos se sellaron y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 24 h. El inóculo fecal, 3 g de materia fresca, se homogeneizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1 M pH 7.0. Los tubos que contenían el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de homogeneizado fecal y se adicionó FND proveniente de muestra (0.5 g del precipitado sólido y 0.5 ml del sobrenadante

líquido), del blanco (1mL) e inulina (100 mg). Se agitaron los tubos con vortex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37 °C. El flujo de la mezcla de gases se mantuvo continuo hasta el término de la fermentación (24 h). Durante la fermentación se determinó el pH a las 0, 6, 12 y 24 h. Los productos de la fermentación colónica se almacenaron a – 70 °C hasta su análisis.

V.2.7 Actividad enzimática

La actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa de la microbiota intestinal se midieron en las muestras fecales de los productos de la la fermentación colónica para ambos grados de tostado como lo describe (An *et al.*, 2011).

V.2.7.1 Tratamiento de las muestras fecales

Los productos de la la fermentación colónica para ambos grados de tostado (0.1 g) se suspendieron en 0.9 ml de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 6.8 que contiene 0.5 % de cisteína). Los cuales fueron utilizados para los ensayos de las enzimas.

V.2.7.2 Ensayo de actividad de la β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se midió de una mezcla de reacción de 2 ml que contiene: 0.8 ml de 2 mM p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido y 0.2 ml de muestra fecal. La reacción se incubó durante 30 min a 37 ° C y luego se detuvo mediante la adición de 1 ml de NaOH 0.5 N. La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad enzimática se midió mediante el control de la absorbancia a 405 nm.

V.2.7.3 Ensayo de actividad de la β -glucuronidasa

La actividad β -glucuronidasa se midió de una mezcla de reacción de 2 ml que contiene: 0.8 ml de 2 mM p-nitrofenil- β -D-glucurónido y 0.2 ml de muestra fecal. La

reacción se incubó durante 30 min a 37 ° C y luego se detuvo mediante la adición de 1 ml de NaOH 0.5 N. La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad enzimática se midió mediante el control de la absorbancia a 405 nm.

V.2.7.4 Ensayo de actividad de la triptofanasa

La actividad de la triptofanasa se midió en una mezcla de reacción de 2 ml que contiene: 0.2 ml de una solución (2.75 mg de fosfato de piridoxal, 19.6 mg de EDTA disódico dihidrato y 10 mg de albúmina de suero bovino en 100 ml de 0.05 M buffer de fosfato de potasio, pH 7.5), 0.2 ml de triptófano 20 mM y 0.1 ml de la muestra fecal. La reacción se incubó durante 1 h a 37 ° C y luego se detuvo mediante la adición de 2 ml de solución de reactivo de color (14.7 g p-dimetilaminobenzaldehído en 52 ml de H₂SO₄ y 948 ml 95 % de etanol). La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad enzimática se midió mediante el control de la absorbancia a 550 nm.

V.2.7.5 Ensayo de actividad de la ureasa

Actividad de ureasa se midió en una mezcla de reacción de 0.5 ml que contiene: 0.3 ml de solución de sustrato de urea (4 mM de urea en 20 mM de buffer de fosfato de sodio, pH 7.0) y 0.1 ml de la muestra fecal. La reacción se incubó durante 30 min a 37 ° C y luego se detuvo mediante la adición de 0.1 ml de 1 N (NH₄)₂SO₄. Se añadió reactivo phenolnitroprusside (1 ml) y el reactivo de hipoclorito alcalino (NaClO, 1 ml) a la mezcla de reacción. Se incubaron durante 20 min a 65 ° C. La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad enzimática se midió mediante el control de la absorbancia a 603 nm.

V.2.8 Análisis molecular de la microbiota fecal

V.2.8.1 Extracción de material genético

Los pellets de materia orgánica, productos de la fermentación a las 6, 12 y 24 horas, fueron sometidos a extracción de DNA usando el kit comercial PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio), un sistema de extracción altamente eficaz (Christensen *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015). Para la extracción de DNA, se siguieron las recomendaciones del fabricante. La extracción física del material genético se realizó a 4000 rpm por 45 segundos en un equipo comercial PowerLyzer® 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer, (MoBio). La concentración y pureza del DNA fue evaluada con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El DNA obtenido fue utilizado para ensayos de PCR.

V.2.8.2 Técnica molecular RISA

Con la finalidad de amplificar genes en nuestras muestras, es necesario utilizar la taq DNA polimerasa, para esto se empleó la enzima comercial: *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version*. Los productos de la fermentación fueron sometidas a proceso de extracción de DNA usando el kit comercial PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio). La calidad del DNA fue evaluada como se describió anteriormente. Con la finalidad de reducir las sustancias inhibitorias, el DNA obtenido de cada alícuota fue diluido en proporciones 1:5. El DNA diluido se utilizó para determinar el perfil bacteriano y estimar los cambios producidos por los tratamientos por medio de ensayos de PCR, RISA, usando las siguientes condiciones: cada reacción consistió: 0-30 ng/μl de DNA, 50 mM KCl (BSA), 0.2 mM dNTP, 1 μM de cada iniciador (ITSF y ITSReub) diseñados por (Cardinale *et al.*, 2004) y 1.25 U Taq polimerasa. Para ambos iniciadores la PCR se realizó con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 s, alineación de 55 °C por 30 s, una extensión de 72 °C por 1 min y extensión final a 75 °C por 5 min. La PCR para cada gen se realizaron de forma independiente y los amplicones fueron mezclados antes de su análisis en geles de

agarosa a una concentración de 2 %. Cada pozo del gel fue cargado con 10 μ L de producto de PCR. Los geles fueron analizados con un fotodocumentador (MiniBis Pro). Para el análisis de datos se utilizó el programa Quantity One versión 4.6.1.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Composición proximal de los granos de café y café usado con dos diferentes grados de tostado

El contenido de proteína, lípidos, carbohidratos, cenizas y humedad tanto del GC (grano de café) y CU con dos diferentes grados de tostados se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química del grano grano de café y café usado con dos diferentes grados de tostado

	TOSTADO MEDIO		TOSTADO OSCURO	
	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ USADO	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ USADO
PROTEÍNA	19.1 ± 0.25 ^a	15.9 ± 0.52 ^b	18.9 ± 0.88 ^a	18.8 ± 0.25 ^a
LÍPIDOS	13.2 ± 0.86 ^b	17.9 ± 0.22 ^a	13.4 ± 0.43 ^b	17.5 ± 0.69 ^a
CARBOHIDRATOS	62.9 ± 1.15 ^a	64.6 ± 0.41 ^a	62.7 ± 0.42 ^a	62.2 ± 0.37 ^a
CENIZAS	4.7 ± 0.08 ^a	1.5 ± 0.30 ^b	4.7 ± 0.04 ^a	1.8 ± 0.02 ^b
HUMEDAD	1.4 ± 0.10 ^c	4.0 ± 0.07 ^b	1.8 ± 0.03 ^c	4.5 ± 0.19 ^a

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes ± ES, y son expresados como porcentaje (%) en base seca. Letras diferentes por fila muestran diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por prueba de Tukey.

El contenido de proteína no muestra diferencia significativa en cuanto al GC tostado medio (TM) (19.1 %), GC tostado oscuro (TO) (18.9 %) y CU del mismo grado de tostado (18.8 %). Así mismo se ha reportado que el contenido de proteína en el CU es 13.6 % después de la preparación de café soluble (Mussatto, *et al.*, 2011c). Ballesteros *et al.* (2014) reportaron en el CU valores de 17.44 %. Los porcentajes de proteínas obtenidos en el presente trabajo son ligeramente mayores a lo reportado por los autores, estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones utilizadas para la preparación de café instantáneo y la variedad de granos de café utilizado (Mussatto *et al.*, 2011a). El total de los compuestos de nitrógeno del café son relativamente estables entre las especies o incluso durante el tostado, los cuales oscilan entre 8.5 hasta 13.6 % (Belitz *et al.*, 2004). Sin embargo podemos observar en los resultado, el tostado influye sobre la retención de proteína en el CU siendo este valor mayor en el tostado oscuro.

Durante el proceso con agua para la preparación de la bebida de café, muchos de los otros componentes se extraen, y, como consecuencia, los componentes no extraídos concentran su proporción en el material sólido residual. Por lo tanto, el contenido de proteína es mayor en el CU que en GC, en el TO. Es importante mencionar que como se calculó el contenido de proteína a partir del contenido de nitrógeno total de las muestras, por lo que puede ser sobreestimado, debido a la presencia de otras sustancias que contienen nitrógeno (cafeína, trigonelina, aminas libres y aminoácidos) (Delgado *et al.*, 2008).

El contenido de lípidos es mayor para el CU en ambos tipos de tostado encontrándose para el tostado medio valores de (17.9 %) y para el TO valores de (17.5 %) en comparación con los valores obtenidos para los GC.

El café tostado está compuesto por 11-20 % de lípidos, presentando cantidades más altas en la variedad arabica (14-20 %) que en la robusta (11 a 16 %) (Folstar *et al.*, 1985). Las bebidas de café son generalmente pobres en lípidos, ya que estos no se extraen de manera eficiente en un entorno acuoso (Ratnayake *et al.*, 1993).

Cruz *et al.* (2012) han reportado valores que van desde 9.3 hasta 16.2 %, los cuales se encuentran dentro de los descritos para el café tostado, lo que confirma que la mayoría de los lípidos son retenidos en el CU. Además Kondamudi *et al.* (2008) reportaron valores similares para el CU que van 10-15 %, así como los de Tokimoto *et al.* (2005) quienes reportan valores que van desde 6.2 a 14.5 %. Los valores reportados para CU en este trabajo superan los valores obtenidos de una industria de café soluble descritos por Couto *et al.* (2009) mostrando valores del 15.4 % y por los reportados por Saura-Calixto (2011) con valores 14 %. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la variedad de café, al tipo de tostado, así como al proceso de extracción.

Sin embargo, a pesar de las altas temperaturas y presiones utilizadas durante extracciones industriales, los lípidos se conservan principalmente en los residuos de café (Cruz *et al.*, 2012), esto está relacionado con los valores obtenidos en este proyecto, donde el CU muestra valores más altos en comparación con el CG, esto se debe a que los lípidos no son solubles en agua, por lo que quedan

atrapados en el residuo de café, además durante el proceso de percolación se arrastran otros componentes contribuyendo al aumento de los valores del CU. El rendimiento del aceite del CU utilizando Soxhlet, es una función de las condiciones de extracción, en particular de la elección del solvente y la duración de la extracción (Couto *et al.*, 2009).

Uno de los constituyentes más abundantes para el grano como para el CU son los carbohidratos. Los residuos de café se polimerizan en las estructuras de celulosa y hemicelulosa, correspondiendo a 51.50 y 40.45 % (w / w), respectivamente en su composición en base de peso seco, siendo la hemicelulosa la que se encuentra en mayor proporción en el CU. La manosa es el principal azúcar en la hemicelulosa del CU y la xilosa no se encuentra presente en este (Ballesteros *et al.*, 2014).

Los valores obtenidos en este trabajo no presentan diferencia estadísticamente significativa, siendo el CU/TM el que presenta una mayor proporción con un 64.6 %, además de que se encuentran por arriba de lo reportado por otros autores.

De acuerdo con Ballesteros *et al.* (2014), la composición de azúcares presentes en el CU se compone de 37.03 % manosa, galactosa 31.90 %, 24.08 % de glucosa y 6.99 % de arabinosa. Estos valores son comparables a otros reportados en la literatura para CU (Mussatto *et al.*, 2011b; Mussatto, *et al.*, 2011c); algunas diferencias podrían atribuirse al proceso de extracción y la variedad de granos de café usados. Es importante mencionar que los arabinogalactanos, galactomananos, y la celulosa son los más abundantes polisacáridos en el café (Arya y Rao, 2007).

Además de los carbohidratos, otro de los componentes son las cenizas las cuales muestran una diferencia estadísticamente significativa del GC con el CU, presentándose un mayor contenido de cenizas en los GC para ambos grados de tostado (4.73 y 4.72 %, TM y TO respectivamente). En cuanto al contenido de cenizas en el CU de este trabajo se obtuvo un valor de (1.5 % y 1.8 %, TM y TO, respectivamente), lo que se asemeja a los valores reportados por Ballesteros *et al.* (2014) donde obtuvo valores de (1.30 % w / w) en cenizas en el CU.

Las cenizas presentes en el CU están constituidas por varios minerales y éstos son considerados micronutrientes esenciales. El potasio es el elemento más abundante, seguido de fósforo y magnesio (Mussatto *et al.*, 2011b). El potasio es también el elemento más abundante en granos de café, que corresponde a 40 % de la ceniza de óxido (Arya y Rao, 2007). Después de la extracción con agua caliente para el café instantáneo a preparar, la mayoría de los elementos minerales son fácilmente extraídos (Arya y Rao, 2007), pero CU todavía contiene potasio como compuesto predominante.

El contenido de humedad como era de esperarse fue estadísticamente mayor para el CU para ambos grados de tostado, obteniendo un valor de 4.0 % y 4.5 %, TM y TO, respectivamente, los cuales son valores más bajos reportados por la literatura por Cruz *et al.*, (2014) quienes reportaron un contenido de humedad variable, con valores que van desde 53.0 hasta 69.8 % dentro de los reportados para café expreso y usado. Se cree que los valores presentados en este trabajo son menores debido al secado previo al que es sometido el café antes del análisis, sin embargo se cree que un valor más alto en CU en comparación con GC se debe a que este se humedece al momento de realizar la percolación para la preparación la bebida.

El CU húmedo es muy propenso a la proliferación microbiana, por lo que es necesario implementar estrategias de preservación adecuadas para el uso final deseado.

De acuerdo con la norma mexicana: NMX-F-013 las especificaciones físicas y químicas del café puro tostado en grano o molido, sin descafeinar o descafeinado coinciden con los valores reportados encontrándose dentro de los parámetros. Además, es importante mencionar que los valores reportados en este trabajo respecto a los valores reportados en la literatura muestran diferencias, esto se sugiere debido al tipo y variedad del café, así como el proceso, el tiempo y la temperatura utilizada.

VI.2 Contenido de fibra dietética de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado

El contenido de fibra total (FT), soluble e insoluble tanto del GC y CU con dos diferentes grados de tostados se presenta a continuación en el Cuadro 2. En el contenido de fibra total se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los GC y el CU de los diferentes tostados, encontrando los valores más altos para el CU con un 58.1 y 55.1 % en el TM y TO, respectivamente.

Cuadro 2. Contenido de fibra dietética del grano y café usado de dos diferentes grados de tostado.

	TOSTADO MEDIO		TOSTADO OSCURO	
	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ USADO	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ USADO
FIBRA INSOLUBLE	44.1 ± 0.95 ^b	56.6 ± 0.40 ^a	44.3 ± 1.29 ^b	54.1 ± 1.48 ^a
FIBRA SOLUBLE	1.5 ± 0.44 ^a	1.4 ± 0.14 ^a	1.6 ± 0.04 ^a	0.9 ± 0.25 ^a
FIBRA TOTAL	45.7 ± 1.03 ^b	58.1 ± 0.55 ^a	45.9 ± 1.27 ^b	55.1 ± 1.71 ^a

Cada valor representa el promedio de tres experimentos ± ES y son expresados como porcentaje (%) en base seca por gramo de muestra. Letras diferentes por fila indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Asimismo, los contenidos de fibra insoluble fueron estadísticamente significativos mostrando valores mayores para el CU con ambos grados de tostado con valores de 56.6 y 54.1 % para TM y TO respectivamente. Los resultados de la fibra soluble no muestran una diferencia estadística significativa, pero presentándose un contenido mayor para los GC con valores de 1.5 y 1.6 %, TM y TO, respectivamente.

La fibra dietaria incluyendo celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pécticas y mucílagos se conoce como la parte comestible de plantas que es resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con la fermentación completa o parcial en el intestino grueso (*Betancur-Ancona et al., 2004*). Ballesteros *et al.* (2014) reportó valores para fibra dietaria total de (60.46 %

w / w), siendo la fibra insoluble la que representa alrededor del 84 % y la fibra soluble de un 16 %. El mayor contenido de fibra insoluble en relación con la soluble es justificable en las muestras debido a la presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina que son parte de la fibra insoluble y cantidades considerables de esta fracción en están presentes tanto para el CG como el CU. Además los valores más altos de fibra insoluble del CU con relación con el GC, es debido a que, durante el proceso de la preparación de la bebida, ciertos componentes como las proteínas se pierden, por lo que queda más concentrado otros, entre ellos la fibra total.

Los residuos de café, entre ellos, el CU muestran un total de fibra del 43 %, de la cual el 35 % es insoluble y el 8 % es soluble, se sugiere que la fibra insoluble podría ser utilizada directamente en productos de alimentos (Murthy y Naidu, 2012). El total de fibra dietaria coincide con los resultados reportados en este trabajo. El valor de fibra dietaria de los subproductos del café, entre ellos, el CU muestran similitud con los cereales y verduras (Figuerola *et al.*, 2005). Murthy y Naidu (2012) mostraron que las fibras del café expresan propiedades antioxidantes. La sinergia de la capacidad antioxidante y el complejo de fibras de los subproductos de café, como el de cereales, atribuyen a efectos beneficiosos que solo una fracción de fibra.

El tostado tiene también un impacto en la cantidad de fibra dietética soluble presente en los granos de café. Silván *et al.* (2010) encontró un aumento en los granos de café tostado en comparación con el café verde.

El CU al tener un 35 % de fibra insoluble este podría ser utilizado directamente en productos alimenticios que contribuyan a la estabilización de la estructura de los alimentos. Destacando que el contenido de FT en los subproductos del CU parecen estar a la par con los cereales y verduras (Figuerola *et al.*, 2005).

VI.3 Capacidad antioxidante de los granos de café y café usado con diferente grado de tostado

A partir de los extractos etanólicos de cada una de las diferentes muestras se le determinó la capacidad antioxidante por dos métodos diferentes, ABTS y DPPH, los resultados se presentan a continuación en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Capacidad antioxidante en grano de café y café usado con diferentes grados de tostado.

	TOSTADO MEDIO		TOSTADO OSCURO	
	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ USADO	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ USADO
DPPH	69.23 ± 1.22 ^b	73.92 ± 2.00 ^a	68.81 ± 1.30 ^b	72.46 ± 1.01 ^a
ABTS	70.89 ± 1.64 ^b	80.55 ± 0.73 ^a	70.16 ± 1.94 ^b	80.13 ± 0.51 ^a

Letras diferentes por fila expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por las pruebas de Tukey. La actividad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como $\mu\text{moles eq de trolox/g}$ de muestra. Los resultados representan la media de tres experimentos por triplicado \pm ES.

Los resultados muestran mayor capacidad antioxidante en el CU de los dos grados de tostado por ambos métodos: ABTS y DPPH, obteniendo valores de 73.92 y 72.46 $\mu\text{moles eq de trolox/gramos}$ de muestra, TM y TO, respectivamente en DPPH. En lo que respecta a la capacidad antioxidante evaluada por el método de ABTS, se presentó la misma tendencia que para el método de DPPH donde el CU de ambos grados de tostado muestran mayor capacidad antioxidante que sus homologas de GC, mostrando resultados de 80.55 y 80.13 $\mu\text{moles eq de trolox/gramos}$ de muestra, TM y TO, respectivamente. Los altos valores de ABTS tanto del GC como del CU refleja la sensibilidad de ABTS a romper la cadena de potencial antioxidante de sus compuestos fenólicos. Además los valores de DPPH, así como los del ABTS obtuvieron mayor capacidad antioxidante en el tostado medio con respecto al tostado oscuro, sin embargo en los resultados el tostado no tiene influencia estadística por ambas técnicas, sugiriendo que la capacidad antioxidante depende más de la composición de café que del grado de tostado, como se sugirió previamente (Campos-Vega *et al.*, 2015). Además la capacidad antioxidante esta influenciada por la presencia de melanoidinas y algunos compuestos coloreados los cuales poseen actividad antioxidante (López-Galilea *et al.*, 2007).

Bravo *et al.* (2012), evaluaron la capacidad antioxidante del CU obtenido de la percolación, presentando valores en café arabica por las técnicas de ABTS y DPPH de 215.12 y 112.06 $\mu\text{mol trolox/gramo}$ de muestra, respectivamente valores más elevados a los reportados en este trabajo. Bravo *et al.* (2013), evaluaron esta capacidad en el CU en un extracto etanólico, obteniendo valores de 140.30 y 82.40 $\mu\text{mol trolox/gramo}$ de muestra, ABTS y DPPH respectivamente. Los resultados de

DPPH son similares a los presentados en este trabajo con 73.92 y 72.46 μmol trolox/gramo de muestra para CU/TM y CU/TO, respectivamente. Sin embargo, para la técnica de ABTS los valores fueron menores. Por lo que Bravo *et al.* (2012) siguieren tomar en cuenta que los compuestos fenólicos minoritarios (ácidos hidroxicinámicos, ácidos feruloiquinicos, y otros ácidos clorogénicos) y compuestos no fenólicos (volátiles, etc.) pueden contribuir a la capacidad antioxidante. Además de que la capacidad antioxidante puede contribuir a la conservación de café contra el daño oxidativo durante todo el tiempo de almacenamiento.

La capacidad antioxidante del café después del tostado, se cree que aunque se pierdan compuestos con capacidad antioxidante durante este proceso, esta capacidad se mantiene o incluso aumenta debido a la formación de nuevos compuestos con actividad antioxidante, como los productos de la reacción de Maillard (Del Castillo, *et al.*, 2002; Votavová *et al.*, 2009). Pérez-Hernández *et al.*, (2013) reporta valores de 238.71 μmol equivalentes trolox/gramo de muestra en GC con la técnica de ABTS, asimismo Pérez-Martínez *et al.*, (2010) reportó valores entre 296 - 445 μmoles eq trolox/gramo de muestra, para ambos casos lo valores fueron mayores a lo reportado en este trabajo.

Campos-Vega *et al.* (2015) reportan valores más elevados por ambas técnicas, por ABTS de 243.7 y 78.2 μmoles eq de trolox/gramos de muestra, TM y TO respectivamente, mientras que para DPPH valores de 107.4 y 387.3 μmoles eq de trolox / gramos de muestra TM y TO respectivamente. Las diferencias de la actividad antioxidante entre cafés, se pueden deber a varios factores como el tipo de café, las diferentes condiciones geográficas y climatológicas en donde crecen las plantas (Materska y Perucka, 2005).

Los resultados de la capacidad parecen ser atribuidos al equilibrio entre los ácidos cafeiloquinicos, más abundante en CU variedad arabica y la cafeína; y ciertos compuestos productos de la reacción de Maillard que son mas representativos para el café Robusta (Bravo *et al.*, 2012). Otros autores han encontrado altas correlaciones entre la capacidad antioxidante de las bebidas de café y la cafeína, sugiriendo que la cafeína podría contribuir a la capacidad

antioxidante (Ludwig *et al.*, 2012, Vignoli *et al.*, 2011), sin embargo otros autores lo han encontrado en el contenido de melanoidinas (Delgado-Andrade *et al.*, 2005).

Murthy y Naidu (2012) reportaron que el CU muestra una capacidad antioxidante de 61, 66 y 70 % en 100, 200, y 500 ppm respectivamente, sugiriendo que los resultados podrían estar relacionados con el ácido clorogénico (CGA, por sus siglas en inglés), el cual presenta actividad antioxidante debido a sus propiedades de quelación de cationes (Robertson y Eastwood, 1981), sin embargo otros compuestos fenólicos también podrían contribuir a esta actividad.

Algunos autores han demostrado en los residuos de café que la capacidad antioxidante es atribuida a los compuestos fenólicos y no fenólicos (Murthy y Naidu, 2012; Ramalakshmi *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2005). Por otra parte los factores tecnológicos juegan un papel importante en la extracción de antioxidantes durante el proceso de elaboración de la bebida de café, y en consecuencia, puede tener influencia en la presencia de compuestos antioxidantes presentes en el CU (Andueza *et al.*, 2007; Pérez-Martínez *et al.*, 2010).

VI.4 Contenido de oligosacáridos del grano de café y café usado con dos diferentes grados de tostado.

En el Cuadro 4 se muestra el contenido de oligosacáridos, entre ellos, rafinosa, estaquiosa y verbascosa, los cuales fueron determinados por HPLC tanto para el grano de café, como el CU de dos grados de tostado.

Cuadro 4. Contenido de oligosacáridos, determinados por HPLC, en el grano de café y café usado

Muestra	Oligosacáridos					
	Rafinosa		Estaquiosa		Verbascosa	
	TO	TM	TO	TM	TO	TM
GC	0.86 ± 0.01 ^a	0.65 ± 0.03 ^c	0.65 ± 0.02 ^c	0.66 ± 0.00 ^c	0.73 ± 0.00 ^b	0.66 ± 0.01 ^c
CU	ND	ND	0.68 ± 0.02 ^a	0.69 ± 0.01 ^a	0.68 ± 0.01 ^a	0.66 ± 0.03 ^a

GC = Grano de café. CU = Café usado. TO = Tostado oscuro. TM = tostado medio. ND= No detectado. Letras diferentes por fila expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. La concentración de oligosacáridos son expresados en mg equivalentes de rafinosa, estaquiosa y verbascosa por gramo de muestra, respectivamente. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Dentro de los oligosacáridos se encuentran los galactosil-sucrosas (denominados α -galactósidos) y fructo-oligosacáridos. La familia de los galactosil-sucrosa de lo oligosacáridos incluye la rafinosa (un trisacárido), la estaquiosa (un tetradisacárido) y la verbascosa (un pentadisacárido) (Nations, 1999), los cuales estas formados de la unión de monosacáridos. Los oligosacáridos son omnipresentes en el reino vegetal, encontrándose en una gran variedad de semillas de diferentes familias, ocupando el segundo lugar después de sacarosa en abundancia como carbohidratos solubles. Los seres humanos y otros animales monogástricos (cerdo y aves de corral) no poseen la enzima α -galactosidasa para descomponer los oligosacáridos, por lo que pasan por el estómago y el intestino delgado sin ser digeridos; en el intestino grueso son fermentados por las bacterias productoras de gas que poseen la enzima α -galactosidasa produciendo el dióxido de carbono, el metano o hidrógeno; por lo que estos tres oligosacáridos son sustrato prebiótico de los microorganismos de la flora intestinal y en cantidades excesivas pueden provocar flatulencia, inflamación y dolor intestinal (Hernández Rodríguez *et al.*, 1999). La rafinosa, estaquiosa y verbascosa están presentes en cantidades significativas en las semillas de leguminosas. Sin embargo, la rafinosa es la más común entre los tres; esta compuesta de una molécula de glucosa unido a una molécula de sacarosa a la posición α -1,6. Además, una elongación al final de la cadena de galactosa junto con otra molécula de galactosa formara la estaquiosa (Nations, 1999). Campos-Vega *et al.*, (2009) evaluaron el contenido de contenido de polisacáridos en el frijol cocido reportándose entre 36.5 % to 55 %, valores más altos que el 22 % al 26 % reportado por 10 diferentes variedades de frijol cocido de América Latina (Granito *et al.*, 2001).

Se puede observar en este estudio que el componente mayoritario para el grano de café es la rafinosa con un valor de 0.86 mg equivalentes de rafinosa/g de muestra. En cambio, para el CU solo se detecto estaquiosa y verbascosa, observando que el grado de tostado no influye sobre el contenido de estos compuestos al no mostrar diferencia estadística significativa. Chabrilange *et al.*, (2000) evaluaron el contenido de oligosacáridos en 10 diferentes especies de café encontrando que rafinosa se detectó en las semillas de cinco especies, entre ellos C.

arabica con un valor de 0.29 mg/g de muestra, los cuales son valores más bajos a los encontrados en este trabajo. De igual forma el contenido de estaquiosa fue evaluado, encontrando en *C. arabica* valores de 0.68 mg/g de muestra, los cuales son similares a lo reportado; sin embargo, verbascosa no fue detectada.

En algunos granos de leguminosas se han informado contenidos de oligosacáridos, por ejemplo: Martínez-Villaluenga *et al.* (2005) reportaron el contenido de oligosacáridos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la planta lupinus, sugiriendo que las semillas de *L. luteus* son la mejor opción para la obtención de oligosacáridos puros para su uso como prebióticos en alimentos funcionales. Cruz-Bravo *et al.* (2011) evaluaron el contenido de rafinosa, estaquiosa y verbascosa en el frijol Negro 8025 encontrando que la estaquiosa fue el principal oligosacárido en frijol cocido, seguido por verbascosa y rafinosa, sugiriendo que el contenido elevado en oligosacáridos de la leguminosa cocida se debe a que probablemente hubo mayor lixiviación de los componentes solubles y a la liberación de oligosacáridos unidos durante la cocción (Han y Baik, 2006). Situación que podría explicar el aumento de la cantidad de oligosacáridos en el contenido de CU en comparación con el GC, pues se sugiere que este aumento está relacionado con el proceso de percolación con agua caliente para la obtención del café usado. También se ha informado que los oligosacáridos unidos a través de la hidrólisis no enzimática se liberan de macromoléculas durante la cocción, dando como resultado un aumento en el contenido de oligosacáridos (Jambunathan *et al.*, 1994; Trugo *et al.*, 2000).

Campos-Vega *et al.* (2009) evaluaron el contenido de rafinosa, estaquiosa y verbascosa en el frijol común (*P. vulgaris*), quienes encontraron que estaquiosa fue el oligosacárido principal seguido de rafinosa y verbascosa en los granos crudos y cocinados de todas las variedades utilizadas. El contenido de rafinosa en el frijol crudo varió desde 0.3 - 1.7 mg/g y en las semillas de frijol cocida se obtuvo de 0.5 - 2.5 mg/g. El contenido de estaquiosa en semillas de frijol fue desde 2.7 - 4.9 y en las muestras cocidas de 4.7 - 8 mg/g. Se observó un mayor contenido de estaquiosa en todas las muestras analizadas. El contenido de verbascosa en las semillas de frijol varió de 0.1 - 0.8 mg/g y 0.2 a 0.9 mg/g para el

frijol cocido. Semillas de frijol Negro 8025 y Azufrado Higuera mostró un aumento del contenido de verbascosa después de ser procesado (0.1 - 0.9 y 0.2 - 0.5 mg/g, respectivamente); mientras que Bayo Madero mostró una disminución del contenido de verbascosa (0.8 - 0.2 mg/g). Pinto Durango no mostraron cambios en verbascosa después del tratamiento térmico. Estos valores son similares a lo reportado por (Díaz-Batalla *et al.*, 2006). Además de ser similares a lo reportado en este trabajo. Sin embargo, hasta el momento no se encuentra reportado valores de oligosacáridos en café usado.

VI.5 Contenido de melanoidinas del grano de café y café usado con dos diferentes grados de tostado.

Cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento se aplicó para separar los polímeros de alto peso molecular solubles, además se siguió un método espectrofotométrico para evaluar el contenido de melanoidinas en extractos de café. Las melanoidinas son compuestos poliméricos aniónicos marrones con una masa molecular aparente >10 kDa, que absorben en el intervalo entre 400 y 450 nm, encontrándose el óptimo a los 405 nm. En el Cuadro 5 se muestra el contenido de melanoidinas, los cuales fueron determinados por espectrofotometría-UV tanto para el GC, como el CU de dos grados de tostado.

Cuadro 5. Contenido de melanoidinas en el grano de café y café usado

Muestra	Melanoidinas	
	TOSTADO OSCURO	TOSTADO MEDIO
GRANO DE CAFÉ	17.76 ± 0.33 ^{Aa}	17.85 ± 0.32 ^{Aa}
CAFÉ USADO	8.77 ± 0.31 ^{Ba}	9.11 ± 0.21 ^{Ba}

Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. La concentración de melanoidinas son expresados en en g/100g de melanoidinas. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

El contenido de melanoidinas de alto peso molecular (APM, por sus siglas en inglés) obtenidas en el GC fueron mayor a las del CU (17.76 y 17.85 g de melanoidinas/100g en GC, TO y TM, respectivamente), mostrando los valores más

altos en TM, pero sin mostrar diferencia estadística significativa. Sin embargo, el contenido de melanoidinas se reduce casi en un 50% para el CU lo cual sigue siendo un valor favorable. Silván *et al.* (2010) evaluaron el contenido de melanoidinas en el grano de café que van desde condiciones de tostado ligero hasta el oscuro observando un aumento de 5.6 a 29.1 mg/100 mg de materia seca al incrementar el tostado, por lo que nuestros resultados se encuentran dentro del rango reportado. Además, se sugiere que valores más altos para TM en comparación con TO se deben probablemente a la formación de estructuras insolubles que no se pueden extraer en el agua y no estarán presentes en la bebida.

Pastoriza y Rufián-Henares (2014) determinaron el contenido de melanoidinas en alimentos procesados térmicamente que se consumen regularmente en la dieta, entre ellos se encontró el café, reportando que la cantidad de melanoidinas en café regular (5.7 %) fue significativamente menor que los valores en el café soluble (9.1 %), lo que podría explicarse por el proceso de concentración de sólidos incluidos en la producción de café soluble (Vignoli *et al.*, 2011); debe considerarse que al usar un sistema de filtración de tipo filtro, se extraen menos melanoidinas de café sólido que las máquinas de café (Fogliano y Morales, 2011).

Las melanoidinas, en particular las melanoidinas del café tienen diferentes propiedades funcionales aparte de su contribución con el color, como lo es su capacidad antioxidante en los alimentos y la supresión del estrés oxidativo en las células, las propiedades quelantes de metales, la actividad antimicrobiana, entre otros (Delgado-Andrade *et al.*, 2005; Goya *et al.*, 2007). Es importante tomar en cuenta que el contenido de melanoidinas varía de acuerdo con el origen del café y por el método de secado aplicado. Las melanoidinas de café han sido el objetivo de muchas investigaciones, debido a que la bebida de café es una de las principales fuentes de melanoidinas representando hasta un 25 % de los sólidos totales (Borrelli *et al.*, 2002b). Es por esto nuestro interés en conocer el contenido de melanoidinas en CU. Hasta el momento el contenido de melanoidinas en CU no se encuentran reportado en la literatura.

VI.6 Capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos diferentes grados de tostado

En el Cuadro 6 se muestra la capacidad antioxidante determinada por las técnicas de DPPH y ABTS de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del CU.

Después de someter al CU, de ambos grados de tostado, a una digestión gastrointestinal y a una fermentación colónica *in vitro* (empleando microbiota de un sujeto con sobrepeso (SP) y uno con peso normal (PN)), se evaluó su capacidad antioxidante con el fin de observar su comportamiento a lo largo del tracto gastrointestinal.

Cuadro 6. Capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del café usado de dos diferentes grados de tostado.

Muestra	Capacidad antioxidante			
	DPPH		ABTS	
	TOSTADO MEDIO	TOSTADO OSCURO	TOSTADO MEDIO	TOSTADO OSCURO
Café usado	73.92 ± 2.00 ^{D_b}	72.46 ± 1.01 ^{D_c}	80.55 ± 0.73 ^{C_a}	80.13 ± 0.51 ^{C_a}
Boca	55.63 ± 1.90 ^{F_c}	44.64 ± 2.47 ^{G_d}	87.73 ± 2.07 ^{B_a}	82.70 ± 0.93 ^{B_b}
Estómago	121.38 ± 1.91 ^{C_b}	93.76 ± 4.34 ^{C_c}	178.70 ± 5.24 ^{A_a}	174.52 ± 1.99 ^{A_a}
Intestino Delgado (Apical)				
15 min	148.53 ± 4.47 ^{A_a}	117.21 ± 3.29 ^{A_b}	54.45 ± 5.00 ^{D_c}	40.79 ± 2.67 ^{D_d}
30 min	132.43 ± 5.17 ^{B_a}	109.29 ± 4.93 ^{B_b}	23.16 ± 2.53 ^{E_c}	25.80 ± 1.65 ^{E_c}
60 min	144.31 ± 3.09 ^{A_a}	117.58 ± 5.67 ^{A_b}	15.87 ± 0.38 ^{F_c}	9.39 ± 1.31 ^{G_d}
Fermentación colónica (peso normal)				
6 h	61.39 ± 3.12 ^{E_a}	57.46 ± 2.61 ^{F_b}	5.45 ± 1.04 ^{H_c}	4.06 ± 1.10 ^{H_c}
12 h	75.76 ± 5.10 ^{D_a}	65.77 ± 6.40 ^{E_b}	10.00 ± 1.36 ^{G_c}	7.94 ± 1.16 ^{G_c}
24 h	52.10 ± 5.19 ^{F_a}	48.26 ± 5.81 ^{G_a}	17.56 ± 1.71 ^{F_b}	15.40 ± 2.85 ^{F_b}
Fermentación colónica (sobrepeso)				
6 h	52.10 ± 4.17 ^{F_a}	48.84 ± 1.98 ^{G_b}	3.31 ± 0.65 ^{H_c}	2.61 ± 0.95 ^{H_c}
12 h	36.55 ± 5.18 ^{G_a}	33.26 ± 4.31 ^{H_a}	2.70 ± 0.67 ^{H_b}	3.14 ± 0.82 ^{H_b}
24 h	61.54 ± 2.42 ^{E_a}	55.35 ± 4.07 ^{F_b}	3.01 ± 0.68 ^{H_c}	2.31 ± 0.77 ^{H_c}

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidracil. ABTS = ácido 2,2'-azinobis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico). Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por las pruebas de Tukey. Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa ($\alpha =$

0.05) por las pruebas de Tukey. La actividad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como $\mu\text{moles eq de trolox/g de muestra}$. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Por la técnica de DPPH, se observa que la mayor capacidad antioxidante se obtiene en el intestino delgado (apical) a los 15, 30 y 60 min, para ambos tipos de tostado; estos valores son mayores al CU evaluado antes de ser sometido a la digestión gastrointestinal *in vitro*, lo que sugiere que las enzimas presentes en la boca, estómago e intestino delgado hidrolizan la muestra para permitir que los compuestos, como los polifenoles estén disponibles. Esto refleja el orden de la contribución fenólica antioxidante en el ensayo de DPPH, donde los monómeros fenólicos (ácidos caféico, ferúlico e isoferúlico) se metabolizan y rápidamente son absorbidos en el tracto gastrointestinal, apareciendo rápidamente en el plasma (entre 0.5 y 2 h). Más tarde la microbiota colónica metaboliza los taninos poliméricos gastrointestinalmente estables a los principales metabolitos en plasma humano (ácidos dehidroferulicos y dihidrocaffaicicos) que son reabsorbidos en el colon (Renouf *et al.*, 2014). Los resultados demuestran que los polifenoles del CU son liberados durante la digestión gastrointestinal simulada, además de tener potencial para eliminar los radicales libres. La actividad antioxidante en el intestino delgado probablemente, sugiere la presencia de ácidos clorogénicos libres fácilmente metabolizables y debido a que estos contribuyen con la actividad antioxidante (Mullen *et al.*, 2013). Durante la fermentación colónica de PN y SP se muestra diferencia estadística a las 6 12 y 24 h de fermentación. Así mismo el tostado influye en la liberación de los compuestos fenólicos al mostrar diferencia estadística entre el TM y TO. Nuestros resultados demuestran que los polifenoles del CU son liberados durante la digestión gastrointestinal simulada para eliminar los radicales libres.

Por la técnica de ABTS, la mayor capacidad antioxidante se obtuvo en el estómago con valores de 178.70 y 174.52 $\mu\text{moles eq de trolox/g de muestra}$ para el TM y TO, respectivamente, esto concuerda con lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2015), donde el TO muestra la mayor actividad antioxidante. Además se puede observar en esta misma técnica existe diferencia estadística significativa para la microbiota de PN a las 6, 12 y 24 h de fermentación colónica, sin embargo para

la microbiota de SP no se muestra diferencia estadística significativa, estos resultados son similares a lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015) donde se mostró que existe diferencia estadística durante la fermentación colónica. En comparación con la técnica DPPH, la técnica de ABTS muestra que el tostado no influye en la capacidad antioxidante durante la fermentación con ambas microbiota, debido a que no se muestra diferencia estadística significativa.

En resumen, la actividad antioxidante medida por la técnica de DPPH durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* aumentó en el siguiente orden: boca < fermentación colónica (sobrepeso) < fermentación colónica (peso normal) < estómago < intestino delgado; el orden para el ensayo ABTS fue: fermentación colónica (sobrepeso) < fermentación colónica (peso normal) < intestino delgado < boca < estómago. Mostrando que existen diferente actividad antioxidante a lo largo del tracto gastrointestinal y por ambas técnicas, por lo que la capacidad antioxidante liberada en las diferentes etapas proporciona beneficios para la salud sistémica en diferentes tejidos y órganos del cuerpo. Por la técnica de DPPH el comportamiento fue similar a lo reportado por García-Gutiérrez (2015), sin embargo por la técnica de ABTS la actividad antioxidante fue diferente.

En plantas, la mayoría de los polifenoles se producen en sus formas glicosiladas, aunque también se encuentran modificaciones tales como esterificación o la polimerización. Una vez ingerido, los polifenoles son reconocidos por el cuerpo humano como xenobióticos, y por lo tanto su biodisponibilidad es relativamente baja en comparación con los micro y macronutrientes. Más aún, dependiendo de su grado de complejidad estructural y la polimerización, estos compuestos pueden ser fácilmente absorbidos en el intestino delgado (es decir, los polifenoles de bajo peso molecular tales como las estructuras monoméricas y diméricas) (Appeldoorn *et al.*, 2009) o alcanzar el colon casi sin cambios (Bosscher *et al.*, 2009; Manach *et al.*, 2005). Se ha estimado que sólo el 5-10 % de la ingesta total de polifenoles se absorbe en el intestino delgado. Los polifenoles restantes (90-95 % de la ingesta total) pueden acumularse en el intestino luminal (junto con los conjugados se excretan en el lumen intestinal a través de la bilis), que se someten a las actividades enzimáticas de la microbiota intestinal. La microbiota colónica es

responsable del metabolismo de las estructuras polifenolicas originales para formar una serie de metabolitos fenólicos de bajo peso molecular que, una vez absorbidos, podrían ser responsable de los efectos sobre la salud derivados del consumo de alimentos rico en polifenoles (D'Archivio *et al.*, 2007; Jacobs, *et al.*, 2009; Manach, *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2009). Los efectos protectores de las manzanas se han atribuido principalmente a sus propiedades anti-oxidantes, estas han mostrado contener varios fitoquímicos relacionados con el efecto protector en el cáncer (Liu, 2004). Por lo que los componentes fenólicos de manzanas estan relacionados con la inhibición de cáncer de colon, siendo Eberhardt *et al.* (2000) quienes reportan que los extractos de manzana (tanto con y sin piel) inhibieron la proliferación de células Caco-2 de una manera dosis dependiente.

La biodisponibilidad y los efectos de los polifenoles dependerá en gran medida de su transformación por componentes específicos de la microbiota intestinal a través de actividades de esterasa, glucosidasa, desmetilación, deshidroxilación y descarboxilación (Aura, 2008). Los polifenoles están comúnmente presentes en los alimentos vegetales como forma ligada, con mayor frecuencia conjugada como glucósidos, y la mayoría de ellos son metabolizados por la flora intestinal (Bowey *et al.*, 2003; Larrosa *et al.*, 2009a). Compuestos fenólicos dietéticos no absorbidos y sus metabolitos se ha demostrado que ejercen actividades antimicrobianas o bacteriostáticas (Lee *et al.*, 2006). Estos metabolitos inhiben selectivamente el crecimiento de patógenos y estimulan el crecimiento de las bacterias comensales, incluyendo también algunos probióticos reconocidos influyendo así en la composición de la microbiota (Larrosa *et al.*, 2009b).

La presencia de compuestos fenólicos liberados, y su actividad antioxidante en el colon, pueden ejercer un efecto local y su posterior absorción a través de las células del epitelio produciendo beneficios para la salud en diferentes tejidos y órganos del cuerpo. Se requiere más investigación para confirmar los efectos antioxidantes en la salud del CU, debido a que se ha informado que compuestos fenólicos aumentan la capacidad antioxidante del plasma y la actividad antioxidante de enzimas en adultos humanos sanos (Oliveras-López *et al.*, 2014).

VI.7 Capacidad antioxidante durante la absorción *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido

En el Cuadro 7 se presentan los cambios en la capacidad antioxidante evaluados por los métodos DPPH y ABTS durante la etapa de absorción de la digestión gastrointestinal *in vitro* del café usado con diferentes grados de tostado, determinándose capacidad antioxidante del lado basolateral del intestino delgado.

Cuadro 7. Capacidad antioxidante de los compuestos del café usado que fueron permeables/absorbidos *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Muestra	Capacidad antioxidante Intestino delgado basolateral (BL)			
	DPPH		ABTS	
	TOSTADO MEDIO	TOSTADO OSCURO	TOSTADO MEDIO	TOSTADO OSCURO
Saco intestinal invertido				
15 min	36.84 ± 4.2B ^b	49.16 ± 2.80 ^b	10.71 ± 4.35 ^b	15.30 ± 0.62 ^a
30 min	60.88 ± 3.23 ^a	60.68 ± 3.13 ^a	18.76 ± 3.48 ^a	13.62 ± 3.46 ^a
60 min	63.35 ± 3.48 ^a	51.71 ± 1.63 ^b	22.24 ± 0.83 ^a	12.49 ± 0.46 ^a

BL= lado basolateral del intestino delgado. DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidracil. ABTS = ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. La actividad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como μ moles eq de trolox/g de muestra. Los valores de actividad antioxidante del saco intestinal invertido a diferentes tiempos corresponden al lado basolateral. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

La mayor capacidad antioxidante, evaluada por DPPH, se obtuvo en la absorción a los 60 min para el CU/TM (63.35 μ moles eq. de Trolox/g de muestra), en cambio para el CU/TO se observa a los 30 min (60.68 μ moles eq. de Trolox/g de muestra). Mientras que al ser evaluados por ABTS la mayor capacidad antioxidante para CU/TM fue a los 60 min (22.24 μ moles eq. de Trolox/g de muestra) y para CU/TO fue a los 15 min (15.30 μ moles eq. de Trolox/g de muestra). Estos valores fueron menores que los reportados por Campos-Vega *et al.* (2015), sin embargo el comportamiento es similar a medida que son sometidos a digestión.

Andlauer y Fürst (2003) realizó un estudio utilizando los intestinos de ratas con condiciones controladas sugiriendo que una digestión simulada y el uso del intestino delgado aislado de rata son herramientas adecuadas para investigar y evaluar la influencia de la matriz alimentaria sobre el manejo intestinal. El intestino

aislado facilita investigaciones de manejo intestinal de fitoquímicos, permitiendo de esta manera futuras investigaciones sobre su absorción, transporte, distribución y metabolismo. Este conocimiento es un requisito previo para evaluar la función especial de fitoquímicos en la salud humana y la enfermedad.

Los resultados de los compuestos absorbidos sugieren que la actividad antioxidante del CU fue modificada por la acción secuencial de las enzimas digestivas, incluidos los secretada por el intestino delgado y su potencial biotransformación a través de la membrana intestinal. La relevancia clínica de estos resultados debe ser confirmado por estudios de biodisponibilidad *in vivo* (Campos-Vega *et al.*, 2015).

VI.8 Contenido de oligosacáridos de los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos diferentes grados de tostado.

En el Cuadro 8 se muestra la bioaccesibilidad de los oligosacáridos, rafinosa, estaquiosa y verbascosa, durante la digestión y fermentación colónica *in vitro* de CU con dos diferentes grados de tostado empleando microbiota representativa de individuos con peso normal y sobrepeso.

Se puede observa que aunque rafinosa no fue detectada en el CU y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, en la fermentación colónica *in vitro* se detecta con valores mucho más altos en comparación con estaquiosa y verbascosa. Recordando que si fue detectado en el grano de café por lo que el proceso de percolación influyó en la presencia de rafinosa.

Cuadro 8. Bioaccesibilidad de los oligosacáridos, determinados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado.

Muestra	Oligosacáridos					
	Rafinosa		Estaquirosa		Verbascosa	
	Tostado medio	Tostado oscuro	Tostado medio	Tostado oscuro	Tostado medio	Tostado oscuro
Café usado	ND	ND	0.69 ± 0.01 ^{Aa}	0.68 ± 0.02 ^{Aa}	0.66 ± 0.03 ^{Aa}	0.68 ± 0.01 ^{Aa}
Boca	ND	ND	0.12 ± 0.00 ^{Ca}	0.10 ± 0.00 ^{DEb}	0.09 ± 0.01 ^{FGbc}	0.07 ± 0.01 ^{DEc}
Estómago	ND	ND	0.23 ± 0.00 ^{Ba}	0.12 ± 0.01 ^{Db}	0.15 ± 0.01 ^{CDEb}	0.15 ± 0.01 ^{BCb}
Intestino Delgado (Apical)						
15 min	ND	ND	0.21 ± 0.01 ^{Bb}	0.33 ± 0.01 ^{Ba}	0.22 ± 0.01 ^{Bb}	0.22 ± 0.01 ^{Bb}
30 min	ND	ND	0.15 ± 0.00 ^{Cbc}	0.17 ± 0.01 ^{Cab}	0.19 ± 0.00 ^{BCa}	0.13 ± 0.01 ^{BCDc}
60 min	ND	ND	0.06 ± 0.01 ^{Eb}	0.16 ± 0.01 ^{Ca}	0.14 ± 0.02 ^{CDEa}	0.13 ± 0.00 ^{BCDab}
Fermentación colónica (normal)						
6 h	1.23 ± 0.00 ^{Ca}	1.22 ± 0.00 ^{BCa}	0.07 ± 0.00 ^{DEc}	0.06 ± 0.00 ^{Fc}	0.19 ± 0.02 ^{BCb}	0.18 ± 0.03 ^{BCb}
12 h	1.76 ± 0.12 ^{Ca}	1.41 ± 0.56 ^{BCa}	0.05 ± 0.01 ^{Eb}	0.05 ± 0.00 ^{Fb}	0.09 ± 0.01 ^{EFgb}	0.08 ± 0.01 ^{DEb}
24 h	ND	ND	0.07 ± 0.01 ^{Eb}	0.07 ± 0.00 ^{EFb}	0.13 ± 0.00 ^{DEFa}	0.11 ± 0.00 ^{CDEab}
Fermentación colónica (sobrepeso)						
6 h	3.15 ± 0.24 ^{Ba}	3.07 ± 0.08 ^{ABa}	0.11 ± 0.00 ^{CDb}	0.11 ± 0.00 ^{DEb}	0.05 ± 0.00 ^{Gb}	0.04 ± 0.01 ^{Eb}
12 h	4.53 ± 0.17 ^{Aa}	4.47 ± 0.04 ^{Aa}	0.06 ± 0.01 ^{Eb}	0.04 ± 0.00 ^{Fb}	0.07 ± 0.01 ^{FGb}	0.04 ± 0.00 ^{Eb}
24 h	2.03 ± 0.02 ^{BCb}	2.90 ± 0.01 ^{ABCa}	0.15 ± 0.00 ^{CDd}	0.14 ± 0.00 ^{CDd}	0.18 ± 0.00 ^{BCDc}	0.16 ± 0.00 ^{BCDd}

ND= No detectado. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado + ES. La concentración de oligosacáridos son expresados en mg equivalentes de rafinosa, estaquirosa y verbascosa por gramo de muestra, respectivamente. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre muestras, por compuesto, a diferentes horas ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa entre las diferentes muestras, por compuesto, de cada grupo a la misma hora ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey.

Durante la digestión de los oligosacáridos ocurren algunas hidrólisis hasta que llegan al colon para ser fermentados por la microbiota. En la boca la α -amilasa de la saliva, la cual es una glicosidasa que hidroliza los enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$ para formar amilosa y amilopectina y de esta forma producir oligosacáridos. Una porción de almidón de granos y ciertos vegetales y otros almidones resistentes no son digeridos, por lo que ocurre una digestión de los oligosacáridos (Gropper y Smith, 2012). Sin embargo, en la boca ocurre un descenso de casi un 85 % lo cuales se cree que es debido a la acción enzimática de la boca para liberar algunos oligosacáridos. La acción de la amilasa salival continúa en el estómago hasta que el ácido gástrico penetra en el bolo alimenticio y baja el pH suficientemente para inactivar la enzima, sin embargo en el estómago no se produce la digestión de carbohidratos (Gropper y Smith, 2012). Se observó un ligero aumento de los oligosacáridos (estaquirosa y verbascosa de ambos grados de tostado) de la boca

al estómago, con valores de 0.23, 0.12 y 0.15 , 0.15; mg equivalentes por gramo de muestra, TO, TM; estaquiosa y verbascosa respectivamente. Lo que sugiere la influencia de las condiciones ácidas del intestino sobre la matriz del alimento. Sin embargo, la bioaccesibilidad de rafinosa para ambos grados de tostado no fue detectada en boca, estómago e intestino delgado.

En el intestino delgado ocurre un descenso de manera dosis dependiente durante los 15, 30 y 60 min de la digestión tanto para estaquiosa como verbascosa de ambos grados de tostado, sin embargo Gropper y Smith, (2012) mencionan que α -amilasa pancreática no lleva acabo la digestión de los oligosacáridos.

Wichienchot *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la α -amilasa humana en la pitaya, fruta nativa de México, de Centro América y Sudamérica reportando que la saliva humana alfa-amilasa a pH 4 - 8 muestra que pH alto dio un grado de hidrolisis significativamente mayor, pero sin diferencia estadística significativa a pH 4 y 5. La hidrolisis máxima a pH 4, 4, 5, 6, 7 y 8 fue 2.90 %, 3.08 %, 3.28 %, 6.88 % y 11.18 %, respectivamente, después de 30 min de incubación. La hidrólisis máxima de un prebiótico, como la inulina, aumentó a pH más alto, dando valores de 5.72 %, 8.03 %, 7.39 %, 12.32 % y 16.22 % a pH 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Por lo tanto, los oligosacáridos de la pitaya tenían significativamente más resistencia enzimática en comparación con la inulina. Se estima que alrededor del 50 % de los oligosacáridos de pitaya consumidos alcanzaría el colon ya que algunos de ellos fueron hidrolizados por la α -amilasa (16 %), por el ácido en el estómago (2.5 %) y por las enzimas del borde de las microvellosidades en el intestino delgado (30 %). En términos generales, los hidratos de carbono se digirieron principalmente en el intestino delgado (30 %), donde algunas enzimas del borde de las microvellosidades, es decir, isomaltasa, glucoamilasa, maltasa, sacarasa y lactasa, hidrolizan glucosacaridos vinculados en los enlaces α (1-4) y α (1-6) presentes en el intestino delgado y producen monosacaridos como productos finales (Johnson, 2013). Se ha informado de que el 88 % de inulina y oligo-fructosa alcanzan el colon (Cummings y Macfarlane, 2002).

Gnoth *et al.* (2000) evaluaron el efecto de oligosacáridos de la leche humana en una digestión *in vitro*. Para esto se incubaron oligosacáridos con α -amilasa

salival humana, amilasa pancreática porcina a diversos pH con diferentes intervalos de tiempo, reportando que solo pequeñas cantidades de los oligosacáridos son digeridos por las enzimas que se presentan dentro del tracto gastrointestinal de los lactantes; además reportan que amilasa pancreática porcina no degradan los oligosacáridos presentes en la leche humana, los resultados coinciden con el tiempo de incubación y la actividad de la enzima utilizada en los estudios de digestión con amilasa salival y amilasa pancreática utilizando condiciones similares *in vivo* (Anders, 1956).

A nivel del colon, la mayor bioaccesibilidad se mostró para rafinosa para ambos grados de tostado. Esto sugiere que la actividad de la microbiota influyó en su liberación de la matriz, ya que, si bien en el CU no fue detectada, los valores obtenidos en la fermentación colónica son elevados. La microbiota de sujetos con sobrepeso mostro la mayor bioaccesibilidad de rafinosa (para ambos grados de tostado) en comparación con los sujetos de peso normal, observando que la posible disbiosis presente en la microbiota con sobrepeso influye sobre la eficiencia en la utilización de estos compuestos. De igual forma para estaquiosa los valores de la microbiota con sujetos con sobrepeso fueron mayores en comparación con el peso normal en ambos grados de tostado. Sin embargo, para verbascosa sucede lo contrario, observando la mayor bioaccesibilidad con la microbiota de peso normal en comparación con la de sobrepeso para ambos grados de tostado. Además se puede observar que para los oligosacáridos, estaquiosa y verbacosa, de ambos grados de tostado, la mayor bioaccesibilidad sucede a las 24 h de fermentación con la microbiota de sobrepeso y las 6 h para la microbiota de peso normal.

A medida que avanza la digestión gastrointestinal se ha sugerido que verbascosa y estaquiosa son hidrolizados a rafinosa, alcanzado esta su máxima hidrólisis en el proceso de fermentación; lo cual podría explicar el porque es mucho más fácil detectar la bioaccesibilidad de rafinosa en la fermentación colónica.

La inulina natural es un mezcla polidispersa de oligómeros de hidratos de carbono con cadenas lineales (o ramificados en pocos porcentaje) contenidas por unidades de fructosa teniendo en el extremo terminal moléculas de glucosa o fructosa (De Leenheer y Hoebregs, 1994). Para realizar un análisis de la inulina en

comparación con los dos diferentes grados de tostado durante la fermentación colónica *in vitro*, en el Cuadro 9 se puede observar el contenido de los oligosacáridos, observando en la inulina la mayor cantidad de rafinosa, 16.50 y 14.67 mg equivalentes por gramo de muestra para microbiota de peso normal y de sobrepeso respectivamente.

Los valores de inulina para estaquiosa y verbascosa no presentaron diferencias estadísticas significativas respecto a ambos grados de tostado durante las 6 y 12 h de fermentación, sin embargo durante la fermentación de la inulina a las 24 h se muestra diferencia estadística respecto al CU, para ambos tipos de oligosacáridos; por lo que el CU muestra valores similar a la inulina tanto para estaquiosa y verbascosa, pero un mayor contenido de rafinosa utilizando inulina como sustrato para las bacterias, y con ambas microbiotas.

Higashimura *et al.* (2016) investigaron el efecto de agaro-oligosacáridos sobre la disbiosis intestinal inducida por una dieta alta en grasa en ratones, sugiriendo que los oligosacáridos protegen al intestino y de desordenes relacionados.

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), especialmente acético, propiónico y butírico, son los principales productos finales de los procesos de fermentación de la microbiota en el intestino grueso; estos metabolitos se forman predominantemente a partir de polisacáridos y oligosacáridos y precursores de glicoproteínas (Macfarlane y Macfarlane, 2002). Los oligosacáridos han sido vinculados como sustratos de fermentación en el colon generando las mayores cantidades de estos AGCC en su metabolismo por parte de la microbiota colónica.

Cuadro 9. Cantidad de oligosacáridos, determinados por HPLC, en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado, así como de la inulina.

	Oligosacáridos								
	Rafinosa			Estaquiosa			Verbascosa		
	Tostado oscuro	Tostado medio	Inulina	Tostado oscuro	Tostado medio	Inulina	Tostado oscuro	Tostado medio	Inulina
Fermentación colónica (peso normal)									
6 h	1.22 ± 0.00 ^{BCb}	1.23 ± 0.00 ^{Cb}	16.50±3.86 ^{Aa}	0.06 ± 0.00 ^{CDb}	0.07 ± 0.00 ^{Cb}	0.07 ± 0.02 ^{Ab}	0.18 ± 0.03 ^{Ab}	0.19 ± 0.02 ^{Ab}	0.06 ± 0.01 ^{ABb}
12 h	1.41 ± 0.56 ^{BCa}	1.76 ± 0.12 ^{Ca}	ND	0.05 ± 0.00 ^{DEb}	0.05 ± 0.01 ^{Cb}	0.02 ± 0.00 ^{Bb}	0.08 ± 0.01 ^{Bb}	0.09 ± 0.01 ^{BCb}	0.08 ± 0.03 ^{Ab}
24 h	ND	ND	ND	0.07 ± 0.00 ^{Cbc}	0.07 ± 0.01 ^{Cc}	0.06 ± 0.00 ^{ABc}	0.11 ± 0.00 ^{ABab}	0.13 ± 0.00 ^{Ba}	0.09 ± 0.01 ^{Abc}
Fermentación colónica (sobrepeso)									
6 h	3.07 ± 0.08 ^{ABb}	3.15 ± 0.24 ^{Bb}	14.67±2.56 ^{Aa}	0.11 ± 0.00 ^{Bb}	0.11 ± 0.00 ^{Bb}	0.04 ± 0.01 ^{ABb}	0.04 ± 0.01 ^{Bb}	0.05 ± 0.00 ^{Cb}	0.03 ± 0.01 ^{Bb}
12 h	4.47 ± 0.04 ^{Aa}	4.53 ± 0.17 ^{Aa}	ND	0.04 ± 0.00 ^{Eb}	0.06 ± 0.01 ^{Cb}	0.02 ± 0.00 ^{Bb}	0.04 ± 0.00 ^{Bb}	0.07 ± 0.01 ^{Cb}	0.03 ± 0.01 ^{ABb}
24 h	2.90 ± 0.01 ^{ABCa}	2.03 ± 0.02 ^{BCb}	ND	0.14 ± 0.00 ^{Ae}	0.15 ± 0.00 ^{Acde}	0.06 ± 0.01 ^{Af}	0.16 ± 0.00 ^{Acde}	0.18 ± 0.00 ^{Ac}	0.07 ± 0.00 ^{ABf}

ND= No detectado. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado + ES. La concentración de oligosacáridos es expresada en mg equivalentes de rafinosa, estaquiosa y verbascosa por gramo de muestra, respectivamente. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre estándar a diferentes horas ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa entre los diferentes estándares de cada grupo a la misma hora ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey.

Hasta el momento no se tiene reportado la liberación de oligosacáridos a partir del CU, con dos grados de tostado, así como la influencia de la microbiota colónica (peso normal y sobrepeso), sugiriendo que el CU podría ser reconocido por su efecto prebiótico proveniente de los oligosacáridos, entre otros compuestos, así como su efecto benéfico a la salud de quien lo consume. Sin embargo se ha evaluado los efectos de otras matrices de alimento como el de los oligosacáridos en frijol, los cuales se ha informado que tiene propiedades prebióticas (Gatesoupe, 1999); así como lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2009) quienes sugieren que las semillas de las diferentes variedades de frijol común cocidos son una excelente fuente de proteínas, almidón resistente, oligosacáridos, y de fibras solubles e insolubles; además son una buena fuente de carbohidratos no digeridos y compuestos fenólicos (taninos condensados) que pueden ser fermentados en el colon y producen AGCC los cuales contribuyen a la mucosa del colon sano. En un estudio realizado por Zhou *et al.* (2012) se sugiere que los oligosacáridos del frijol, compuestos principalmente por estaquiosa y rafinosa, podrían estar asociadas con la mayor tasa de digestión a través de un aumento de la degradación microbiana, además de que alteran la producción de AGCC y población microbiana *in vitro*, por lo que podría aumentar el complejo y la diversidad de las poblaciones bacterianas, pues los oligosacáridos del frijol aumentan el radio de *Bifidobacterium*, pero disminuyendo el radio de *Escherichia coli* y *Streptococcus* comparado con el grupo de glucosa. Además estudios anteriores han indicado que la suplementación dietética con estos oligosacáridos del frijol disminuye los contenidos en plasma de urea N y NH₃, pero incrementa las proteínas totales y algunos aminoácidos en minicerdos Huanjiang (Zhou *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que el proceso de fermentación de oligosacáridos en el colon no está bien especificado, sin embargo estos pueden estimular en el colon el crecimiento y/o la actividad metabólica de diferentes especies bacterianas, incluyendo especies que son benéficas como perjudiciales para la salud (Wang y Gibson, 1993).

VI.9 Coeficiente de permeabilidad aparente de los oligosacáridos del café usado digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Se evaluó la permeabilidad intestinal de los oligosacáridos (estaquiosa y verbascosa) del café usado por el método de saco intestinal invertido y se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Coeficiente de permeabilidad aparente de los oligosacáridos, determinados por HPLC, del café usado, con dos grados de tostado, digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Parámetro		Tiempo de incubación (min)	P_{app} A → B (cm/s x 10 ⁻¹)	P_{app} B → A (cm/s x 10 ⁻¹)	Relación de flujo (B→A) / (A→B) (cm/s)
Estaquiosa	Tostado medio	15	0.329 ^f	0.465 ^f	1.381
		30	1.018 ^{bcd}	0.653 ^{ef}	0.638
		60	1.406 ^{ab}	0.599 ^{ef}	0.369
	Tostado oscuro	15	0.620 ^{cd}	1.376 ^{cd}	2.357
		30	1.570 ^{ab}	1.439 ^{cd}	0.944
		60	2.099 ^a	2.725 ^a	1.333
Verbascosa	Tostado medio	15	0.442 ^{ef}	0.761 ^{ef}	1.692
		30	1.113 ^{bcd}	1.293 ^d	1.187
		60	1.557 ^{ab}	1.889 ^d	1.272
	Tostado oscuro	15	0.413 ^{def}	0.733 ^{ef}	1.833
		30	1.205 ^{bc}	0.900 ^e	0.722
		60	1.487 ^{ab}	1.755 ^{bc}	1.181

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. P_{app} A → B= Transporte de compuestos del lado apical al basolateral. P_{app} B → A= Transporte de compuestos del lado basolateral al apical. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Al evaluar la permeabilidad intestinal de los oligosacáridos: rafinosa estaquiosa y verbascosa, del CU con dos diferentes grados de tostado, el contenido de rafinosa, en ambos grados de tostado, no se detectó en el lado basolateral del intestino (datos no presentados).

La relación del flujo de transporte de los lados apical y basolateral varía dependiendo de los compuestos transportados, así como de tiempo de incubación. Como podemos observar en los resultados los valores de P_{app} (A → B) y (B → A) van en aumento conforme va aumentando el tiempo de incubación, alcanzado los valores mas altos a los 60 min, tanto para estaquiosa y verbascosa, para ambos grados de tostado.

Artursson *et al.* (2001) en su estudio intenta correlacionar la permeabilidad del fármaco pasivo en monocapas de Caco-2 encontrando fármacos completamente absorbidos con altos coeficientes de permeabilidad ($P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s), mientras que los fármacos absorbidos de forma incompleta tenían coeficientes de baja permeabilidad ($P_{app} < 1 \times 10^{-7}$ cm/s). Por lo que se sugiere que cuando el coeficiente de permeabilidad aumenta de 1×10^{-7} a 1×10^{-6} cm/s con un orden de magnitud, la fracción absorbida de un fármaco aumenta de 0 a 100 % *in vivo*. Como se puede observar los resultados de este trabajo se encuentran $> 1 \times 10^{-6}$ cm/s, lo que significa que tiene un alto coeficiente de permeabilidad. Además se mostro un mayor transporte en el sentido $B \rightarrow A$ en la mayoría de los compuestos evaluados lo que sugiere que verbascosa y estaquiosa presentes en el CU de ambos grados de tostado pueden actuar como sustrato para los transportadores de flujo de salida (como P-glicoproteínas) (Stenberg *et al.*, 2001). Es importante mencionar que los compuestos transportados a través de la membrana epitelial en la dirección ($A \rightarrow B$) podría darse principalmente por mecanismos pasivos (Stenberg *et al.*, 2001).

Hasta el momento éstos son los primeros resultados de la permeabilidad de los oligosacaridos, verbascosa y estaquisa en CU, sin embargo es necesario extrapolar los resultados de estos experimentos con seres humanos debido a que la permeabilidad intestinal de ratas es superior a la de los seres humanos (Nejdfors *et al.*, 2000).

VI.10 Determinación de las melanoidinas en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos diferentes grados de tostado.

En el Cuadro 11 se muestra la bioaccesibilidad de las melanoidinas, durante la digestión y fermentación colónica *in vitro*, para el CU con dos diferentes grados de tostado y empleando microbiota representativa de individuos con peso normal y con sobrepeso.

Cuadro 11. Bioaccesibilidad de las melanoidinas en los productos de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado.

Muestra	Melanoidinas	
	Tostado medio	Tostado oscuro
Café usado	9.11 ± 0.21 ^{Ba}	8.77 ± 0.31 ^{Aa}
Boca	6.34 ± 0.43 ^{Ca}	4.67 ± 0.35 ^{Db}
Estómago	2.35 ± 0.17 ^{Fa}	1.09 ± 0.05 ^{Gb}
Intestino Delgado (Apical)		
15 min	10.00 ± 0.21 ^{Ha}	9.05 ± 0.24 ^{Aa}
30 min	9.21 ± 0.16 ^{Ga}	7.70 ± 0.19 ^{Bb}
60 min	3.82 ± 0.37 ^{Fb}	6.48 ± 0.10 ^{Ca}
Fermentación colónica (normal)		
6 h	0.49 ± 0.11 ^{Cb}	1.12 ± 0.06 ^{Ga}
12 h	1.38 ± 0.08 ^{Ca}	1.41 ± 0.02 ^{Ga}
24 h	2.05 ± 0.10 ^{Ca}	2.30 ± 0.38 ^{Fa}
Fermentación colónica (sobrepeso)		
6 h	3.06 ± 0.04 ^{Ea}	3.23 ± 0.24 ^{Ea}
12 h	2.28 ± 0.06 ^{Fb}	2.98 ± 0.16 ^{Ea}
24 h	2.99 ± 0.21 ^{Ea}	3.05 ± 0.12 ^{Ea}

Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado ± ES. La concentración las melanoidinas son expresados en g/100g de melanoidinas. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre diferente etapa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa entre los diferentes tipos de tostado en la misma etapa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey.

Las melanoidinas se han estudiado en los últimos años debido a sus implicaciones tecnológicas, nutricionales, biológicos y de salud, tales como la capacidad antioxidante (Delgado-Andrade y Morales, 2005; Delgado-Andrade *et al.*, 2005), las propiedades de metal-quelantes (Morales *et al.*, 2005) y antimicrobiano (Rufián-Henares y Morales, 2006), y en la actividad antihipertensiva *in vitro* (Rufián-Henares y Morales, 2007). En línea con su actividad antioxidante, algunos efectos fisiológicos de las melanoidinas de café, tras la digestión gastrointestinal, están relacionadas con la capacidad para proteger las células de hepatoma HepG2 humano contra ataque oxidativo mediante la modulación de la concentración de glutatión reducido, la producción de malondialdehído y la actividad de la enzima antioxidante, aunque los mecanismos de acción siguen siendo desconocido (Goya *et al.*, 2007). Debido a esto se planteó evaluar la bioaccesibilidad de las melanoidinas en el CU.

Después de someter los productos de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* a una ultrafiltración usando un Microcon YM-10 con celulosa a 10KDa se obtuvo la fracción retenida de APM, encontrando que la mayor bioaccesibilidad de las melanoidinas (APM) fue mayor durante la digestión en el intestino delgado (15min) del CU de ambos grados de tostado (9.05 y 10.00, TO y TM, g de melanoidinas/100g de muestra). Faist y Erbersdobler (2001) informaron en estudios de tránsito metabólico de melanoidinas, realizado principalmente en ratas, que las melanoidinas son parcialmente absorbidas en el intestino delgado, sugiriendo que los mecanismos de transporte tienen que ser investigados.

Homma y Fujimaki (1981) investigaron el destino de las melanoidinas, obtenidas de un calentamiento de glucosa con glicina, de APM adicionadas a una dieta estándar de ratas. Los autores sugieren que las melanoidinas de APM en la dieta son degradadas en fracciones de bajo peso molecular (BPM) por los microorganismos intestinales, y algunos de los productos de degradación son absorbidos en el intestino delgado. Nair *et al.* (1981) confirmó los resultados en estudios de tránsito en ratas mediante incubación gástrica de melanoidinas, los diferentes productos de reacción se separaron en fracciones de APM y BPM, obteniendo que esta última fue absorbida de hasta 85 %, principalmente en el intestino delgado. Faist y Erbersdobler (2001) reportan que las fracciones absorbidas no son utilizadas por el organismo y se excretan ligeramente modificadas o sin modificar por la orina. También se demostró que los riñones retienen estos metabolitos más tiempo que otros órganos, por ejemplo, el hígado.

Además se ha sugerido que las melanoidinas de BPM sin absorción, sufren degradación intestinal por las enzimas digestivas o microbiana, mientras que las de APM parecen no ser degradados en cantidades considerables (O'Brien y Morrissey, 1989). Ames *et al.* (1999) demostraron que durante la simulación de la digestión péptica y de páncreas no se forman fracciones de BPM, pero que las melanoidinas estimulan el crecimiento de bacterias anaeróbicas intestinales *in vitro*. Esta información coincide con lo reportado por Horikoshi *et al.* (1981) quienes reportaron un aumento de los lactobacilos aeróbico y anaeróbico en ratas alimentadas con una

mezcla de glicina-glucosa durante 4 meses. Sin embargo en este trabajo la bioaccesibilidad de las melanoidinas fue mucho menor en la fermentación colónica, tanto para microbiota de peso normal y de sobrepeso, sugierendo que las bacterias utilizan las melanoidinas, debido a que se ha reportado que productos de la reacción de Maillard se han reconocido que son capaces de modular *in vivo* la composición de la microbiota intestinal tanto en los seres humanos y en ratas, y los efectos específicos son susceptibles de ser vinculados a la estructura química y las cantidades dietéticas de los diferentes compuestos de pardeamiento (Seiquer *et al.*, 2014). Además, podemos observar mayores valores para la microbiota de sujeto con sobrepeso, lo que nos indica que no hay un aprovechamiento de estos productos y una menor actividad de las bacterias presentes en el colon.

De igual forma Lee *et al.* (1992) reportaron que la absorción y distribución de las melanoidinas, glucosa-glicina, en ratas fue tanto para melanoidias de APM como de BPM fue a lo largo del tractogastrointestinal. Después de administrar las melanoidinas de APM y BPM a las ratas se midió la distribución en estómago, intestino delgado y colon, siguiendo el patrón de intestino delgado> colon>estómago, teniendo similitud con lo reportado en este trabajo.

El tránsito metabólico de los productos de la reacción de maillard, como las melanoidinas, aún no están completamente aclaradas, así como si la estructura aislada de estas se someten a la biotransformación metabólica y posteriormente causan efectos fisiológicos *in vivo*. Por lo que, existe poca información sobre la absorción de melanoidinas y su distribución posterior en el cuerpo y más aun en el CU.

VI.11 Coeficiente de permeabilidad aparente de las melanoidinas del café usado digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Se evaluó la permeabilidad intestinal de las melanoidinas del CU por el método de saco intestinal invertido. El coeficiente de permeabilidad aparente de las melanoidinas sometido a digestión *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Coeficiente de permeabilidad aparente de las melanoidinas, del café usado, con dos grados de tostado, digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Parámetro		Tiempo de incubación (min)	P _{app} A → B (cm/s x 10 ⁻¹)	P _{app} B → A (cm/s x 10 ⁻¹)	Relación de flujo (B→A) / (A→B) (cm/s)
Melanoidinas	Tostado medio	15	-	2.117 ^e	-
		30	0.238 ^c	3.903 ^c	16.358
		60	-	3.233 ^d	-
	Tostado oscuro	15	0.553 ^b	4.131 ^c	7.479
		30	0.720 ^a	7.037 ^b	9.753
		60	-	11.847 ^a	-

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. P_{app} A → B= Transporte de compuestos del lado apical al basolateral. P_{app} B → A= Transporte de compuestos del lado basolateral al apical. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Evaluando la biodisponibilidad intestinal de las melanoidinas del CU con dos diferentes grados de tostado, se observa que debido a que no fueron detectadas melanoidinas en P_{app} (A → B) en el tiempo de incubación de 15 min para TM y de 60 para TM y TO, no fue posible detectar la relación de flujo. Sin embargo se observa que para TO los valores de P_{app} (A → B) y (B → A) van en aumento conforme va aumentado el tiempo de incubación. De igual forma que con los oligosacaridos, las melanoidinas se encuentran $> 1 \times 10^{-6}$ cm/s, lo que significa que tiene un alto coeficiente de permeabilidad (Artursson y Karlsson, 1991). Además podemos observar que mayores valores de permeabilidad para el TO en comparación con el TM.

Una relación lineal entre el flujo A → B y la B → A en varios niveles de concentración indica que es una difusión pasiva. Sin embargo las moléculas que cruzan la barrera epitelial por una ruta transcelular tienen una permeabilidad mucho mayor, que también se puede cuantificar mediante el sistema de saco evertido (Le Ferrec *et al.*, 2001).

Los sistemas de saco intestinal invertido han sido utilizadas para el mecanismo de estudios de absorción o de formulación de fármacos, además de que

tiene como ventaja la presencia de todos los tipos de células y la capa mucosa (Le Ferrec *et al.*, 2001). Hasta el momento son los primeros resultados de la permeabilidad de las melanoidinas del CU, sin embargo es necesario extrapolar los resultados de estos experimentos con seres humanos.

VI.12 Flujo de agua durante el ensayo de permeabilidad *in vitro* del café usado usado de dos diferentes grados de tostado.

El cambio del flujo de agua durante la absorción de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los compuestos del CU con dos grados de tostado fue monitoreado a los 15, 30 y 60 min, representandose este cambio en el Cuadro 13. La absorción ocurrió a través de la transferencia de moléculas de agua desde el lado apical (afuera) a la parte basolateral (dentro), del segmento del yeyuno que se utilizó en el ensayo.

Como se observa en el Cuadro 13 en las muestras de CU de ambos grados de tostado así como el blanco, el aumento del flujo de agua en forma dependiente del tiempo, siendo los 60 min donde se encuentra los mayores valores con 0.06 y 0.08 g agua/g intestino para TM y TO, respectivamente, por lo que ambas muestras siguieron una tendencia al aumentar su peso desde la obtención del saco intestinal sin solución amortiguadora, el saco intestinal antes de la incubación y el saco intestinal después de la incubación; este efecto se debió al poder de absorción del saco. Este aumento dependiente del tiempo concuerda con lo reportado por (García-Gutiérrez, 2015; Vazquez-Sanchez, 2015), mostrando valores más altos, 0.43 y 0.26 g agua/g intestino para TM y TO (Vazquez-Sanchez, 2015). Sin embargo, en experimentos *in vitro*, la tasa de captación de tejido puede verse afectada por factores tales como pH, temperatura de incubación, concentración de sustrato, condiciones aeróbicaa y la presencia de inhibidores metabólicos (Tsubaki y Komai, 1987).

Cuadro 13. Flujo de agua durante el ensayo de permeabilidad *in vitro* (saco intestinal invertido) del café usado.

Muestra	Flujo de agua							
	I1		I2		I3		FA	
CU	TM	TO	TM	TO	TM	TO	TM	TO
15 min	1.40 ± 0.28 ^{Ab}	1.33 ± 0.01 ^{Ab}	2.81 ± 0.46 ^{Aa}	2.26 ± 0.29 ^{Aa}	2.87 ± 0.45 ^{Aa}	2.65 ± 0.29 ^{Aa}	0.04 ± 0.02 ^{Ac}	0.03 ± 0.01 ^c
30 min	1.41 ± 0.24 ^{Ab}	1.53 ± 0.10 ^{Ab}	2.77 ± 0.45 ^{Aa}	3.29 ± 0.04 ^{Aa}	2.84 ± 0.44 ^{Aa}	3.38 ± 0.10 ^{Aa}	0.05 ± 0.05 ^{Ac}	0.05 ± 0.03 ^c
60 min	1.29 ± 0.33 ^{AcD}	1.38 ± 0.07 ^{Abcd}	2.51 ± 0.44 ^{Aabc}	3.18 ± 0.80 ^{Aa}	2.59 ± 0.41 ^{Aab}	3.29 ± 0.68 ^{Aa}	0.06 ± 0.04 ^{Ad}	0.08 ± 0.09 ^d
Blanco								
15 min	1.23 ± 0.02 ^{Ab}	1.22 ± 0.15 ^{Ab}	2.46 ± 0.34 ^{Aa}	2.30 ± 0.20 ^{Aa}	2.51 ± 0.38 ^{Aa}	2.35 ± 0.21 ^{Aa}	0.03 ± 0.03 ^{Ac}	0.04 ± 0.02 ^c
30 min	1.27 ± 0.09 ^{Ac}	1.62 ± 0.01 ^{Ac}	2.73 ± 0.28 ^{Ab}	3.49 ± 0.01 ^{Aab}	2.79 ± 0.26 ^{Aab}	3.58 ± 0.06 ^{Aa}	0.04 ± 0.03 ^{Ad}	0.05 ± 0.06 ^d
60 min	1.37 ± 0.13 ^{Ab}	1.24 ± 0.03 ^{Abc}	2.63 ± 0.53 ^{Aa}	2.48 ± 0.02 ^{Aa}	2.70 ± 0.56 ^{Aa}	2.55 ± 0.02 ^{Aa}	0.04 ± 0.04 ^{Ad}	0.05 ± 0.01 ^{cd}

CU = café usado. TM = Tostado medio. TO = Tostado oscuro. I1 = Saco intestinal sin solución amortiguadora previo a la incubación. I2 = Saco intestinal con solución amortiguadora previo a la incubación. I3 = Saco intestinal con solución amortiguadora posterior a la incubación. FA = Flujo de Agua. Los resultados de los parámetros I1, I2 y I3 son expresados en gramos. Los resultados de FA son expresados como gramo de agua por gramo de intestino fresco. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado + ES. Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa de cada tiempo de incubación de ambas muestras bajo diferentes parámetros ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa de los diferentes tiempos de incubación de ambas muestras por separado.

Además en este trabajo no se presentó diferencia estadística en ninguno de los tiempos evaluados para el FA. Asimismo, no se presentó diferencia estadística en I1, I2, I3 y FA para ambos grados de tostado. Por lo que la absorción se mantuvo a lo largo de digestión y permitiendo mantener la humectabilidad. El modelo de saco intestinal invertido ha sido utilizado con éxito para los estudios de interacción de fármacos (Alam *et al.*, 2012). Gurunath *et al.*, (2014) ha realizado estudios para observar la influencia que tienen los fármacos sobre el flujo de agua, demostrando así la absorción de los compuestos y la viabilidad del tejido.

VI.13 Efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* de la FND del café utilizado con diferentes grados de tostado sobre pH.

El colon es reconocido como un órgano metabólicamente activo que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud general del cuerpo humano, por la presencia de microbiota que puede metabolizar los nutrientes no absorbidos y la absorción de agua y electrolitos, además esta implicado en la formación y el almacenamiento de residuos en forma de heces y su eliminación a través de la defecación (Arbizu y Nurko, 2016).

Muchas técnicas se han utilizado para evaluar el potencial prebiótico de los carbohidratos, entre ellas algunos investigadores han hecho un amplio uso de técnicas *in vitro* como los sistemas de fermentación destinados a modelar el intestino, sin embargo la información se debe de apoyar con estudios de seres humanos en grupos de poblaciones pertinentes (Rastall, 2010).

Una de las formas para dar una visión preliminar de la selectividad de la fermentación, es la medición de pH a lo largo de la fermentación. Esta medición en el medio de incubación es un indicador indirecto de la producción de AGCC producidos por la fermentación *in vitro* de sustratos fermentables. En el Cuadro 14 se muestra la medición del pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica *in vitro* de la FND de las muestras de CU con diferente grado de tostado. En este ensayo se utilizó inulina como control positivo de carbohidrato fermentable;

mientras que, como control negativo se empleó el blanco proveniente del proceso de digestión mencionado anteriormente.

La inulina es un polisacárido de la forma $\text{Glu } \alpha 1-2 [\beta \text{ Fru } 1-2]_n$, en la que $n > 10$ (Crittenden y Playne, 1996). El empleo de la inulina es debido a su efecto prebiótico reconocido además de su efecto modulador en la microbiota intestinal, pues se sabe que la inulina promueve el crecimiento de bacterias beneficiosas, entre ellas las *Bifidobacteria* (Meyer y Stasse-Wolthuis, 2009). Para la fermentación colónica *in vitro*, se utilizó inóculo fecal humano como fuente representativa del colon, en este proyecto se utilizó microbiota proveniente de individuos con un peso normal y con sobrepeso, debido a que se ha reportado que existen diferencias entre la microbiota intestinal de estas personas (DiBaise *et al.*, 2012).

Al someter a digestión gastrointestinal *in vitro* y posterior fermentación colónica, las muestras de CU, con microbiota de un sujeto con peso normal y uno con sobre peso, se monitorearon los cambios en el pH durante este último proceso. No se observaron diferencias estadísticas entre los grados de tostado o la microbiota empleada, sin embargo, la mayor caída del pH se observa a las 6 h de la fermentación del CU de ambos tostados con la microbiota de sujetos con sobrepeso, y para las 24 h del control positivo (inulina) con microbiota de peso normal.

La FND del café con ambos grados de tostado y del control negativo, sufre un decremento a las 6 h de fermentación con un posterior aumento a las 24 h tanto con la microbiota de individuos de PN y SP, alcanzando valores para el TM de 6.64 y 6.56 en PN y SP respectivamente, y en TO valores de 6.43 y 6.53 en PN y SP respectivamente. La disminución de pH se toma como un índice de mayor producción de AGCC (Granito *et al.*, 2001), así como la actividad metabólica de las especies presentes y su capacidad para utilizar el sustrato. Para el control positivo (inulina) disminuyó el pH de forma dosis-dependiente hasta las 24 horas de fermentación probablemente debido a su fermentación rápida y fácil accesibilidad a la acción bacteriana en comparación con polisacáridos complejos, es decir, la FND (Guillon y Champ, 2002).

Cuadro 14. Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado de dos diferentes grados de tostado sobre el pH del medio de incubación.

Muestra CU	pH							
	0 h		6 h		12 h		24 h	
	PN	SP	PN	SP	PN	SP	PN	SP
TO	7.03 ± 0.06 ^{Aa}	6.98 ± 0.27 ^{Aa}	6.36 ± 0.15 ^{Aab}	6.06 ± 0.45 ^{Ab}	6.45 ± 0.33 ^{Aab}	6.92 ± 0.23 ^{Aa}	6.43 ± 0.30 ^{Aab}	6.53 ± 0.14 ^{Aab}
TM	7.02 ± 0.09 ^{Aa}	6.93 ± 0.26 ^{Aa}	6.40 ± 0.08 ^{Aab}	6.00 ± 0.37 ^{Ab}	6.50 ± 0.28 ^{Aab}	6.40 ± 0.25 ^{Aab}	6.64 ± 0.18 ^{Aab}	6.56 ± 0.10 ^{Aab}
CTR (+)	7.19 ± 0.11 ^{Aa}	7.13 ± 0.34 ^{Aa}	4.76 ± 0.65 ^{Bb}	4.54 ± 0.04 ^{Bb}	4.46 ± 0.36 ^{Bb}	4.36 ± 0.12 ^{Bb}	4.22 ± 0.25 ^{Bb}	4.38 ± 0.29 ^{Bb}
CTR (-)	7.17 ± 0.11 ^{Aa}	7.04 ± 0.34 ^{Aa}	6.56 ± 0.14 ^{Aa}	6.46 ± 0.47 ^{Aa}	6.78 ± 0.35 ^{Aa}	6.61 ± 0.26 ^{Aa}	7.02 ± 0.34 ^{Aa}	6.94 ± 0.29 ^{Aa}

PN = Peso normal. SP = Sobrepeso. TM = Tostado medio. TO = Tostado oscuro. CTR (+) = Inulina. CTR (-) = Blanco de la fermentación. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado ± ES. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre grupos bajo las mismas horas ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación de cada grupo ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey.

El pH a las 0 h con la microbiota de individuos con PN y SP no fueron estadísticamente diferentes entre las muestras. Sin embargo, el pH a las 6, 12 y 24 h en PN y SP se observa diferencia estadística del CU/TO, CU/TM, CTR (-) respecto del CTR (+). Estos resultados concuerdan con lo reportado por García-Gutiérrez (2015), sugiriendo que la FND del CU es una buena fuente de sustrato fermentable en el colon debido a su compleja matriz, incluyendo polifenoles, y a la producción de AGCC, que podrían favorecer la proliferación de bacterias benéficas y por tanto causando efectos benéficos a la salud.

La degradación de las fibras dietéticas por exoenzimas conduce principalmente a una mayor cantidad de AGCC que crean un medio ligeramente ácido con valores entre pH 5.5 y 6.5 (Zimmer *et al.*, 2012). Asimismo la ingesta dietética puede influir en el pH intracolónico a través de sus efectos sobre la producción de AGCC. Por lo tanto, el aumento de fibra dietética, así como los azúcares no absorbibles incrementa la acidez fecal proporcionando carbohidratos para la microbiota. Sin embargo, los efectos de cambios en el tiempo de tránsito colónico en pH son difíciles de predecir (Down *et al.*, 1972; Pye *et al.*, 1987). Teóricamente, un tiempo de tránsito acortado podría aumentar el pH mediante la reducción del tiempo disponible para la fermentación bacteriana de hidratos de carbono para la producción de AGCC o al disminuir el pH podría provocar la muerte de bacterias que producen lactato (Vernia *et al.*, 1988).

VI.14 Actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado.

Se evaluó la actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa de la microbiota intestinal en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del CU con dos grados de tostado utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso. El incremento en la actividad de estas enzimas ha

sido asociada con el incremento de enfermedades, principalmente no transmisibles, debido a su papel potencialmente importante en la generación de metabolitos tóxicos y carcinogénicos provenientes de la dieta y produciendo sustancias endógenas (Nakamura *et al.*, 2002). La actividad de las enzimas fue normalizada respecto a las muestras fecales a las 0 h de fermentación utilizando la microbiota de sujeto con PN y SP, respectivamente. El porcentaje (%) de actividad de las enzimas se muestran en las Figuras 5,6,7 y 8.

El estilo de vida, especialmente la dieta, juega un papel importante en el desarrollo de cáncer colorectal. Una dieta rica en productos de origen animal u occidental ha demostrado propiedades cancerígenas y que afectan a los sustratos disponibles para la microbiota intestinal. El colon humano está constantemente expuesto a una mezcla compleja de compuestos de origen dietético o subproductos de los procesos digestivos y microbianos. Estos compuestos pueden contribuir al desarrollo de tumores de colon al dañar la mucosa, lo que lleva a un aumento de la proliferación células en la cripta del colon (Schnäbele *et al.*, 2008).

β -glucuronidasa se produce por las células del hígado, el riñón, el bazo, el epitelio intestinal, endocrinas y los órganos reproductores, y además por ciertas bacterias intestinales (Walaszek, 1990). β -glucuronidasa hidroliza β -glucurónidos a ácido y a la aglicona es decir, imina, tiol o alcohol glucurónico. Niveles elevados de β -glucuronidasa en plasma, es considerado un marcador de riesgo de desarrollar cánceres dependientes de hormonas, particularmente cáncer de mama y de próstata (Zóltaszek *et al.*, 2008). La actividad de esta enzima es estimulada por el contacto con sustancias tóxicas, el humo del tabaco o carcinógenos, entre otros. Sin embargo una dieta de vegetales y baja en calorías es una herramienta útil para reducir el nivel de β -glucuronidasa en las heces (Mykkänen *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 1974).

β -glucosidasa es producida de forma intensiva por *Bacteroides uniformis*, *Clostridium paraputrificum*, *Enterococcus faecalis*. La principal función de la enzima es la hidrólisis de glicósidos a agliconas y componentes de azúcar. Los glicósidos no se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal, pero se hidrolizan en el colon por bacterias β -glicosidasas. Como resultado, las sustancias

potencialmente tóxicas, podría estar formándose en el intestino grueso (Mroczyńska *et al.*, 2013).

Como se observa en la Figura 5, la actividad de la β -glucuronidasa es mayormente inhibida por inulina con la microbiota de sobrepeso, seguida de las muestras de CU/TM y con un menor porcentaje de inhibición para CU/TO a las 24 h de fermentación. La actividad reportada en porcentaje (%) se logra disminuir alrededor de un 50 % con el CU/TM), y casi de un 70 % con inulina respecto al control (a las 0 h, peso normal y sobrepeso respectivamente), sin embargo la actividad aumenta en TO en los grupos de peso normal (6 y 12 h) y sobrepeso (24 h). La actividad de esta enzima fue evaluada por Rowland *et al.* (1998) observando que el consumo de dietas que contienen *Bifidobacterium longum*, inulina o ambos se asociaron con una disminución en la actividad β -glucuronidasa, hasta en un 60 %, observando que el comportamiento es similar a lo reportado en este trabajo tanto para la inulina como para las muestras de TM.

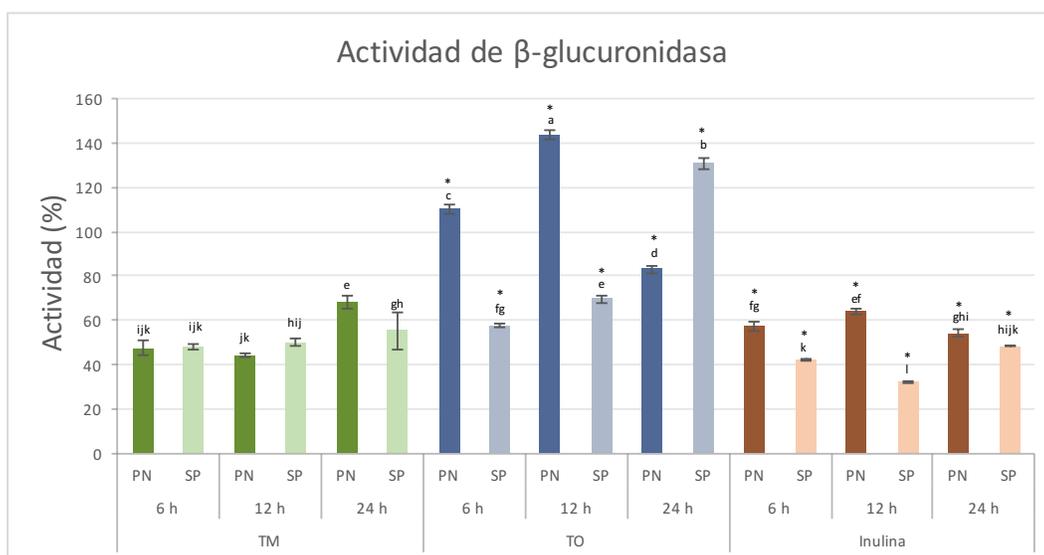


Figura 5. Actividad de la β -glucuronidasa en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso. PN = peso normal, SP = sobrepeso, TM = Tostado medio, TO = Tostado oscuro. Letras diferentes expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. * indican diferencias significativa ($\alpha = 0.05$) por la prueba de Dunnett vs el tiempo 0 h (dato no mostrado, tomado como 100 % de actividad). Los resultados son expresados como porcentaje (%) de actividad. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Rao *et al.* (1998) evaluaron el efecto del café, la fibra de café, la inulina y la pectina sobre la actividad de β -glucuronidasa, mostrando que las ratas alimentadas

con café y fibra de café mostraron niveles significativos más bajos de actividad para la enzima, comparados con la dieta control. En contraste, la dieta de la inulina no tuvo ningún efecto significativo, pero la dieta con pectina tenía efecto inhibitorio moderado sobre la actividad de β -glucuronidasa. Debido a esto, los autores sugieren que existe la posibilidad de que los componentes de la dieta de café y de su fibra, así como la inulina, puedan modular la actividad metabólica y la masa bacteriana, además de alterar la composición de las especies bacterianas y sus productos de fermentación (Roberfroid y Ph, 1993; Stephen y Cummings, 1980). Los resultados obtenidos sugieren que la actividad β -glucuronidasa, no puede denominarse como único marcador de la predicción de alto o bajo riesgo de cáncer en estudios de intervención debido a la sensibilidad de las especies bacterianas en el intestino, que están sujetos a modificación por suplementos de dieta. Otros estudios realizados han demostrado una correlación inversa entre el riesgo de cáncer de colon y la actividad fecal β -glucuronidasa (Reddy *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1974); además, la administración de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* como suplementos dietéticos ha mostrado que suprimen la actividad β -glucuronidasa fecal (Kulkarni y Reddy, 1994)

La Figura 6 muestra la actividad de la β -glucosidasa, observando una mayor actividad en los grupos con microbiota de un sujeto con peso normal tanto TM y TO, lo contrario ocurre para inulina a las 6 y 24 h de fermentación, reportándose valores más altos para la microbiota con SP. La menor actividad se observa para TM de ambas microbiotas, con una disminución de aproximadamente 60 % respecto al control con la microbiota de PN, en contraste la microbiota de SP, se logró una reducción de más del 70 %. La mayor actividad se presentó para TO con microbiota de PN a las durante toda la fase de fermentación colónica. Kim *et al.* (1994) sugieren que un pH elevado (pH=7) induce a que las enzimas, β -glucosidasa y β -glucuronidasa promuevan el cáncer de colon.

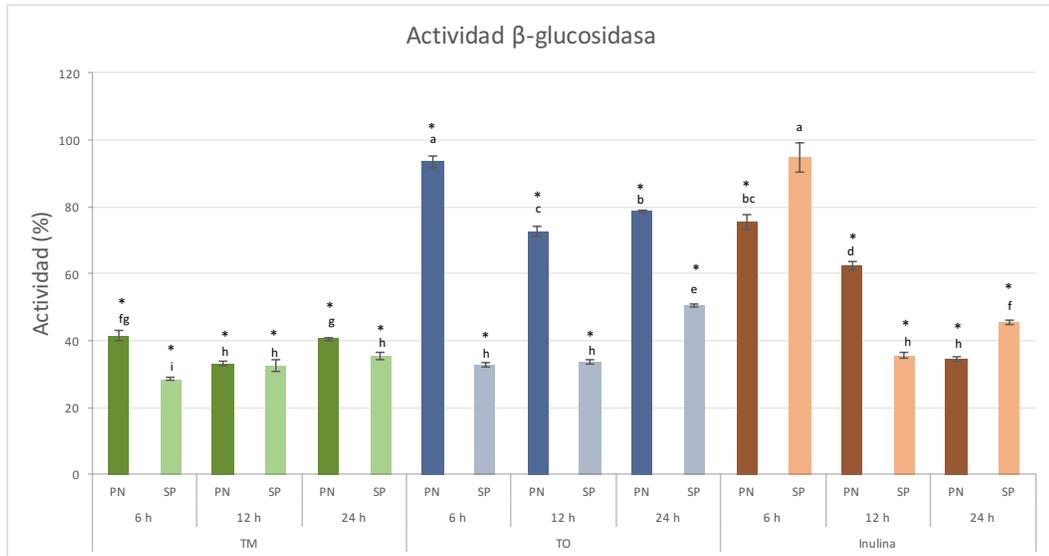


Figura 6. Actividad de la β -glucosidasa en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso. PN = peso normal, SP = sobrepeso, TM = Tostado medio, TO = Tostado oscuro. Letras diferentes expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. * indican diferencias significativa ($\alpha = 0.05$) por la prueba de Dunnett vs el tiempo 0 h (dato no mostrado, tomado como 100 % de actividad). Los resultados son expresados como porcentaje (%) de actividad. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Una dieta compuesta de grandes cantidades de glucósidos de origen vegetal (por ejemplo, flavonoides) puede ser la razón para la formación de sustancias nocivas en el intestino grueso. Glucósidos que no han sido digeridos son transportados al intestino grueso donde se hidrolizan bajo la influencia de bacterias β -glucosidasa (Mroczyńska y Libudzisz, 2010). La caracterización de las β -glucuronidasa y β -glucosidasa han demostrado que sus importantes funciones se expresan selectivamente por los miembros de la microbiota intestinal y que la composición de la dieta explica la inducción de genes que expresan estas enzimas (Dabek *et al.*, 2008; McIntosh *et al.*, 2012).

Estudios realizados por Flores *et al.* (2012) reportaron que las personas con dietas vegetarianas, presentaban niveles más bajos de β -glucuronidasa. Ling y Hänninen (1992) quien informó que las actividades tanto de β -glucuronidasa y β -glucosidasa disminuyeron al cambiar la dieta, de omnívoro a una dieta vegana sin cocer. Por el contrario Flores *et al.* (2012) reportaron una mayor actividad de β -glucuronidasa significativa en los participantes que habían perdido peso, esta

observación concuerda con un estudio el cual reportó un aumento de la actividad β -glucuronidasa en voluntarios obesos los cuales siguen una dieta de pérdida de peso (McIntosh *et al.*, 2012).

La ureasa cataliza la hidrólisis de urea, un importante producto de desecho nitrogenado de los mamíferos, para producir amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa y amoníaco permiten que bacterias patógenas sobrevivan en el tracto gastrointestinal y contribuyen a daños en los tejidos de la mucosa (Malin *et al.*, 1996). En la Figura 7 se muestra la actividad de la ureasa como se puede observar tuvo un comportamiento similar para ambos tipos de tostado con una inhibición de la actividad de alrededor de 50 %, siendo la inulina la que presenta la menor inhibición de la actividad. En las condiciones probadas, la microbiota del individuo de peso normal tuvo mayor inhibición de la actividad de ureasa.

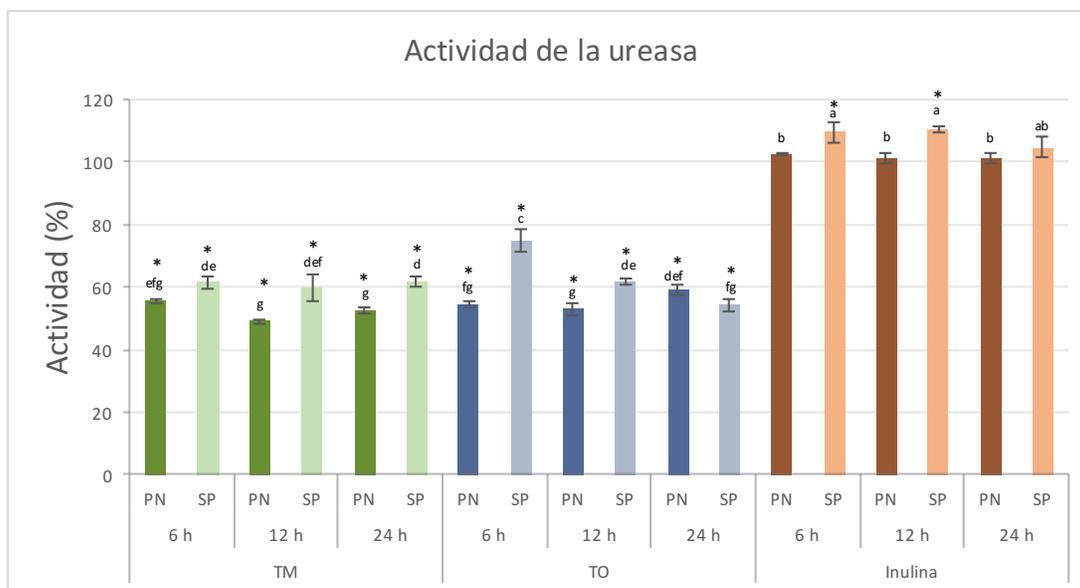


Figura 7. Actividad de la ureasa en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso. PN = peso normal, SP = sobrepeso, TM = Tostado medio, TO = Tostado oscuro. Letras diferentes expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. * indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) por la prueba de Dunnett vs el tiempo 0 h (dato no mostrado, tomado como 100 % de actividad). Los resultados son expresados como porcentaje (%) de actividad. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Brigidi *et al.* (2001) evaluaron el contenido de la enzima ureasa en pacientes que presentan el síndrome del intestino irritable a los cuales les fue administrado un

probiótico (VSL-3), el cual ha sido utilizado en pacientes con esta enfermedad en particular con colitis ulcerosa, quienes han presentado niveles elevados de esta enzima (Malin *et al.*, 1996), encontrando que después de una administración durante 20 días del probiótico la actividad de la ureasa disminuyó alrededor de un 50 % como resultado de cambios en la microbiota intestinal, aunque el número de algunos grupos de bacterias ureolíticas tales como *Bacteroides*, clostridios y enterobacterias no cambiaron significativamente. Se sugiere que el aumento del crecimiento y actividad de las bifidobacterias y bacterias del ácido láctico podrían alterar de manera significativa las actividades metabólicas de la flora colónica, incluyendo la actividad de la ureasa. El comportamiento del prebiótico es similar a lo reportado en este trabajo para ambas variedades de café, TM y TO, con una disminución de la actividad de casi un 50 %. Sin embargo la inulina no presentó disminución de la actividad, lo cual concuerda con lo reportado por Gråsten *et al.* (2003) quienes evaluaron el efecto de la inulina en la actividad metabólica de la microbiota fecal reportando que no había efecto en la actividad de la enzima ureasa.

La microbiota en el individuo con sobrepeso presentó mayor actividad en comparación con la de peso normal tanto para TM, TO e inulina, así como durante las etapas de la fermentación (6, 12 y 24 h). An *et al.* (2011) evaluaron la actividad de la enzima ureasa encontrando valores más elevados para el grupo con una dieta alta en grasa en comparación del grupo una dieta estándar, lo cual tiene relación con el aumento de actividad para el grupo de sobrepeso reportado en este trabajo. También reportaron un tercer grupo con una dieta alta en grasa adicionada con LAB (suplemento de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* SPM 1204) encontrando mayor actividad en comparación con el control, el cual es un comportamiento muy similar a la inulina utilizada en este trabajo.

Por otro lado la triptofanasa está asociada con la conversión de triptófano en indol y la formación de indol en el tracto gastrointestinal puede ser importante en la etiología del cáncer de colon (Chung *et al.*, 1975; DeMoss y Moser, 1969). La triptofanasa es producida por la microbiota intestinal normal (Hoch y Demoss, 1965), y su inducción se relaciona con una mayor incidencia de cáncer de colon. Además, el alto pH de las heces está relacionada con la incidencia de cáncer de colon: la

población con pH fecal alcalino presenta mayor riesgo de cáncer de colon que aquellos con pH fecal ácido (Kim *et al.*, 1995).

En la Figura 8 se muestra la actividad de la enzima triptofanasa tanto para la inulina, como para cada uno de las muestras de CU con diferentes grados de tostado, encontrando una mayor actividad de la enzima para el TO en comparación con TM e inulina a las 6, 12 y 24 h. La mayor actividad enzimática se da en los grupos de sobrepeso en cada uno de los tratamientos. De ahí que, el CU/TM sometido a fermentación con microbiota de peso normal logró la mayor inhibición de esta enzima (hasta en un 80 %) a las 12 h de incubación. Estos valores son similares, aunque ligeramente menores, al efecto logrado con inulina en las mismas condiciones. Mientras que, el CU/TM mostró su mayor inhibición a las 6 h de fermentación con microbiota del individuo de peso normal (18.72 %), siendo con la microbiota de sobrepeso las muestras que inhibieron a la triptofanasa en un 40 %.

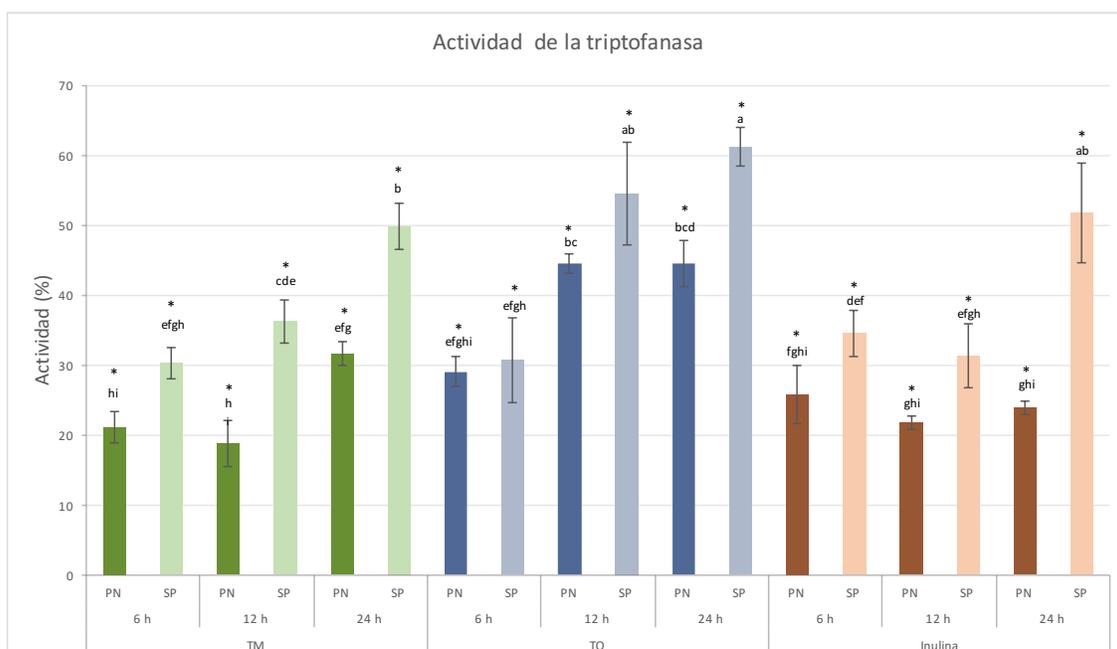


Figura 8. Actividad de la triptofanasa en los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso. PN = peso normal, SP = sobrepeso, TM = Tostado medio, TO = Tostado oscuro. Letras diferentes expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. * indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) por la prueba de Dunnett vs el tiempo 0 h (dato no mostrado, tomado como 100 % de actividad). Los resultados son expresados como porcentaje (%) de actividad. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

La concentración de triptófano en el tracto gastrointestinal varía, dependiendo de la dieta, la edad y estado fisiológico del animal. Chung *et al.* (1975) evaluaron el contenido de triptofanasa en el ambiente intestinal utilizando ratas alimentadas con una dieta estándar y otras alimentadas con una dieta compuesta de carne de res molida extra magra, donde se encontró que el contenido de triptófano se incrementó significativamente sólo en las heces de los animales con una dieta de carne; esto puede ser el resultado de que algunos oligopéptidos intactos que alcanzan el colon, donde el triptófano se libera por peptidasas de la microflora. El triptófano es un componente importante de las proteínas de la dieta. El indol producido se absorbe rápidamente en la vía sanguínea a través de las células epiteliales del intestino grueso, y sus derivados se excretan en la orina (Fordtran *et al.*, 1964). Por lo tanto, las células epiteliales intestinales están constantemente en contacto con las moléculas de indol durante su transporte. El indol se considera como cancerígeno de modo que su producción en el colon puede ser un factor en la etiología del cáncer de colon. La incidencia de cáncer de colon en una población con una dieta alta en carne es significativamente mayor que en una población con una dieta baja en carne (Wynder y Reddy, 1974).

Lee *et al.* (2011) reportaron en su estudio con probióticos, tales como bacterias del ácido láctico BAL (*Bifidobacterium longum* SPM1205, *Lactobacillus acidophilus*, y SAFELAC aislados de *Pediococcus pentosaceus*) suplemento ($10^7 \sim 10^8$ unidades formadoras de colonias por día formando) se administró por vía oral a ratas Sprague-Dawley macho diariamente por 2 semanas junto con una dieta que contenía 5 o 10 % de celulosa, reduciendo significativamente ($p < 0.05$) la actividad de las enzimas perjudiciales como β -glucosidasa, β -glucuronidasa y triptofanasa, sin afectar la actividad de la ureasa. Además, la mayoría de los efectos de BAL se mejoraron en combinación con 5 % de celulosa en comparación con el control, y los efectos de 5 % de celulosa fueron más altos que los de 10 % de celulosa. Por lo que sugiere que la incorporación de fibra como la celulosa junto con las BAL en la dieta diaria mejora la actividad enzimática nociva para las ratas. Varios estudios han informado de que el consumo de leche fermentada con *Lactobacillus* o especies *Bifidobacterium* puede reducir la actividad de enzimas perjudiciales tales como β -

glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa, ureasa, nitrorreductasa y azorreductasa, todos los cuales son reconocidos factores de riesgo para la generación de sustancias tóxicas y cancerígenas (Choi *et al.*, 2005; Marteau *et al.*, 1990).

Aun faltan más estudios sobre la actividad de las enzimas, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa en modelos con CU, debido a que este subproducto presenta diferentes características y composición, además de que la actividad de cada enzima se ve influenciada por la composición de la microbiota, así como los componentes del alimento.

VI.15 Perfiles microbianos de los los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado.

Una técnica complementaria para dar una visión general de la diversidad del ecosistema microbiano es la electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en una amplificación por PCR de secuencias de diagnóstico de ADN, generalmente las secuencias de 16S rRNA (McCartney, 2002). Los amplicones se separan en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente de urea o un gradiente de temperatura. Esto da lugar a la separación específica de secuencia de las bandas de DNA.

Un factor importante en microbiología es la identificación de microorganismos, debido a la importancia de conocer acerca de la biodiversidad procariotas. Comúnmente, las técnicas de identificación moleculares implican la secuenciación del gen 16S rRNA procariota. Esto ha demostrado ser útil para establecer relaciones filogenéticas coherentes a nivel taxonómico de especie o incluso género, familia, entre otros. (Hillis y Dixon, 1991; Stackebrandt y Rainey, 1995). Además, el espaciador interno transcrito (ITS, por sus siglas en inglés), que se encuentra entre los genes 16S y 23S en la mayoría de los operones de ARN ribosomal de los procariotas, es mucho más variable que los genes adyacentes ribosomales 16S y 23S; esta región consiste en una serie conservada de DNA que se encuentra en todas las cepas de una sola especie, pero podría encontrarse a

nivel del género o la familia (García-Martínez *et al.*, 1999; Gürtler y Stanisich, 1996). La ubicación de los ITS por los genes conservados 16S y 23S rRNA permite la fácil amplificación PCR utilizando primers universales. Sin embargo la secuenciación o caracterización de los ITS se ha convertido en algo muy común en los últimos años para la tipificación de trabajo en la genética de poblaciones o en la epidemiología molecular (Antón *et al.*, 1998).

Después de someter el CU a una fermentación colónica *in vitro*, se realizó la extracción de DNA, con la finalidad de realizar la técnica RISA (Ribosomal intergenic spacer analysis, análisis del espacio intergénico ribosomal) utilizando primers ITS (Internal transcribed spacers, espaciadores transcritos internos) y con esto obtener un patrón de bandeos. En la Figura 9 se muestra los perfiles microbianos de los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado, así como de la inulina a las 24 h de fermentación, utilizando microbiota de sujetos con peso normal y sobrepeso.

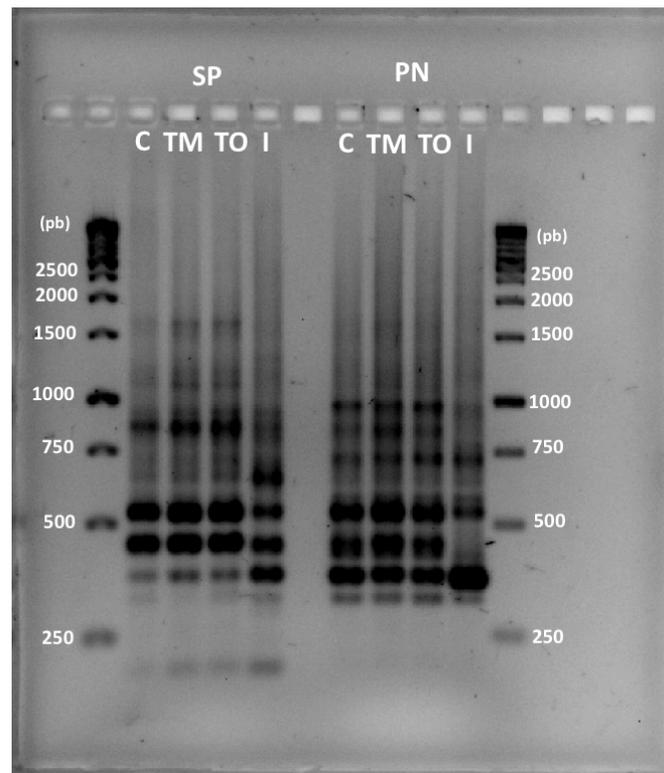


Figura 9. Perfiles microbianos de los los productos de la fermentación colónica *in vitro* del café usado con dos grados de tostado sobre la microbiota intestinal. SP=sobrepeso. PN=peso normal. C=control. TM=tostado medio, TO= tostado oscuro. I=inulina. pb=pares de bases.

Como se observa en la Figura 9 para ambos grados de tostado, el patrón de bandeo es similar al control, tanto para la microbiota del individuo de peso normal como la del individuo con sobrepeso, respectivamente; en tanto el patrón distinto se presentó con la inulina, en teoría una banda representaría una comunidad bacteriana. Por lo que para observar mejor este bandeo se realizó un árbol filogenético que se muestra en la Figura 10, que nos permite apreciar la agrupación de las bandas por medio de pares de bases; lo que permite obtener un marco apropiado para su clasificación e identificación.

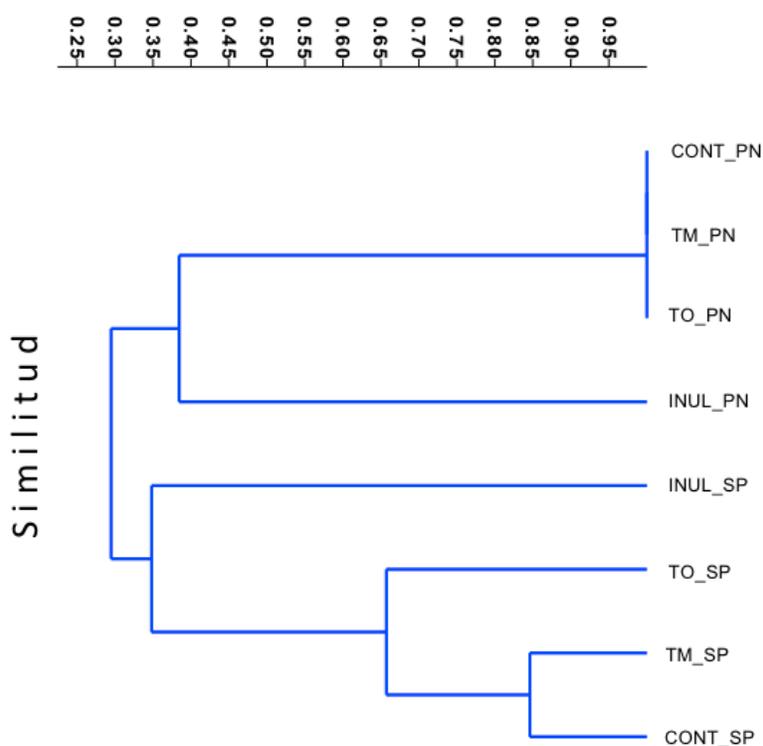


Figura 10. Árbol filogenético de los perfiles microbioanos. SP=sobrepeso. PN=peso normal. CONT=control. TM=tostado medio, TO= tostado oscuro. INUL=inulina.

Realizando un análisis de cluster, método conveniente para la identificación de grupos homogéneos (Mooi y Sarstedt, 2010), utilizando agrupación por pares y “coeficiente Jaccard´s”, el cual permite medir la similitud de la medición de variables binarias. El porcentaje de similitud de ambas microbiotas, SP y PN, fue de un 33 %, por lo que presentan diferencia en un 67 %. Para la microbiota del individuo de

peso normal se realiza una bifurcación obteniendo dos ramas, un cluster que agrupa el control, TM y TO observando una similitud del 100 % y la otra rama es la inulina con una diferencia del 63 % respecto a la rama mencionada anteriormente. En cambio, para el grupo del individuo con sobrepeso se observa nuevamente dos bifurcaciones, una de ellas forma una nueva división, que esta a su vez forma otra, encontrando que TM y control tienen una diferencia entre ellas del 15 %, esta agrupación muestra una similitud con el TO de aproximadamente un 65 %, por lo que el TO muestra una diferencia del alrededor del 35 % respecto al TM y el control negativo. Por lo que la microbiota del individuo de peso normal no muestra un cambio significativo; en tanto, la microbiota de sobrepeso, aunque no se logró una agrupación con la inulina, el TO muestra diferencias en comparación con el TM y el control.

Jiménez-Zamora *et al.* (2015) demostraron que la incubación del CU más melanoidinas de café y bifidobacterias no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo; por el contrario, el CU sin la presencia de las melanoidinas ejercieron un efecto positivo sobre las bacterias consideradas benéficas, aumentando el bifidobacterias y *lactobacillum*, mientras que las bacterias consideradas dañinas no se vieron afectados. Por lo que aún hace falta más investigación del CU relacionado con el efecto sobre la microbiota intestinal.

VII. CONCLUSIONES

El CU muestra capacidad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión y fermentación colónica *in vitro*.

Los oligosacáridos del CU son bioaccesibles durante la digestión y fermentación colónica *in vitro*, logrando la mayor bioaccesibilidad durante la última etapa de la fermentación colónica mostrando influencia de la microbiota con sujetos de peso normal y sobrepeso, observando que la posible disbiosis presente en la microbiota con sobrepeso influye sobre la eficiencia en la utilización de estos compuestos.

La mayor bioaccesibilidad gastrointestinal de las melanoidinas se logró durante los 15 min de digestión en el intestino delgado de CU/TM, además para este mismo grado de tostado se logró la mayor permeabilidad a los 30 min de digestión. Resultados que sugieren la bioaccesibilidad y permeabilidad de los compuestos .

El CU/TM mostró la mayor inhibición de la actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa, las cuales son consideradas dañinas, teniendo un efecto similar al de la inulina y en algunos ensayos el CU/TM tuvo un mayor efecto; la mayor actividad de las enzimas β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa fue para TM con microbiota de SP, sin embargo para la enzima β -glucosidasa sucede lo contrario teniendo mayor actividad la microbiota de PN.

El perfil microbiano no mostró una diferencia significativa del CU respecto al control negativo para la microbiota del individuo de peso normal, sin embargo para la microbiota del individuo con sobrepeso el TO mostró diferencia control negativo de alrededor del un 35 %.

Los resultados sugieren el potencial funcional del CU y su empleo como ingrediente en la industria de alimentos, dando no solo un valor agregado a un producto de desecho, sino un efecto benéfico a la salud de quién lo consume.

Debido a que el efecto del CU en los perfiles microbianos no son concluyentes, se requiere de más estudios para ampliar y profundizar los resultados del presente trabajo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. (2001). The definition of dietary fiber. Retrieved from <http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Documents/DietaryFiber/DFDef.pdf>
- Alam, M. A., Al-Jenoobi, F. I., & Al-Mohizea, A. M. (2012). Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(3), 326–336. <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01391.x>
- Ames, J. M., Wynne, A., Hofmann, A., Plos, S., & Gibson, G. R. (1999). The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. *British Journal of Nutrition*, 82(06), 489–495. <http://doi.org/10.1017/S0007114599001749>
- Anders, J. T. (1956). Physiologic Chloride Level of the Saliva. *Journal of Applied Physiology*, 8(6), 659–660.
- Anderson, J., Gustafson, N., Bryant, C., & Tietyen-Clark, J. (1987). Dietary fiber and diabetes: a comprehensive review and practical application. *Journal of the American Dietetic Association*, 87(9), 1189–1197.
- Andlauer, W., & Fürst, P. (2003). Absorption and metabolism of phenolic phytochemicals in the isolated rat small intestine with special reference to isoflavones and anthocyanins - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12(Suppl.1), 117–127.
- Andoh, A., Tsujikawa, T., & Fujiyama, Y. (2003). Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Current Pharmaceutical Design*, 9(4), 347–358. <http://doi.org/10.2174/1381612033391973>
- Andueza, S., Cid, C., & Cristina Nicoli, M. (2004). Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and “Torrefacto” coffee. *LWT - Food Science and Technology*, 37(8), 893–897. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.004>
- Andueza, S., Maeztu, L., Pascual, L., Ibáñez, C., de Peña, M. P., & Cid, C. (2003). Influence of extraction temperature on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(3), 240–248. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1304>
- Andueza, S., Vila, M. A., Paz de Peña, M., & Cid, C. (2007). Influence of coffee/water ratio on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and*

Agriculture, 87(4), 586–592. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2720>

- An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 116. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-10-116>
- Antón, A. I., Martínez-Murcia, A. J., & Rodríguez-Valera, F. (1998). Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *Journal of Molecular Evolution*, 47(1), 62–72.
- AOAC. (2002). Official methods of analysis. Association of official analytical chemist. 920.39, 920.105, 925.23, 945.46, 965.25, 957.04. Retrieved from http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx?hkey=5142c478-ab50-4856-8939-a7a491756f48
- Appeldoorn, M. M., Vincken, J.-P., Gruppen, H., & Hollman, P. C. H. (2009). Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *The Journal of Nutrition*, 139(8), 1469–1473. <http://doi.org/10.3945/jn.109.106765>
- Arabski, M., Konieczna, I., Sołowiej, D., Rogoń, A., Kolesińska, B., Kamiński, Z., & Kaca, W. (2010). Are anti-*Helicobacter pylori* urease antibodies involved in atherosclerotic diseases? *Clinical Biochemistry*, 43(1-2), 115–123. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.09.016>
- Arbizu, R., & Nurko, S. (2016). Colon: Structure and Function A2 - Caballero, Benjamin. In P. M. Finglas & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 259–264). Oxford: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472001872>
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419–421. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)
- Artursson, P., & Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2)

- cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), 880–885.
- Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 27–43.
- Arya, M., & Rao, L. J. M. (2007a). An impression of coffee carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 51–67. <http://doi.org/10.1080/10408390600550315>
- Aura, A.-M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev*, 7(3), 407–429. <http://doi.org/10.1007/s11101-008-9095-3>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., ... Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–15723. <http://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717), 1915–1920. <http://doi.org/10.1126/science.11104816>
- Bajzer, M., & Seeley, R. J. (2006). Physiology: obesity and gut flora. *Nature*, 444(7122), 1009–1010. <http://doi.org/10.1038/4441009a>
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <http://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Barthe, L., Bessouet, M., Woodley, J. F., & Houin, G. (1998). The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. *International Journal of Pharmaceutics*, 173(1–2), 255–258. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00225-7](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00225-7)
- Beaud, D., Tailliez, P., & Anba-Mondoloni, J. (2005). Genetic characterization of the beta-glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7), 2323–2330. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27712-0>
- Bekedam, E. K., De Laat, M. P. F. C., Schols, H. A., Van Boekel, M. A. J. S., & Smit, G. (2007). Arabinogalactan proteins are incorporated in negatively charged coffee brew

- melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 761–768.
<http://doi.org/10.1021/jf063010d>
- Bekedam, E. K., Schols, H. A., van Boekel, M. A. J. S., & Smit, G. (2006). High molecular weight melanoidins from coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7658–7666. <http://doi.org/10.1021/jf0615449>
- Belitz. (2009). *Food chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Belitz, H.-D., & Grosch, W. (1999). Coffee, tea, cocoa. In *Food Chemistry* (pp. 874–904). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-07281-3_22
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry*. (M. M. Burghagen, Trans.) (Edición: 3rd revised ed.). Berlin ; New York: Springer.
- Berbert, P. A., Queiroz, D. M., Sousa, E. F., Molina, M. B., Melo, E. C., & Faroni, L. R. D. (2001). PH—Postharvest technology: dielectric properties of parchment coffee. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 80(1), 65–80. <http://doi.org/10.1006/jaer.2000.0689>
- Bernalier-Donadille, A. (2010). Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34, Supplement 1, S16–S22. [http://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70016-6](http://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70016-6)
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (1994). Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35(4), 483–489.
- Bertrand, B., Guyot, B., Anthony, F., & Lashermes, P. (2003). Impact of the coffea canephora gene introgression on beverage quality of C. arabica. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 107(3), 387–394. <http://doi.org/10.1007/s00122-003-1203-6>
- Betancur-Ancona, D., Peraza-Mercado, G., Moguel-Ordoñez, Y., & Fuertes-Blanco, S. (2004). Physicochemical characterization of lima bean (Phaseolus lunatus) and Jack bean (Canavalia ensiformis) fibrous residues. *Food Chemistry*, 84(2), 287–295. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00213-9](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00213-9)
- Bibiloni, R., Mangold, M., Madsen, K. L., Fedorak, R. N., & Tannock, G. W. (2006). The

- bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of Medical Microbiology*, 55(8), 1141–1149. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46498-0>
- Blaut, M., & Clavel, T. (2007). Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 751S–755S.
- Boisen, S., & Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4(01), 141–162. <http://doi.org/10.1079/NRR19910012>
- Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1338–1343. <http://doi.org/10.1021/jf034974x>
- Borrelli, R. C., & Fogliano, V. (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(7), 673–678. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200500011>
- Borrelli, R. C., Fogliano, V., Monti, S. M., & Ames, J. M. (2002a). Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. *European Food Research and Technology*, 215(3), 210–215. <http://doi.org/10.1007/s00217-002-0531-0>
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002b). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6527–6533. <http://doi.org/10.1021/jf025686o>
- Bosscher, D., Breynaert, A., Pieters, L., & Hermans, N. (2009). Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 6, 5–11.
- Bowey, E., Adlercreutz, H., & Rowland, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 41(5), 631–636.
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S., & Soccol, C. R. (2000). Biological detoxification of

coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1–2), 127–133. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00186-1](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00186-1)

- Bravo, J., Juárez, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12565–12573. <http://doi.org/10.1021/jf3040594>
- Bravo, J., Monente, C., Juárez, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610–616. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.026>
- Brigidi, P., Vitali, B., Swennen, E., Bazzocchi, G., & Matteuzzi, D. (2001). Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Research in Microbiology*, 152(8), 735–741. [http://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01254-2](http://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01254-2)
- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. *Nutrients*, 4(8), 1095–1119. <http://doi.org/10.3390/nu4081095>
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsędek, A., Żyżelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S., & Janda, B. (2009). Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *European Food Research and Technology*, 228(6), 913–922. <http://doi.org/10.1007/s00217-008-1004-x>
- Café Gila. (2014). Retrieved from <http://www.cafegila.net/el-arte-de-un-cafe-en-mexico/hablemos-de-cafe/la-planta-de-cafe>
- Calliste, C. A., Trouillas, P., Allais, D. P., Simon, A., & Duroux, J. L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3321–3327.
- Calvani, R., Brasili, E., Praticò, G., Sciubba, F., Roselli, M., Finamore, A., ... Miccheli, A. (2014). Application of NMR-based metabolomics to the study of gut microbiota in obesity. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48 Suppl 1, S5–7.

<http://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000236>

- Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223(4), 469–474. <http://doi.org/10.1007/s00217-005-0226-4>
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., & Wolf, B. W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, 127(1), 130–136.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. a., Guzman-Maldonado, S. h., Paredes-Lopez, O., Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>
- 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*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., Delzenne, N. M. (2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(5), 1236–1243. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28095>
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Daffonchio, D. (2004). Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6147–6156. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6147-6156.2004>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288. <http://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>

- Cerdá, B., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2005). Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 227–235. <http://doi.org/10.1021/jf049144d>
- Chabrillange, N., Dussert, S., Engelmann, F., Doubeau, S., & Hamon, S. (2000). Desiccation tolerance in relation to soluble sugar contents in seeds of ten coffee (*Coffea* L.) species. *Seed Science Research*, 10(3), 393–396.
- Chen, H.-M., Yu, Y.-N., Wang, J.-L., Lin, Y.-W., Kong, X., Yang, C.-Q., Fang, J.-Y. (2013). Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 1044–1052. <http://doi.org/10.3945/ajcn.112.046607>
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S–229S.
- Choi, S. S., Kang, B. Y., Chung, M. J., Kim, S. D., Park, S. H., Kim, J. S., Ha, N. J. (2005). Safety assessment of potential lactic acid bacteria *Bifidobacterium longum* SPM1205 isolated from healthy Koreans. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43(6), 493–498.
- Christensen, E. G., Licht, T. R., Leser, T. D., & Bahl, M. I. (2014). Dietary xylo-oligosaccharide stimulates intestinal bifidobacteria and lactobacilli but has limited effect on intestinal integrity in rats. *BMC Research Notes*, 7, 660. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-7-660>
- Chung, K. T., Fulk, G. E., & Slein, M. W. (1975). Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(5), 1073–1078.
- Chu, Y.-F. (2012). *Coffee: Emerging health effects and disease prevention*. John Wiley & Sons.
- Cinquin, C., Blay, G. L., Fliss, I., & Lacroix, C. (2004). Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an *in vitro* colonic fermentation model. *Microbial Ecology*, 48(1), 128–138. <http://doi.org/10.1007/s00248-003-2022-7>
- Cinquin, C., Blay, G. L., Fliss, I., & Lacroix, C. (2006). New three-stage *in vitro* model for

- infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(2), 324–336. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00117.x>
- Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 421–444. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.021>
- Conesa, D. P., López, G., & Ros, G. (2004). Principales Prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 20(0), 5–20.
- Couteau, D., McCartney, A. I., Gibson, G. r., Williamson, G., & Faulds, C. b. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), 873–881. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01316.x>
- Couto, R. M., Fernandes, J., da Silva, M. D. R. G., & Simões, P. C. (2009). Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51(2), 159–166. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.09.009>
- Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 7(11), 353–361. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(96\)10038-8](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10038-8)
- Cruz-Bravo, R. K., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Garcia-Gasca, T., Campos-Vega, R., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2011). Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *Journal of Food Science*, 76(2), T41–47. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02025.x>
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., ... Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7777–7784. <http://doi.org/10.1021/jf3018854>
- Cruz, R., Morais, S., Mendes, E., Pereira, J. A., Baptista, P., & Casal, S. (2014). Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. *Food Chemistry*, 148, 294–299. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.059>

- Cummings, J. H., & Englyst, H. N. (1987). Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(5 Suppl), 1243–1255.
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *The Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443–459.
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *The British Journal of Nutrition*, 87 Suppl 2, S145–151. <http://doi.org/10.1079/BJNBJN/2002530>
- Dabek, M., McCrae, S. I., Stevens, V. J., Duncan, S. H., & Louis, P. (2008). Distribution of beta-glucosidase and beta-glucuronidase activity and of beta-glucuronidase gene in human colonic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 487–495. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00520.x>
- Dahllöf, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3376–3380. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3376-3380.2000>
- Daniel, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 361–384. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149>
- Daniells, S. (2009). Coffee may boost gut health: Nestle study. Retrieved April 13, 2015, from <http://www.nutraingredients.com/Manufacturers/Coffee-may-boost-gut-health-Nestle-study>
- Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Anno, A., & Pietrangeli, B. (2006). Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5982–5989. <http://doi.org/10.1128/AEM.01361-06>
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di, B., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 348–361.

- Davis, L. M. G., Martínez, I., Walter, J., & Hutkins, R. (2010). A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 285–292. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.007>
- Delaney, B., Nicolosi, R. J., Wilson, T. A., Carlson, T., Frazer, S., Zheng, G.-H., ... Knutson, N. (2003). Beta-glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. *The Journal of Nutrition*, 133(2), 468–475.
- Del Castillo, M. D., Ames, J. M., & Gordon, M. H. (2002). Effect of Roasting on the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3698–3703. <http://doi.org/10.1021/jf011702q>
- De Leenheer, L., & Hoebregs, H. (1994, January 12). Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. Retrieved August 10, 2016, from <http://eurekamag.com/research/002/679/002679039.php>
- Delgado-Andrade, C. (2014). Maillard reaction products: some considerations on their health effects : Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Retrieved April 4, 2015, from <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2014.52.issue-1/cclm-2012-0823/cclm-2012-0823.xml>
- Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2005). Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1403–1407. <http://doi.org/10.1021/jf048500p>
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832–7836. <http://doi.org/10.1021/jf0512353>
- Delgado, P. A., Vignoli, J. A., Siika-aho, M., & Franco, T. T. (2008). Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 110(1), 168–176. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.029>
- Dell, C., Ames, J. M., Gibson, G., & Wynne, A. (2003). Fermentation of heated gluten systems by gut microflora. *European Food Research and Technology - EUR FOOD RES TECHNOL*, 217(5), 382–386. <http://doi.org/10.1007/s00217-003-0773-5>

- Delzenne, N. M., & Roberfroid, M. R. (1994). Physiological Effects of Non-Digestible Oligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 27(1), 1–6. <http://doi.org/10.1006/fstl.1994.1001>
- De Moreno de LeBlanc, A., & Perdígón, G. (2005). Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas De Microscopía Electronica ... Et. Al*, 29(1), 15–24.
- DeMoss, R. D., & Moser, K. (1969). Tryptophanase in diverse bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 167–171.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., & Relman, D. A. (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(9), 517–523. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2006.06.013>
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811–818. <http://doi.org/10.1038/nature06245>
- Dey, P. M. (1984). D-galactose-containing oligosaccharides. *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants / Edited by P.M. Dey, R.A. Dixon*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302652961>
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2045–2052. <http://doi.org/10.1021/jf051706l>
- Díaz-Rubio, & Saura-Calixto. (2007). Dietary fiber in brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1999–2003.
- DiBaise, J. K., Frank, D. N., & Mathur, R. (2012). Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*, 1(1), 22–27. <http://doi.org/10.1038/ajgsup.2012.5>
- Down, P. F., Agostini, L., Murison, J., & Wrong, O. M. (1972). The Interrelations of Faecal Ammonia, pH and Bicarbonate: Evidence of Colonic Absorption of Ammonia by Non-ionic Diffusion. *Clinical Science*, 43(1), 101–114. <http://doi.org/10.1042/cs0430101>
- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*,

405(6789), 903–904. <http://doi.org/10.1038/35016151>

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–1638. <http://doi.org/10.1126/science.1110591>

Englyst, H. n., Hay, S., & Macfarlane*, G. t. (1987). Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 45(3), 163–171. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02352.x>

Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 61–72.

Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>

Etienne, H. (2005). Somatic embryogenesis protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In S. M. Jain & P. K. Gupta (Eds.), *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (pp. 167–179). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-2985-3_14

Examine. (2015). Green coffee extract - scientific review on usage, dosage, side effects. Retrieved May 10, 2015, from <http://examine.com/supplements/Green+Coffee+Extract/>

Faist, V., & Erbersdobler, H. F. (2001). Metabolic transit and *in vivo* effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the maillard reaction. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45(1), 1–12. <http://doi.org/10.1159/000046699>

Fan, W., Huo, G., Li, X., Yang, L., & Duan, C. (2014). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the six months of life. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 133–143.

FAO. (2004). Codex Alimentarius Commission. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/008/j1464e.pdf>

Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1505–1513. <http://doi.org/10.1021/jf048701t>

Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of*

- Plant Physiology*, 18(1), 23–36. <http://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>
- Farris, P. (2007). Idebenone, green tea, and Coffeeberry extract: new and innovative antioxidants. *Dermatologic Therapy*, 20(5), 322–329. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00146.x>
- Fathia Khemiss, S. A. (2008). Effect of *in vitro* exposure to *Vibrio vulnificus* on hydroelectrolytic transport and structural changes of sea bream (*Sparus aurata* L.) intestine. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 541–9. <http://doi.org/10.1007/s10695-008-9265-7>
- Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395–401. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.036>
- Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.-L., Bolte, E., Kaul, A. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(Suppl 1), S6–S16. <http://doi.org/10.1086/341914>
- Finot, P. A., & Magnenat, E. (1981). Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Progress in Food and Nutrition Science*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301969360>
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1101–1111. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x>
- Flores, R., Shi, J., Gail, M. H., Gajer, P., Ravel, J., & Goedert, J. J. (2012). Association of fecal microbial diversity and taxonomy with selected enzymatic functions. *PloS One*, 7(6), e39745. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0039745>
- Fogliano, V., & Morales, F. J. (2011). Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread. *Food & Function*, 2(2), 117–123. <http://doi.org/10.1039/C0FO00156B>
- Follmer, C. (2010). Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *Journal of Clinical Pathology*, 63(5), 424–430. <http://doi.org/10.1136/jcp.2009.072595>

- Folstar, P., Clarke, R. J., & Macrae, R. (1985). *In Coffee* (Vol. 1). Elsevier Science.
- Food Chemistry 4th Edition. (n.d.). Retrieved April 2, 2015, from http://www.academia.edu/6244495/Food_Chemistry_4th_Edition
- Fordtran, J. S., Scroggie, W. B., & Polter, D. E. (1964). Colonic absorption of tryptophan metabolites in man. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *64*, 125–132.
- Franca, A. S., Oliveira, L. S., & Ferreira, M. E. (2009a). Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. *Desalination*, *249*(1), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2008.11.017>
- Franca, A. S., Oliveira, L. S., Oliveira, R. C. S., Agresti, P. C. M., & Augusti, R. (2009b). A preliminary evaluation of the effect of processing temperature on coffee roasting degree assessment. *Journal of Food Engineering*, *92*(3), 345–352. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.012>
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, *106*(1), 217–221. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.091>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3597–3604. <http://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *501*(1), 23–30. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.005>
- García-Gutiérrez, N. (2015). *Efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del café (Coffea arábica L.) usado sobre células de colon y su mecanismo de acción*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Martínez, J., Acinas, S. G., Antón, A. I., & Rodríguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S--23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, *36*(1-2), 55–64.
- García Peris, Bretón Lesmes, Cambor Álvarez, & Cuerda Compes. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, 11–16.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, *180*(1–2), 147–165. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)

- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., & Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, *108*(4), 975–982. [http://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90192-2](http://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90192-2)
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*(2), 259–275. <http://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gibson, G. R., & Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *The Journal of Applied Bacteriology*, *77*(4), 412–420.
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5778), 1355–1359. <http://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Ginz, M., Balzer, H. H., Bradbury, A. G. W., & Maier, H. G. (2000). Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *European Food Research and Technology*, *211*(6), 404–410. <http://doi.org/10.1007/s002170000215>
- Gniechwitz, D., Reichardt, N., Blaut, M., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2007). Dietary fiber from coffee beverage: degradation by human fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(17), 6989–6996. <http://doi.org/10.1021/jf070646b>
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., & Rudloff, S. (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of Nutrition*, *130*(12), 3014–3020.
- Gökmen, V., Serpen, A., & Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the “QUENCHER” approach. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(6), 278–288.
- Goldin, B., Dwyer, J., Gorbach, S. L., Gordon, W., & Swenson, L. (1978). Influence of diet and age on fecal bacterial enzymes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *31*(10), S136–S138.
- Gonthier, M.-P., Verny, M.-A., Besson, C., Rémésy, C., & Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, *133*(6), 1853–1859.

- Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J.-P., & Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 297–307. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.12.004>
- Goya, L., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., Bravo, L., & Morales, F. J. (2007). Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 536–545. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200600228>
- Grandfeldt Y, Björck I, Drews A, & Tovar J. (1992). An *in vitro* procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(9), 649–660.
- Granito, M., Champ, M., David, A., Bonnet, C., & Guerra, M. (2001). Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by *in vitro* fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(6), 543–550. <http://doi.org/10.1002/jsfa.839>
- Gråsten, S., Liukkonen, K.-H., Chrevatidis, A., El-Nezami, H., Poutanen, K., & Mykkänen, H. (2003). Effects of wheat pentosan and inulin on the metabolic activity of fecal microbiota and on bowel function in healthy humans. *Nutrition Research*, 23(11), 1503–1514. [http://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00164-7](http://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00164-7)
- Grembecka, M., Malinowska, E., & Szefer, P. (2007). Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Science of The Total Environment*, 383(1–3), 59–69. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.031>
- Gropper, S. S., & Smith, J. L. (2012). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Cengage Learning.
- Guillon, F., & Champ, M. M.-J. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 3, S293–306. <http://doi.org/10.1079/BJN2002720>
- Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology (Reading, England)*, 142 (Pt 1), 3–16. <http://doi.org/10.1099/13500872-142-1-3>
- Gurunath, S., Nanjwade, B. K., & Patila, P. A. (2014). Enhanced solubility and intestinal

absorption of candesartan cilexetil solid dispersions using everted rat intestinal sacs. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(3), 246–257. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.03.006>

Guyton, & Hall. (2001). *Fisiología Médica* (12a Edición). Retrieved from <http://rinconmedico.me/guyton-y-hall-tratado-de-fisiologia-medica-12a-edicion-truepdf-calidad-original-primicia.htm>

Hague, A., Butt, A. J., & Paraskeva, C. (1996). The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 55(3), 937–943.

Ha, M. A., Jarvis, M. C., & Mann, J. I. (2000). A definition for dietary fibre. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(12), 861–864.

Han, I. H., & Baik, B.-K. (2006). Oligosaccharide Content and Composition of Legumes and Their Reduction by Soaking, Cooking, Ultrasound, and High Hydrostatic Pressure. *Cereal Chemistry*, 83(4), 428–433. <http://doi.org/10.1094/CC-83-0428>

Heerdt, B. G., Houston, M. A., & Augenlicht, L. H. (1994). Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 54(12), 3288–3293.

Heimbach, J. T., Marone, P. A., Hunter, J. M., Nemzer, B. V., Stanley, S. M., & Kennepohl, E. (2010). Safety studies on products from whole coffee fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2517–2525. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.025>

Hernández, J. A., Heyd, B., & Trystram, G. (2008). On-line assessment of brightness and surface kinetics during coffee roasting. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 314–322. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.009>

Hernández Rodríguez, M., & Sastre Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición* (Díaz de Santos, S. A.). Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=SQLNJOSZClwC&pg=PA328&lpg=PA328&dq=hidrolisis+de+verbascosa+en+la+digestion&source=bl&ots=WaHjM5H90O&sig=VUZLpFEp73G4DJE_zUoZNdEEkIM&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj4-_CdnanNAhUUfVIKH4KAIYQ6AEIGjAA#v=onepage&q=hidrolisis%20de%20verbascosa%20en%20la%20digestion&f=false

Higashimura, Y., Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., Mizushima, K., Ushiroda, C.,

- Yoshikawa, T. (2016). Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(6), G367–375. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00324.2015>
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411–453.
- Hill, M. J. (1975). The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acids and steroids, and its relation to colon cancer. *Cancer*, 36(6 Suppl), 2387–2400.
- Hill, M. J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 6 Suppl 1, S43–45.
- Hilton, null, Kolakowski, null, Singer, null, & Smith, null. (1997). Efficacy of Lactobacillus GG as a Diarrheal Preventive in Travelers. *Journal of Travel Medicine*, 4(1), 41–43.
- Hoch, J. A., & Demoss, R. D. (1965). Physiological Effects of a Constitutive Tryptophanase in *Bacillus alvei*. *Journal of Bacteriology*, 90(3), 604–610.
- Hofmann, T. (1998). Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde – chemical characterisation of a red coloured domaine. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, 206(4), 251–258. <http://doi.org/10.1007/s002170050253>
- Hofmann, T., Bors, W., & Stettmaier, K. (1999). Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 391–396. <http://doi.org/10.1021/jf980627p>
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73–82. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003>
- Homma, S., & Fujimaki, M. (1981). Growth response of rats fed a diet containing nondialyzable melanoidin. *Progress in Food & Nutrition Science*, 5(1-6), 209–216.
- Horikoshi, M., Ohmura, M., Gomyo, T., Kuwabara, Y., & Ueda, A. (1981). Effects of browning products on the intestinal micro flora of the rat. *Prog Fd Nutr Sci*, 5, 223–

228.

- Hughes, R., & Rowland, I. R. (2000). Metabolic Activities of the Gut Microflora in Relation to Cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(2), 179–185. <http://doi.org/10.1080/089106000750060431>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>
- Illy, A., & Viani, R. (1995). *Espresso Coffee: The Chemistry of Quality*. Academic Press.
- Imeh, U., & Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6301–6306. <http://doi.org/10.1021/jf020342j>
- Infographic: Monthly coffeeTradeStats | Infogram. (2015). Retrieved April 11, 2015, from https://infogr.am/monthly_coffeetradestats
- International Coffee Organization. (2014). Retrieved from http://www.ico.org/trade_statistics.asp
- IUB-IUPAC, I. U. of P. and A. C. y J. (Joint C. on B. N. (1980). Abbreviated Terminology of oligosaccharide chains.
- Jacobs, D., Gaudier, E., Duynhoven, J., & Vaughan, E. (2009). Non-Digestible Food Ingredients, Colonic Microbiota and the Impact on Gut Health and Immunity: A Role for Metabolomics. *Current Drug Metabolism*, 10(1), 41–54. <http://doi.org/10.2174/138920009787048383>
- Jambunathan, R., Blain, H. L., Dhindsa, K. S., Hussein, L. A., Kogure, K., Li-Juan, L., & Youssef, M. M. (1994). Diversifying use of cool season food legumes through processing. In F. J. Muehlbauer & W. J. Kaiser (Eds.), *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes* (pp. 98–112). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0798-3_4
- Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., & Bibiloni, R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: A human volunteer study. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 117–121. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.011>
- Jenkins, D. J., Goff, D. V., Leeds, A. R., Alberti, K. G., Wolever, T. M., Gassull, M. A., &

- Hockaday, T. D. (1976). Unabsorbable carbohydrates and diabetes: Decreased post-prandial hyperglycaemia. *Lancet (London, England)*, 2(7978), 172–174.
- Jensen-Jarolim, E., & Untersmayr, E. (2006). Food safety: *In vitro* digestion tests are non-predictive for allergenic potential of food in stomach insufficiency. *Immunology Letters*, 102(1), 118–119. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.07.009>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.031>
- Johnson, C. D. (2013). *Mayo Clinic Gastrointestinal Imaging Review*. Oxford University Press, Incorporated.
- Johnson, S. S., Chevrette, M. G., Ehlmann, B. L., & Benison, K. C. (2015). Insights from the metagenome of an acid salt lake: the role of biology in an extreme depositional environment. *PLoS One*, 10(4), e0122869. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122869>
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 295(4), C849–C868. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>
- Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkituokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., Palva, A. (2007). The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, 133(1), 24–33. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.005>
- Keku, T. O., Dulal, S., Deveaux, A., Jovov, B., & Han, X. (2014). The Gastrointestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, ajpgi.00360.2012. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00360.2012>
- Kesteloot, H., Lesaffre, E., & Joossens, J. V. (1991). Dairy fat, saturated animal fat, and cancer risk. *Preventive Medicine*, 20(2), 226–236.
- Kim, D. H., Kang, H. J., Park, S. H., & Kobashi, K. (1994). Characterization of beta-glucosidase and beta-glucuronidase of alkalotolerant intestinal bacteria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17(3), 423–426.
- Kim, D.-H., Lee, J.-H., Bae, E.-A., & Han, M. J. (1995). Induction and inhibition of indole production of intestinal bacteria. *Archives of Pharmacal Research*, 18(5), 351–355.

<http://doi.org/10.1007/BF02976331>

- Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3713–3717. <http://doi.org/10.1021/jf020071c>
- Kim, Y.-I. (2000). AGA technical review: Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology*, *118*(6), 1235–1257. [http://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70377-5](http://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70377-5)
- Koh, L. W., Kasapis, S., Lim, K. M., & Foo, C. W. (2009). Structural enhancement leading to retardation of *in vitro* digestion of rice dough in the presence of alginate. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1458–1464. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.020>
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(24), 11757–11760. <http://doi.org/10.1021/jf802487s>
- Konishi, Y., Zhao, Z., & Shimizu, M. (2006). Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7539–7543. <http://doi.org/10.1021/jf061554+>
- Kovacs, A., Yacoby, K., & Gophna, U. (2010). A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. *Research in Microbiology*, *161*(3), 192–197. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.01.006>
- Kripke, S. A., Fox, A. D., Berman, J. M., Settle, R. G., & Rombeau, J. L. (1989). Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *13*(2), 109–116. <http://doi.org/10.1177/0148607189013002109>
- Kulkarni, N., & Reddy, B. S. (1994). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *207*(3), 278–283.
- Kumazawa, K., & Masuda, H. (2003). Investigation of the change in the flavor of a coffee drink during heat processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2674–2678. <http://doi.org/10.1021/jf021025f>

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691–693. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>
- Ky, C.-L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noiro, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75(2), 223–230. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00204-7](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00204-7)
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006a). Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *The Journal of Nutrition*, 136(5), 1192–1197.
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006b). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 96(01), 39–46. <http://doi.org/10.1079/BJN20051714>
- Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., & Dolaro, P. (2009a). Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8), 1044–1054. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200800446>
- Larrosa, M., Yañez-Gascón, M. J., Selma, M. V., González-Sarrías, A., Toti, S., Cerón, J. J., Espín, J. C. (2009b). Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2211–2220. <http://doi.org/10.1021/jf803638d>
- Lashermes, P., Andrade, A. C., & Etienne, H. (2008). Genomics of coffee one of the world's largest traded commodities. In P. H. Moore & R. Ming (Eds.), *Genomics of Tropical Crop Plants* (pp. 203–226). Springer New York. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-71219-2_9
- Lee, D. K., Park, S. Y., Jang, S., Baek, E. H., Kim, M. J., Huh, S. M., ... Ha, N. J. (2011). The combination of mixed lactic acid bacteria and dietary fiber lowers serum cholesterol levels and fecal harmful enzyme activities in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 34(1), 23–29. <http://doi.org/10.1007/s12272-011-0102-7>
- Lee, D.-Y. K., Chapkin, R. S., & Lupton, J. R. (1993). Dietary fat and fiber modulate colonic

- cell proliferation in an interactive site-specific manner. *Nutrition and Cancer*, 20(2), 107–118. <http://doi.org/10.1080/01635589309514277>
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157(9), 876–884. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.07.004>
- Lee, I. E., Chuyen, N. V., Hayase, F., & Kato, H. (1992). Absorption and Distribution of [14C]Melanoidins in Rats and the Desumtagenicity of Absorbed Melanoidins against Trp-P-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(1), 21–23. <http://doi.org/10.1271/bbb.56.21>
- Lee, J.-H., & Lee, J. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 426–444. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x>
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., ... Scarino, M. L. (2001). *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 29(6), 649–668.
- Leitch, E. C. M., Walker, A. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., & Flint, H. J. (2007). Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environmental Microbiology*, 9(3), 667–679. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01186.x>
- Lejon, D. P. H., Chaussod, R., Ranger, J., & Ranjard, L. (2005). Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microbial Ecology*, 50(4), 614–625. <http://doi.org/10.1007/s00248-005-5130-8>
- Leser, T. D., & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2194–2206. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x>
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070–11075. <http://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human

- gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023.
<http://doi.org/10.1038/4441022a>
- Ling, W. H., & Hänninen, O. (1992). Shifting from a conventional diet to an uncooked vegan diet reversibly alters fecal hydrolytic activities in humans. *The Journal of Nutrition*, 122(4), 924–930.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S–3485S.
- López-Galilea, I., Andueza, S., Leonardo, I. di, Paz de Peña, M., & Cid, C. (2006). Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. *Food Chemistry*, 94(1), 75–80. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.052>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230. <http://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lupton, J., & Kurtz, P. (1993). Relationship of colonic luminal short-chain fatty acids and pH to *in vivo* cell proliferation in rats. *The Journal of Nutrition*, 123(9), 1522–1530.
- Macfarlane, G. T., & Gibson, G. R. (1994). Metabolic activities of the normal colonic flora. In D. S. A. W. Gibson (Ed.), *Human Health* (pp. 17–52). Springer London. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4471-3443-5_2
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2002). Diet and Metabolism of the Intestinal Flora. *Bioscience and Microflora*, 21(4), 199–208.
<http://doi.org/10.12938/bifidus1996.21.199>
- Malin, M., Verronen, P., Mykkänen, H., Salminen, S., & Isolauri, E. (1996). Increased bacterial urease activity in faeces in juvenile chronic arthritis: evidence of altered intestinal microflora? *British Journal of Rheumatology*, 35(7), 689–694.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S–242S.
- Marteau, P., Cuillerier, E., Meance, S., Gerhardt, M. F., Myara, A., Bouvier, M., ... Grimaud,

- J. C. (2002). Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(3), 587–593.
- Marteau, P., Pochart, P., Flourié, B., Pellier, P., Santos, L., Desjeux, J. F., & Rambaud, J. C. (1990). Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum on metabolic activities of the colonic flora in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 52(4), 685–688.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2005). Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91(4), 645–649. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.034>
- Materska, M., & Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1750–1756. <http://doi.org/10.1021/jf035331k>
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107–118. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
- McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1, S29–37. <http://doi.org/10.1079/BJN2002627>
- McIntosh, F. M., Maison, N., Holtrop, G., Young, P., Stevens, V. J., Ince, J., ... Louis, P. (2012). Phylogenetic distribution of genes encoding β -glucuronidase activity in human colonic bacteria and the impact of diet on faecal glycosidase activities. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1876–1887. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02711.x>
- McNeil, N. I. (1984). The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39(2), 338–342.
- Meyer, D., & Stasse-Wolthuis, M. (2009). The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(11), 1277–1289. <http://doi.org/10.1038/ejcn.2009.64>
- Mills, C. E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M.-J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. E. (2015). *In vitro* colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in

- selective changes in human faecal microbiota growth. *British Journal of Nutrition, FirstView*, 1–8. <http://doi.org/10.1017/S0007114514003948>
- Moco, S., Martin, F.-P. J., & Rezzi, S. (2012). Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *Journal of Proteome Research*, 11(10), 4781–4790. <http://doi.org/10.1021/pr300581s>
- Molis, C., Flourié, B., Ouarne, F., Gailing, M. F., Lartigue, S., Guibert, A., ... Galmiche, J. P. (1996). Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), 324–328.
- Mooi, E., & Sarstedt, M. (2010). Cluster Analysis. In *A Concise Guide to Market Research* (pp. 237–284). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-12541-6_9
- Moon, J.-K., Yoo, H. S., & Shibamoto, T. (2009). Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5365–5369. <http://doi.org/10.1021/jf900012b>
- Morales, F. J. (2002). Application of capillary zone electrophoresis to the study of food and food-model melanoidins. *Food Chemistry*, 76(3), 363–369. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00295-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00295-3)
- Morales, F. J., Fernández-Fraguas, C., & Jiménez-Pérez, S. (2005). Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chemistry*, 90(4), 821–827. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.030>
- Morales, F. J., Somoza, V., & Fogliano, V. (2012). Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 42(4), 1097–1109. <http://doi.org/10.1007/s00726-010-0774-1>
- Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., & Coimbra, M. A. (2012). Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), 903–915. <http://doi.org/10.1039/C2FO30048F>
- Moreno Villares, J. M. (2006). Flora bacteriana intestinal. *Anales de Pediatría*, 04(
Notice: Undefined index: numerolnicial in /var/www/html/includes_ws/modulos/meta-scholar.php on line 48), 12–19.

- Moschen, A. R., Wieser, V., & Tilg, H. (2012). Dietary factors: major regulators of the gut's microbiota. *Gut and Liver*, 6(4), 411–416. <http://doi.org/10.5009/gnl.2012.6.4.411>
- Mroczyńska, M., Galecka, M., Szachta, P., Kamoda, D., Libudzisz, Z., & Roszak, D. (2013). Beta-glucuronidase and Beta-glucosidase activity in stool specimens of children with inflammatory bowel disease. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, 62(3), 319–325.
- Mroczyńska, M., & Libudzisz, Z. (2010). Beta-glucuronidase and beta-glucosidase activity of Lactobacillus and Enterococcus isolated from human feces. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, 59(4), 265–269.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Blaut, M. (2006). Differences in fecal microbiota in different european study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1027–1033. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006>
- Mullen, W., Nemzer, B., Stalmach, A., Ali, S., & Combet, E. (2013). Polyphenolic and hydroxycinnamate contents of whole coffee fruits from China, India, and Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5298–5309. <http://doi.org/10.1021/jf4003126>
- Murthy, P. S., & Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45–58. <http://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2010). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee Industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 897–903. <http://doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z>
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011a). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173–179. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011b). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 368–374. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.063>

- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011c). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661–672. <http://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>
- Musso, G., Gambino, R., & Cassader, M. (2010). Obesity, diabetes, and gut microbiota. *Diabetes Care*, 33(10), 2277–2284. <http://doi.org/10.2337/dc10-0556>
- Mykkänen, H., Tikka, J., Pitkänen, T., & Hänninen, O. (1997). Fecal bacterial enzyme activities in infants increase with age and adoption of adult-type diet. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 25(3), 312–316.
- Nabais, J. M. V., Nunes, P., Carrott, P. J. M., Ribeiro Carrott, M. M. L., García, A. M., & Díaz-Díez, M. A. (2008). Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. *Fuel Processing Technology*, 89(3), 262–268. <http://doi.org/10.1016/j.fuproc.2007.11.030>
- Nair, B. M., Oste, R., Asp, N. G., & Pernemalm, P. A. (1981). Absorption and distribution of a C(14)-Glucose lysine reaction mixture in the rat. *Progress in Food & Nutrition Science*, 5(1-6), 217–228.
- Nakamura, J., Kubota, Y., Miyaoka, M., Saitoh, T., Mizuno, F., & Benno, Y. (2002). Comparison of four microbial enzymes in Clostridia and Bacteroides isolated from human feces. *Microbiology and Immunology*, 46(7), 487–490.
- Nakayama, T., & Oishi, K. (2013). Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galactooligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. *FEMS Microbiology Letters*, 343(2), 161–168. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12142>
- Nalini, N., Sabitha, K., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (1998). Influence of spices on the bacterial (enzyme) activity in experimental colon cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(1), 15–24.
- Nations, F. and A. O. of the U. (1999). *Los Carbohidratos En La Nutricin Humana*. Food & Agriculture Org.
- Navarini, L., Gilli, R., Gombac, V., Abatangelo, A., Bosco, M., & Toffanin, R. (1999). Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 40(1), 71–81. [http://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00032-6](http://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00032-6)
- Nejdfors, P., Ekelund, M., Jeppsson, B., & Weström, B. R. (2000). Mucosal *in vitro*

- permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: species- and region-related differences. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(5), 501–507.
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674. <http://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Newton, W. A., Morino, Y., & Snell, E. E. (1965). PROPERTIES OF CRYSTALLINE TRYPTOPHANASE. *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 1211–1218.
- Neyrinck, A. M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2012). Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(1), 51–59. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.008>
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., & Knight, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(2), 300–310. <http://doi.org/10.1002/ibd.20602>
- Niclas, T., Farris, P., Myers, L., & Berenson, G. (1995). Dietary fiber intake of children and young adults: The bogalusa heart study. *Journal of the American Dietetic Association*, 95(2), 209–214. [http://doi.org/10.1016/S0002-8223\(95\)00049-6](http://doi.org/10.1016/S0002-8223(95)00049-6)
- Nordgaard, I., & Mortensen, P. (1994). Digestive processes in the human colon. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 11(1), 37–45.
- Nunes, F. M., & Coimbra, M. A. (2001). Chemical Characterization of the High Molecular Weight Material Extracted with Hot Water from Green and Roasted Arabica Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1773–1782. <http://doi.org/10.1021/jf0012953>
- Nunes, F. M., & Coimbra, M. A. (2007). Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3967–3977. <http://doi.org/10.1021/jf063735h>
- O'Brien, J., & Morrissey, P. A. (1989). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(3), 211–248. <http://doi.org/10.1080/10408398909527499>
- Oliveira, A. (2011). Determinación de compuestos fenólicos totales en los residuos sólidos

del café instantáneo. Retrieved from
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67674/1/2011-150.pdf>

- Oliveira, S. de, Souza, G. A. de, Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., ... Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497–503. <http://doi.org/10.5935/0100-4042.20140076>
- Oliveras-López, M.-J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., & Martín, F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, 10, 475–484.
- Orozco, A. L., Pérez, M. I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Vila, F. J., ... Arias, M. E. (2008). Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 81(2), 247–252. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2007.12.002>
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6–R15. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 153–162. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00084-X](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00084-X)
- Panusa, A., Zuurro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4162–4168. <http://doi.org/10.1021/jf4005719>
- Paquin, P. (2009). *Functional and Speciality Beverage Technology*. Elsevier.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21–32. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. A. (2014). Contribution of melanoidins to the antioxidant

capacity of the Spanish diet. *Food Chemistry*, 164, 438–445.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.118>

Patil, A. N. A. N. D., Damre, A. N. A. G. H. A., & Raheja, V. A. R. U. N. (2010). Simultaneous analysis of intestinal permeability markers, caffeine, paracetamol and sulfasalazine by reverse phase liquid chromatography: a tool for the standardization of rat everted gut sac model. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, (3), 204–207.

Pavlović, M. D., Buntić, A. V., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2013). Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separation and Purification Technology*, 118, 503–510. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.07.035>

Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., & Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 17–25. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>

Pendyala, S., Neff, L. M., Suárez-Fariñas, M., & Holt, P. R. (2011). Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(2), 234–242. <http://doi.org/10.3945/ajcn.110.002683>

Pérez-Hernández, L. M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. Á., & Meza, N. G. (2013). Compuestos Fenólicos, melanodinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* Y *Coffea canephora*. *BIOtecnica*, 15(1), 51–56.

Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., ... Saura-Calixto, F. (2009). Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 64(2), 102–107. <http://doi.org/10.1007/s11130-009-0110-7>

Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., De Peña, M. P., Cid, C., & Kroh, L. W. (2010). Influence of Brewing Method and Acidity Regulators on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2958–2965. <http://doi.org/10.1021/jf9037375>

- Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., & Heyerick, A. (2011). The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82(1), 53–66. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.012>
- Powrie, W. D., Wu, C. H., & Molund, V. P. (1986). Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environmental Health Perspectives*, 67, 47–54.
- Prasad, K. N. (1980). Butyric acid: A small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sciences*, 27(15), 1351–1358. [http://doi.org/10.1016/0024-3205\(80\)90397-5](http://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90397-5)
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods¹. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11–12), 1173–1181. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00203-8](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00203-8)
- Pusatcioglu, C., & Braunschweig, C. (2011). Moving beyond diet and colorectal cancer. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(10), 1476–1478. <http://doi.org/10.1016/j.jada.2011.07.015>
- Puy Torres, S. (2013). Fermentación colónica *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva. Retrieved from <http://repositori.udl.cat/handle/10459.1/47248>
- Pye, G., Crompton, J., & Evans, D. (1987). Effect of dietary fibre on colonic pH in healthy volunteers. *Gut*, 28, A1366.
- Pyrzynska, K., & Pękal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), 4288–4295. <http://doi.org/10.1039/C3AY40367J>
- Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009a). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different *in vitro* model systems. *Food Chemistry*, 115(1), 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.063>
- Ramos, B. (2010). *Hibridación in situ* (Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/hibridacion_in_situ.pdf
- Ramsay, A. G., Scott, K. P., Martin, J. C., Rincon, M. T., & Flint, H. J. (2006). Cell-associated α -amylases of butyrate-producing Firmicute bacteria from the human colon. *Microbiology*, 152(11), 3281–3290. <http://doi.org/10.1099/mic.0.29233-0>
- Rao, C. V., Chou, D., Simi, B., Ku, H., & Reddy, B. S. (1998). Prevention of colonic aberrant

crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis*, 19(10), 1815–1819.

- Rastall, R. A. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 305–339. <http://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100746>
- Ratnayake, W. M., Hollywood, R., O'Grady, E., & Stavric, B. (1993). Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 31(4), 263–269.
- Rawel, H. M., & Kulling, S. E. (2007). Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 2(4), 399–406. <http://doi.org/10.1007/s00003-007-0247-y>
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 220–235. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00877-8](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00877-8)
- Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B., & Goldman, M. (1992). Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology*, 102(5), 1475–1482.
- Reddy, B. S., Mangat, S., Weisburger, J. H., & Wynder, E. L. (1977). Effect of High-Risk Diets for Colon Carcinogenesis on Intestinal Mucosal and Bacterial β -Glucuronidase Activity in F344 Rats. *Cancer Research*, 37(10), 3533–3536.
- Reddy, B. S., Weisburger, J. H., & Wynder, E. L. (1974). Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science (New York, N.Y.)*, 183(4123), 416–417.
- Redeuil, K., Smarrito-Menozi, C., Guy, P., Rezzi, S., Dionisi, F., Williamson, G., ... Renouf, M. (2011). Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(29), 4678–4688. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.050>
- Reffas, A., Bernardet, V., David, B., Reinert, L., Lehocine, M. B., Dubois, M., ... Duclaux, L. (2010). Carbons prepared from coffee grounds by H₃PO₄ activation: characterization and adsorption of methylene blue and Nylosan Red N-2RBL. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3), 779–788.

<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.076>

- Renouf, M., Marmet, C., Giuffrida, F., Lepage, M., Barron, D., Beaumont, M., ... Dionisi, F. (2014). Dose-response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(2), 301–309. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201300349>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3438–3442. <http://doi.org/10.1021/jf0101410>
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1166–1177. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>
- Rivera, J. A., Barquera, S., Campirano, F., Campos, I., Safdie, M., & Tovar, V. (2002). Epidemiological and nutritional transition in México: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutrition*, 5(1A), 113–122. <http://doi.org/10.1079/PHN2001282>
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401–436. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00093-X](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00093-X)
- Roberfroid, M. B. (1998). Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *The*

British Journal of Nutrition, 80(4), S197–202.

- Roberfroid, & Ph, D. (1993). Dietary fiber, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(2), 103–148. <http://doi.org/10.1080/10408399309527616>
- Robertson, J. A., & Eastwood, M. A. (1981). A method to measure the water-holding properties of dietary fibre using suction pressure. *The British Journal of Nutrition*, 46(2), 247–255.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726–740. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.008>
- Rodriguez-Valencia, N. (2010). Los subproductos del cafe. Fuente de energía renovable. Retrieved from <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0393.pdf>
- Roediger, W. E. (1982). Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology*, 83(2), 424–429.
- Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T., & Lievense, L. C. (1998). Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19(2), 281–285.
- Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2006). A new application of a commercial microtiter plate-based assay for assessing the antimicrobial activity of Maillard reaction products. *Food Research International*, 39(1), 33–39. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.06.002>
- Rufian-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2007a). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1480–1485. <http://doi.org/10.1021/jf062604d>
- Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2007b). Effect of *in vitro* enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 10016–10021. <http://doi.org/10.1021/jf0718291>
- Sakata, T. (1987). Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *The British Journal of Nutrition*, 58(1), 95–103.
- Santos, É. J. dos, & De Oliveira, E. (2001). Determination of mineral nutrients and toxic

- elements in brazilian soluble coffee by ICP-AES. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(5), 523–531. <http://doi.org/10.1006/jfca.2001.1012>
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4303–4306. <http://doi.org/10.1021/jf9803841>
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43–49. <http://doi.org/10.1021/jf1036596>
- Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J. L., & Goñi, I. (2010). Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from *in vitro* colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(7), 939–946. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200900276>
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S–217S.
- Scanlan, P. D., & Marchesi, J. R. (2008). Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *The ISME Journal*, 2(12), 1183–1193. <http://doi.org/10.1038/ismej.2008.76>
- Scheppach, W. (1994). Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35(1 Suppl), S35–S38.
- Schnäbele, K., Briviba, K., Bub, A., Roser, S., Pool-Zobel, B. L., & Rechkemmer, G. (2008). Effects of carrot and tomato juice consumption on faecal markers relevant to colon carcinogenesis in humans. *The British Journal of Nutrition*, 99(3), 606–613. <http://doi.org/10.1017/S0007114507819143>
- Seiquer, I., Rubio, L. A., Peinado, M. J., Delgado-Andrade, C., & Navarro, M. P. (2014). Maillard reaction products modulate gut microbiota composition in adolescents. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(7), 1552–1560.

<http://doi.org/10.1002/mnfr.201300847>

- Sepehri, S., Kotlowski, R., Bernstein, C. N., & Krause, D. O. (2007). Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *13*(6), 675–683. <http://doi.org/10.1002/ibd.20101>
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.-M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(S2), S310–S329. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>
- Shen, J., Obin, M. S., & Zhao, L. (2013). The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(1), 39–58. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
- Shiga, T. M., Lajolo, F. M., & Filisetti, T. M. C. C. (2003). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology (Campinas)*, *23*(2), 141–148. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200007>
- Shim, S.-M., Ferruzzi, M. G., Kim, Y.-C., Janle, E. M., & Santerre, C. R. (2009). Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*, *112*(1), 46–50. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.030>
- Sies, H. (2010). Polyphenols and health: update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *501*(1), 2–5. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.006>
- Silván, J. M., Morales, F. J., & Saura-Calixto, F. (2010). Conceptual study on maillardized dietary fiber in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(23), 12244–12249. <http://doi.org/10.1021/jf102489u>
- Sirko, A., & Brodzik, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, *47*(4), 1189–1195.
- Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*, *5*(4), 1417–1435. <http://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Slavin, J. L. (1987). Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food sources. *Journal of the American Dietetic Association*, *87*(9), 1164–1171.
- Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Molecular Nutrition & Food Research*, *49*(7), 663–672. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200500034>

- Souza, A. L. de, Garcia, R., Cabral, L., Bernardino, F. S., Zervoudakis, J. T., Rocha, F. C., & Valadares, R. F. D. (2004). Coffee hulls in diets of dairy cows: Nitrogenous compounds balance. *ResearchGate*, 83. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/283998555_Coffee_hulls_in_diets_of_dairy_cows_Nitrogenous_compounds_balance
- Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srail, S. K., & Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters*, 458(2), 224–230.
- Stackebrandt, E., & Rainey, F. A. (1995). Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In A. D. L. Akkermans, J. D. V. Elsas, & F. J. D. Bruijn (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual* (pp. 259–275). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0351-0_18
- Stalmach, A., Steiling, H., Williamson, G., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 98–105. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.005>
- Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15451–15455. <http://doi.org/10.1073/pnas.202604299>
- Stein, K., Borowicki, A., Scharlau, D., Scheu, K., Brenner-Weiß, G., Obst, U., Gleis, M. (2011). Modification of an *in vitro* model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention. *British Journal of Nutrition*, 105(05), 678–687. <http://doi.org/10.1017/S0007114510004320>
- Stenberg, P., Norinder, U., Luthman, K., & Artursson, P. (2001). Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1927–1937.
- Stephen, A. M., & Cummings, J. H. (1980). Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature*, 284(5753), 283–284.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., & Lochs,

- H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology*, *115*(2), 281–286. [http://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70194-5](http://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70194-5)
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, *120*(2), 599–606. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.030>
- Tokimoto, T., Kawasaki, N., Nakamura, T., Akutagawa, J., & Tanada, S. (2005). Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *Journal of Colloid and Interface Science*, *281*(1), 56–61. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.083>
- Tokunaga, T., Oku, T., & Hosoya, N. (1986). Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *32*(1), 111–121.
- Tressl, R., Wondrak, G. T., Krüger, R.-P., & Rewicki, D. (1998). New Melanoidin-like Maillard Polymers from 2-Deoxypentoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(1), 104–110. <http://doi.org/10.1021/jf970657c>
- Trugo, L. C., Donangelo, C. M., Trugo, N. M. F., & Bach Knudsen, K. E. (2000). Effect of Heat Treatment on Nutritional Quality of Germinated Legume Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(6), 2082–2086. <http://doi.org/10.1021/jf9913920>
- Tsubaki, H., & Komai, T. (1987). Intestinal absorption of choline in rats. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, *10*(10), 571–579.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, *444*(7122), 1027–131. <http://doi.org/10.1038/nature05414>
- Vaast, P., Bertrand, B., Perriot, J.-J., Guyot, B., & Génard, M. (2006). Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(2), 197–204. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2338>
- Van den Abbeele, P., Verstraete, W., El Aidy, S., Geirnaert, A., & Van de Wiele, T. (2013). Prebiotics, faecal transplants and microbial network units to stimulate biodiversity of the human gut microbiome. *Microbial Biotechnology*, *6*(4), 335–340.

<http://doi.org/10.1111/1751-7915.12049>

- Vazquez-Sanchez, K. (2015). *Capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal in vitro del café (Coffea Arabica L.) usado*. Querétaro.
- Venkatesh, G., Ramanathan, S., Mansor, S. M., Nair, N. K., Sattar, M. A., Croft, S. L., & Navaratnam, V. (2007). Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous determination of buparvaquone, atenolol, propranolol, quinidine and verapamil: A tool for the standardization of rat in situ intestinal permeability studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(4), 1546–1551. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.11.013>
- Vernia, P., Caprilli, R., Latella, G., Barbetti, F., Magliocca, F. M., & Cittadini, M. (1988). Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 95(6), 1564–1568.
- Versantwoort, Rompelberg, & Sips. (2000). Methodologies to study human intestinal absorption. Retrieved from <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/9613/1/630030001.pdf>
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3), 863–868. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008>
- Votavová, V., Voldrich, M., Sevcik, R., Cizkova, H., Mlejnecka, J., Stolar, M., & Fleisman, F. (2009). Changes of Antioxidant Capacity of Robusta Coffee during Roasting. *Czech Journal of Food Sciences*, 27.
- Wagner, K.-H., Derkits, S., Herr, M., Schuh, W., & Elmadfa, I. (2002). Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose–glycine model. *Food Chemistry*, 78(3), 375–382. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00200-5](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00200-5)
- Walaszek, Z. (1990). Potential use of d-glucaric acid derivatives in cancer prevention. *Cancer Letters*, 54(1), 1–8. [http://doi.org/10.1016/0304-3835\(90\)90083-A](http://doi.org/10.1016/0304-3835(90)90083-A)
- Walker, W. A. (1979). Gastrointestinal host defence: importance of gut closure in control of macromolecular transport. *Ciba Foundation Symposium*, (70), 201–219.
- Walker, W. A., Wu, M., Isselbacher, K. J., & Bloch, K. J. (1975). Intestinal uptake of macromolecules. IV.--The effect of pancreatic duct ligation on the breakdown of antigen and antigen-antibody complexes on the intestinal surface. *Gastroenterology*,

69(6), 1223–1229.

- Wallace, T. C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M. D., Gibson, G., Hentges, E., & Sanders, M. E. (2011). Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*, 69(7), 392–403. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00402.x>
- Wang, X., & Gibson, G. R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *The Journal of Applied Bacteriology*, 75(4), 373–380.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., & Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120(3), 850–857. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026>
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3698–3703. <http://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
- Wynder, E. L., & Reddy, B. S. (1974). Metabolic epidemiology of colorectal cancer. *Cancer*, 34(S3), 801–806. [http://doi.org/10.1002/1097-0142\(197409\)34:3+<801::AID-CNCR2820340703>3.0.CO;2-P](http://doi.org/10.1002/1097-0142(197409)34:3+<801::AID-CNCR2820340703>3.0.CO;2-P)
- Yen, W.-J., Wang, B.-S., Chang, L.-W., & Duh, P.-D. (2005). Antioxidant Properties of Roasted Coffee Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2658–2663. <http://doi.org/10.1021/jf0402429>
- Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Kristensen, H. G., & Hovgaard, L. (2001). A dynamic *in vitro* lipolysis model: I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 115–122. [http://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00169-5](http://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00169-5)
- Zarzuelo, A., & Galvez, J. (2005). Fibra dietética, *Acción médica*, 336–368.
- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2365–2370. <http://doi.org/10.1073/pnas.0812600106>
- Zhou, X.-L., De-zhi, F., Xiang-feng, K., Xiao-yan, S., Mei-me, G., & Yu-Long, Y. (2012).

Effects of Soybean Oligosaccharides on Growth Performance and Nutrient Metabolism in Weanling Huanjiang Mini-pigs. *Natural Product Research & Development*, 24, 98.

Zhou, X. L., Kong, X. F., Yang, X. J., & Yin, Y. L. (2012). Soybean oligosaccharides alter colon short-chain fatty acid production and microbial population in vitro. *Journal of Animal Science*, 90 Suppl 4, 37–39. <http://doi.org/10.2527/jas.50269>

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J.-S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwartz, A., ... Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 53–60. <http://doi.org/10.1038/ejcn.2011.141>

Zóltaszek, R., Hanausek, M., Kiliańska, Z. M., & Walaszek, Z. (2008). The biological role of D-glucaric acid and its derivatives: Potential use in medicine. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine)*, 62, 451–62.

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
ABTS	Ácido 2,2' – amino – bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AP	Apical
ARN	Ácido Ribonucleico
BL	Basolateral
cm	Centímetro
CU	Café usado
DPPH	2,2,- difenil-1-picrilhidrazil
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
Et al.	Et alia (y otros).
FND	Fracción no digerible
g	Gramo
GC	Grano de café
h	Hora
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alto Desempeño)
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
mM	Milimolar
ND	No Detectado
nm	Nanómetro
P_{app}	Coeficiente de Permeabilidad
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

pH	Potencial de Hidrógeno
PN	Peso normal
RPM	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SP	Sobrepeso
SCG	Spent coffe grounds (café usado)
TM	Tostado medio
TO	Tostado oscuro
%	Porcentaje
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µmol	Micromol